



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**" IN VITRO ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΓΟΥΑΪΑΖΟΥΛΕΝΙΟ Ή ΓΚΡΕΛΙΝΗ "**

υπό

ΕΛΕΝΗΣ Γ. ΝΤΟΒΟΛΟΥ

Οδοντιάτρου - Κτηνιάτρου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2014

© 2014 Ελένη Γ. Ντόβολου

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (7^η/02-07-2014 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης
*Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης
*Αφ. Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος Μπόσκος
Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Χ. Φθενάκης
Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αλέξανδρος Δαπόντε
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αντώνιος Γκαράς
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στον πατέρα μου, που μου εμφύσησε την αγάπη της
αναζήτησης και της κατάκτησης της γνώσης.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα παρέμενε ανεκπλήρωτο όνειρο χωρίς την ουσιαστική υποστήριξη που είχα στην προσπάθειά μου αυτή από έναν μεγάλο αριθμό ανθρώπων.

Στον Καθηγητή μου κ. Ιωάννη Μεσσήνη εκφράζω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη για την αποδοχή μου ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια στην Κλινική του, για την υπόδειξη του θέματος, για τη διακριτική αλλά συγχρόνως κριτική παρακολούθηση σε όλη τη διάρκεια της έρευνας, και για τις καταλυτικής σημασίας παρεμβάσεις του στη συγγραφή των εργασιών.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Αναπληρωτές Καθηγητές κ.κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη και Κωνσταντίνο Νταφόπουλο, για την πρόθυμη και ουσιαστική καθοδήγηση τους σε όλη τη διάρκεια του εγχειρήματος αυτού.

Τον Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής κ. Γεώργιο Χ Φθενάκη, Διευθυντή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, ευχαριστώ θερμά που ενέκρινε τη διεξαγωγή μεγάλου μέρους των πειραματισμών στην Κλινική του.

Θερμά ευχαριστώ τους ερευνητές του Ινστιτούτου INIA στη Μαδρίτη A Gutierrez - Adan και E Periqueta για τη σημαντικότερη συμβολή τους στη διενέργεια των γονιδιακών μελετών και τους φίλους και συναδέλφους Δημήτρη Ρίζο και Maria Clemente για την βοήθειά τους στο μέρος των πειραματισμών με το γουαϊαζουλένιο, που διενεργήθηκαν στην Ισπανία.

Στον Καθηγητή της Αναπαραγωγής των Μηρυκαστικών του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ και σύζυγό μου Γιώργο Σ. Αμοιρίδη εκφράζω την ευαρέσκειά μου για την παραχώρηση του Εργαστηρίου του, και για την συνεχή παρακολούθηση και υποστήριξη της πορείας των πειραματισμών σε περιόδους οικονομικής δυσπραγίας.

Ευχαριστώ επίσης τους μεταπτυχιακούς φοιτητές της Μαιευτικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής Φένια Κρασιά, Μιχαέλα Τσιπλακίδη και Θωμά –

Μάρκο Χουζούρη για την υποστήριξή τους, την άδολη φίλια τους και τη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια των εξουθενωτικών πειραματισμών της 18ωρης ωρίμανσης των ωαρίων, τη συλλογή και μεταφορά ωοθηκών κάτω από δυσμενείς συνθήκες.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στους παρακάτω για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής

-στην Αναπληρώτρια Ερευνήτρια του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ κ. Θεοδώρα Τσιλιγιάννη για την βοήθειά της στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, και κυρίως για την ηθική συμπαράσταση της στο εγχείρημα αυτό

-στο Συνάδελφο κ. Δημήτρη Βαφειάδη για την δωρεά του καταψυγμένου σπέρματος ταύρου

-στο Συνάδελφο κ. Αθανάσιο Κουκούλη για την έγκαιρη ενημέρωση μας, και τη διευκόλυνση της πρόσβασής μας στο σφαγείο της Καρδίτσας

-στον κ. Κωνσταντίνο Παπαθεοχάρη για την αλόγυστη βοήθειά του με τη συλλογή των ωοθηκών

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να δηλώσω ότι η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την κατανόηση, την αγάπη, και την υποστήριξη των μελών της οικογένειάς μου, ειδικά του μικρού μας Σωκράτη.

Ελένη Ντόβολου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ελένη Γ Ντόβολου

Πτυχία

1989, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Αθηνών,

2000, Τμήμα Κτηνιατρικής Σχολή Επιστημών Υγείας, Παν/μιο Θεσσαλίας

2014, Διδακτορικό Δίπλωμα , Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Παν/μιο Θεσσαλίας

Ξένες γλώσσες

Αγγλική : Πλήρης επάρκεια

Ιταλική : Μέτρια γνώση

Δημοσιεύσεις

A. Πλήρη άρθρα

1. E Dovolou, IE Messinis, E Periquesta, K Dafopoulos, A Gutierrez-Adan, and GS Amiridis (2014) Ghrelin accelerates in vitro maturation of bovine oocytes. *Reprod Dom Anim* (in press)
2. Dovolou E, Periquesta E, Messinis IE, Tsiligianni Th, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, and Amiridis GS. (2014) Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology* 81, 565-571
3. Dovolou E, Chadio S, Messinis IE, Rekkas CA, Deligiannis C, Kalogiannis D, Amiridis GS (2013). Human ghrelin decreases pituitary response to GnRH in superovulated ewes. *Theriogenology* 80, 262-8
4. Th Tsiligianni, E Dovolou, GS Amiridis (2012) Efficacy of feeding cow colostrums to newborn labs . *Livestock Sci* 194, 305-309
5. Th Tsiligianni, GS Amiridis, E Dovolou, I Menegatos, S Chadio, D Rizos and A Gutierrez–Adan(2011) Association between physical properties

- of cervical mucus and ovulation rate in superovulated cows The Canad. J. Vet. Res 75(4)248-253
6. E Dovolou, M Clemente, GS Amiridis, I Messinis, A Kallitsaris, A Gutierrez-Adan, D Rizos (2011) Effects of guaiazulene on in vitro bovine embryo production and on mRNA transcripts related to embryo quality. *Reprod Dom Anim* 46: 862-869
 7. Amiridis GS, Tsiligianni Th, Dovolou E, Rekkas C , Vouzaras D Menegatos I. (2009) Combined administration of GnRH, progesterone, and meloxicam is an effective treatment for the repeat-breeder cow *Theriogenology* 72: 542-548.
 8. Th Tsiligianni, I Valasi, S Cseh, E Vainas, V Faigl, F Samartzi, T Papanikolaou, E Dovolou and GS Amiridis:(2009) Effects of melatonin treatment on follicular development and oocyte quality in Chios ewes *Acta Vet Hung* 57:331-5
 9. T Tsiligianni, E Ntovolou, GS Amiridis (2008) Synchronisation of lambing with low doses of dexamethasone in Chios ewes. *Acta Vet Hung* 56: 393-397.

***B. Περιλήψεις Συνεδρίων
Διεθνή συνέδρια***

1. E Dovolou, M Clemente, GS Amiridis, I Messinis, A Kalitsaris, A Gutierrez-Adan, D. Rizos Effects of guaiazulene on in vitro maturation of bovine zygotes, and on mRNA transcripts related to embryo quality. 2008 GEMINI- maternal Interactions with gametes & Embryos 9-11 October, Volos , GREECE
2. Tsiligianni Th, Amiridis GS, Ntovolou E, et al .Relationship between Certain Physical Properties of Cervical Mucus and Ovulation in Superovulated Cows . *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS* 43 85-85 : Suppl. 5 NOV 2008
3. E. Dovolou, M. Clemente, G.S. Amiridis , I. Messinis, A. Kalitsaris , A. Gutierrez-Adan, D. Rizos.2009 Effects of guaiazulene on in vitro culture of bovine zygotes, and on mRNA transcripts related to embryo quality. *IETS 2009, San Diego, USA. Reprod. Fertile Devel.* 21 (1) 156

4. E. Dovolou, M. Clemente, G.S. Amiridis , I. Messinis, A. Gutierrez-Adan, D. Rizos. 2010. Effects of an exogenous antioxidant on the in vitro bovine embryo production. Proc of the 8th International Ruminant Reproduction Symposium. Anchorage Alaska, USA. P. 72
5. E Dovolou,S Chadio, CA Rekkas, C Deligiannis, P Goulas, J Menegatos, GS Amiridis (2011) ghrelin decreases pituitary response to GnRH in superovulated ewes. Proceedings of the 4th COST –Gemini-meeting Gijon Spain.
6. E Dovolou , I Dafopoulos, A. Kalitsaris, I Messinis, GS Amiridis (2011). Ghrelin affects in vitro maturation of bovine oocytes in a time depended manner. Proceedings of the AETE Annual meeting, Chester UK
7. Tsiligianni Th Dovolou E, Samartzi F, Vainas E, Amiridis GS, Perreu C, Mermillod P. (2012) Associations between two glycosidases activity and in vitro fertilizing capacity of bovine oocytes. 28th AETE meeting Sant Malo, France.
8. E Dovolou, E Periquesta, IE Messinis, T Tsiligianni, K Dafopoulos, A Gutierrez-Adan, GS Amiridis. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. 29th AETE meeting, Istanbul, Turkey. Η εργασία επιλέχτηκε ως finalist στο students' competition.
9. E Dovolou, IE Messinis, A Gutierrez-Adan , E Periquesta, K Dafopoulos and G S Amiridis. Ghrelin Accelerates in vitro Maturation of Bovine Oocytes. ESDAR 2014, Helsinki Finland (η περίληψη θα δημοσιευθεί στο 1^ο τεύχος του 2015 του Repr Dom Anim).

Εθνικά Συνέδρια

10. ΓΣ Αμοιρίδης, Δ Βουζαράς, Ε Ντόβολου, Θ Τσιλιγιάννη. Επιπολασμός της μόλυνσης από *coxiella burnetii* σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής . 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011

11. ΓΣ Αμοιρίδης, Δ Βουζαράς, Ε Ντόβολου, Θ Τσιλιγιάννη. Η άποψη των αγελαδοτρόφων για το παρόν και το μέλλον των επιχειρήσεών τους. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011
12. ΓΣ Αμοιρίδης, Ε Ντόβολου, Σ Χαδιώ, Κ Ρέκκας, Ι Μενεγάτος. Επίδραση της γκρελίνης στο ορμονικό προφίλ προβατινών μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011
13. Ε Βαλάση, Θ Τσιλιγιάννη, Ε Ντόβολου, Ε Βαϊνάς, V Faigl, Θ Παπανικολάου, Φ Σαμαρτζη, S Cseh, και ΓΣ Αμοιρίδης. Ανάπτυξη ωοθυλακίων και ποιότητα ωαρίων μετά από χορήγηση μελάτονίνης σε προβατίνες στην άνοιστρον περίοδο. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011
14. Δ Βουζαράς, Ε Ντόβολου, Θ Τσιλιγιάννη, και ΓΣ Αμοιρίδης. Εκτίμηση των μέτρων βιοασφάλειας και ορθής κτηνοτροφικής πρακτικής σε εκτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011
15. Ε Ντόβολου M Clemente, Δ Ρίζος, Ι Μεσσήνης, Α Καλλιτσάρης, Α Gutierrez-Adan, ΓΣ Αμοιρίδης. Επίδραση ενός εξωγενούς αντιοξειδωτικού στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων αγελάδων. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011.
16. Τσιλιγιάννη Θ, Ντόβολου Ε και ΓΣ Αμοιρίδης. Αποτελεσματικότητα χορήγησης πρωτογάλακτος αγελάδων σε νεογέννητα αρνιά. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011.
17. Θ. Μ. Χουζούρης, Α. Θεοδοσιάδου, Ε. Ντόβολου, Θ. Τσιλιγιάννη, Δ. Καντερές, και Γ.Σ Αμοιρίδης Επίδραση χορήγησης προστατευμένης μεθειονίνης σε δείκτες αναπαραγωγής και υγείας αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και Υγιεινής Τροφίμων Ιωάννινα Μάιος 2014
18. Φ. Κρανιά, Ε. Ντόβολου, Α. Θεοδοσιάδου, Ι. Σ. Παππάς, Κ. Α. Ρέκκας και Γ. Σ. Αμοιρίδης. Η προσθήκη του ενεργοποιού του πλασμινογόνου - ιστικού τύπου (t-ra) στο υπόστρωμα της in vitro γονιμοποίησης (ivf):

επίδραση στα ποσοστά και στην ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων βοοειδών. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και Υγιεινής Τροφίμων Ιωάννινα Μάιος 2014

- 19.Ε. Ντόβολου, Ε. Periquesta, Κ. Νταφόπουλος, Θ. Τσιλιγιάννη, Ι. Ε. Μεσσήνης, Α. Gutierrez-Adan, και Γ. Σ. Αμοιρίδης. Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων βοοειδών. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και Υγιεινής Τροφίμων Ιωάννινα Μάιος 2014

**" IN VITRO ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΓΟΥΑΪΑΖΟΥΛΕΝΙΟ Ή ΓΚΡΕΛΙΝΗ "**

ΕΛΕΝΗ Γ. ΝΤΟΒΟΛΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης** Αφ. Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ Κωνσταντίνος Νταφόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μαιευτικής & Γυναικολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται το ρόλο που πιθανόν έχουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες στη διαδικασία της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων (IVP). Στο κεφάλαιο 1 γίνεται ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας για το ρόλο των αντιοξειδωτικών στην IVP. Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα δεδομένα, οι δραστικές ρίζες του οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) συγκαταλέγονται μεταξύ των βασικών παραγόντων που επιδρούν αρνητικά στην IVP. Η δράση τους μολονότι δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένη, αποδίδεται κυρίως σε διαταραχές της μειωτικής διαίρεσης, σε αναστολή της εμβρυϊκής εξέλιξης, ενίσχυση της απόπτωσης, και σε πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Όμως οι αναφορές από τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρονται στη δράση των διαφόρων αντιοξειδωτικών στην IVP είναι, σε μεγάλο βαθμό, αντικρουόμενες. Η βασική αιτία της ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων θα πρέπει να αποδοθεί στη διαφορετική φύση των αντιοξειδωτικών που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί στις διαφορετικές συνθήκες IVP (ενδογενή με πιθανές παράλληλες δράσεις στα ωάρια – έμβρυα ή εξωγενή), καθώς και στις διαφορετικές και αυθαίρετες, τις περισσότερες φορές, συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών, που παρέχουν τελικώς διαφορετική αντιοξειδωτική προστασία. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν δυο αντιοξειδωτικές ουσίες: μια εξωγενής –το φυτικής προέλευσης γουαϊαζουλένιο (G) – με μόνη γνωστή δράση στα ζωικά κύτταρα, την αντιοξειδωτική προστασία και μια ενδογενής, το γαστρικό πεπτικό γκρελίνη (Ghr), η οποία πέραν των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων είναι γνωστό ότι έχει ποικίλες δράσεις στα

θηλαστικά. Σε μια σειρά πειραμάτων, οι δυο αυτές ουσίες μελετήθηκαν για το βαθμό που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων σε περιβάλλον που δεν προάγει την ανάπτυξη οξειδωτικών φαινομένων. Η πιθανή δράση των αντιοξειδωτικών στην ποιότητα των ωαρίων / εμβρύων αξιολογήθηκε με βάση συγκεκριμένους γονιδιακούς δείκτες. Οι δύο ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε δόσεις, που για μεν το γουαΐαζουλένιο παρείχαν αντιοξειδωτική προστασία αντίστοιχη με αυτή που διασφαλίζεται από τον οργανισμό στα διάφορα τμήματα του γεννητικού συστήματος, για δε τη γκρελίνη οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν, με βάση τη συγκέντρωση του πεπτιδίου στην αιματική κυκλοφορία.

Στο Κεφάλαιο 2, περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την IVP και τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων. Σε όλα τα πειράματα, το βασικό και κοινό πρωτόκολλο IVP περιλάμβανε την εξωσωματική ωρίμανση (IVM) και γονιμοποίηση (IVF) των ωαρίων και την καλλιέργεια των εμβρύων (IVC). Σύμπλοκα ωαρίων-κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (COC's) απομονώθηκαν από ωοθήκες αγελάδων αμέσως μετά τη σφαγή τους με αναρρόφηση ωοθυλακίων διαμέτρου 2 έως 8 χιλιοστών. Η εξωσωματική ωρίμανση των ωαρίων διαρκούσε 24 ώρες και γινόταν σε υπόστρωμα TCM199 εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου μόσχου (FCS) και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), στους 39°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 20% O₂ και μέγιστη υγρασία. Στη συνέχεια, τα ωάρια γονιμοποιούνταν με καταψυγμένο / αποψυγμένο σπέρμα ταύρου και οι γαμέτες συνεπώαζονταν για άλλες 24 ώρες. Οι ζυγώτες καλλιεργούνταν σε ομάδες των 25 σε συνθετικό υγρό αγωγού (SOF) εμπλουτισμένου με ορό

εμβρύου μόσχου (FCS) στους 39 °C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂, 5% O₂ και μέγιστη υγρασία.

Τα ποσοστά αυλάκωσης εκτιμούνταν 48ώρες μετά την έναρξη συνεπώασης των γαμετών, ενώ αυτά του σχηματισμού βλαστοκύστεων τις ημέρες 7, 8 και 9 (συνεπώαση γαμετών = ημέρα 0).

Βλαστοκύστες της ημέρας 7 καταψύχονταν με ταχεία εμβάπτιση σε υγρό άζωτο για τη διενέργεια ποσοτικού προσδιορισμού του mRNA γονιδίων, που σχετίζονται με την οξειδωση, το μεταβολισμό, την δυνατότητα εμφύτευσης (implantation) του εμβρύου, την απόπτωση κλπ, με qRT-PCR. Αναλόγως του πειράματος, έγιναν επίσης προσδιορισμοί σε ωάρια και σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Μεταξύ των διαφόρων ομάδων, τα ποσοστά εξέλιξης – ανάπτυξης των εμβρύων, και οι γονιδιακές εκφράσεις ελέγχθηκαν στατιστικά με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA).

Στο Κεφάλαιο 3, περιγράφονται δυο πειραματισμοί με τροποποίηση των υποστρωμάτων IVM και IVC με την προσθήκη γουαϊαζουλενίου (G). Στο πρώτο πείραμα, το υπόστρωμα της IVM τροποποιήθηκε με την προσθήκη σε αυτό 0.1mM G (n=497), 0.01mM G (n=468), 0.05% διμεθυσουλφοξειδίου (DMSO)-, το οποίο ήταν ο διαλύτης του G- (μάρτυρας⁺, n=467), και 459 ωάρια χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Στο δεύτερο πείραμα, το υπόστρωμα της IVC τροποποιήθηκε με την προσθήκη 0.1mM G (n=344), 0.01 mM G (n=345), 0.05% DMSO (μάρτυρες⁺, n=347) και 355 COCs χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Σε κάθε πείραμα ελέγχθηκαν: τα ποσοστά αυλάκωσης και σχηματισμού βλαστοκύστεων, και η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωση (*GPX1*), το μεταβολισμό (*AKR1B1*, *PTGS2*,

GADPH, *SLC2A5*, *G6PD*) και την δυνατότητα εγκατάστασης του εμβρύου στη μήτρα (*PLAC8*).

Στο πρώτο πείραμα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων στα ποσοστά αυλάκωσης (μάρτυρες: 74.20%; μάρτυρες⁺: 74.58%; 0.1mM: 71.63%; 0.01mM: 71.61%) και στα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων την ημέρα 9 (μάρτυρες: 28.26%, μάρτυρες⁺: 25.80%, 0.1mM: 25.25%; 0.01mM: 25.86%).

Στο δεύτερο πείραμα, το ποσοστό αυλάκωσης ήταν μεγαλύτερο ($p=0.07$) στην ομάδα 0.01mM (77.87%) σε σχέση με τους μάρτυρες (71.41%). Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές σε ότι αφορά τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων την ημέρα 9 (μάρτυρες: 25.50%, μάρτυρες⁺: 26.71%, 0.01mM: 29.58%, 0.1mM: 25.75%).

Αξιοσημείωτη διακύμανση παρατηρήθηκε στο mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν, χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δείχνουν ότι το γουαϊαζουλένιο, παρά την ισχυρότατη δράση του ως αντιοξειδωτικό σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, έχει αμελητέα επίδραση στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων βοοειδών, καθόσον υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκε δεν βελτίωσε τα ποσοστά παραγωγής εμβρύων και δεν επέφερε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που θεωρούνται δείκτες ποιότητας.

Στα πειράματα του Κεφαλαίου 4, μελετήθηκε η επίδραση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού -της γκρελίνης- στην διαδικασία της εξωσωματικής ωρίμανσης των ωαρίων μετά από ενσωμάτωσή της στα υποστρώματα της IVM.

Η γκρελίνη είναι ένα πεπτιδίο, το οποίο αρχικά βρέθηκε να εκκρίνεται από το βλεννογόνο του στομάχου. Παράγεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις πριν από τα γεύματα και επανέρχεται τάχιστα σε βασικά επίπεδα αμέσως μετά από αυτά. Επίσης είναι γνωστό ότι η γκρελίνη ρυθμίζει τη σύνθεση του υποδοχέα που επάγει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης (growth hormone secretagogue receptor). Πέρα από τη δράση της ως ορμόνη του μεταβολισμού, η γκρελίνη υπεισέρχεται στη ρύθμιση πληθώρας φυσιολογικών και βιοχημικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων η καταστολή της παραγωγής ROS, επομένως είναι τεκμηριωμένη η δράση της ως ενδογενούς αντιοξειδωτικού. Επιπλέον, η γκρελίνη ρυθμίζει βασικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, δρώντας κυρίως σε κεντρικό επίπεδο. Ο ρόλος της στην ωρίμανση των ωαρίων και στην εξέλιξη του πρώιμου εμβρύου δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Στο πρώτο πείραμα του κεφαλαίου αυτού, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις γκρελίνης (0 pg/ml C, n=484· 200 pg/ml, Ghr200, n=489· 800 pg/ml, Ghr800, n=524· και 2000pg/ml, Ghr2000, n=489). Στο δεύτερο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι συγκεντρώσεις 0 (C) και 800 pg/ml, και η διάρκεια της IVM διαρκούσε για 18 ή 24 ώρες. Έτσι, δημιουργήθηκαν 4 ομάδες COCs (C18, n=210· Ghr18, n=481· C24, n=243 και Ghr24, n=217). Στο τέλος της IVM ελέγχθηκε ο βαθμός διάτασης της στιβάδας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, και η ωρίμανση του πυρήνα των ωαρίων. Έγινε επίσης ποσοτικός προσδιορισμός γονιδίων στις βλαστοκύστες (*IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *H6PD*, *GPX1*, *DNMT3A*, και *BAX*), στα ωάρια (*COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *CCNB1*, *LDHA*, *GREM1*, *GADH*), και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (*COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *LDHA*, *CCNB1*, *G6PD*, *GLUT1*, *GADPH*, *GREM1*).

Τα αποτελέσματα του πειράματος 1 έδειξαν ότι η προσθήκη γκρελίνης –ειδικά η συγκέντρωση των 800pg/ml- μειώνει σημαντικά το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων.

Στο πείραμα 2, βρέθηκε ότι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, περισσότερα ωάρια που καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες με την παρουσία γκρελίνης έφτασαν στην μετάφαση II, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές για τις ομάδες στις οποίες η ωρίμανση διήρκεσε 24 ώρες. Στις 18 και 24 ώρες, η στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων ήταν περισσότερο διατεταμένη στα COCs που ωρίμασαν υπό την παρουσία γκρελίνης. Το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα Ghr18 ($27.7 \pm 2.4\%$) σε σχέση με αυτό της Ghr24 ($17.5 \pm 2.4\%$). Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν σε διάφορες γονιδιακές εκφράσεις, οι οποίες οδηγούν στην εκτίμηση ότι η παρουσία της γκρελίνης για 24 ώρες οδηγεί στην υπερ-ωρίμανση / γήρανση των ωαρίων. Παρόλα αυτά, τα υψηλά ποσοστά εκκόλαψης των βλαστοκύστεων που αναπτύχθηκαν από ωάρια, τα οποία εκτέθηκαν σε γκρελίνη, δείχνουν ότι οι τελευταίες είναι καλύτερης ποιότητας από αυτές των ομάδων των μαρτύρων.

Από το πείραμα αυτό, συνάγεται ότι η γκρελίνη έχει άμεσο και απολύτως ειδικό ρόλο στην ωρίμανση του ωαρίου, που οδηγεί στην επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης του.

Στο Κεφάλαιο 5, μελετήθηκε κατά πόσο η γκρελίνη μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ανάπτυξης των ζυγωτών και την ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων, όταν αυτή προστίθεται στα υποστρώματα της IVC. Στο πρώτο πείραμα, τα ζυγωτά που παράχθηκαν σε κοινά υποστρώματα,

καλλιεργήθηκαν με την παρουσία 4 διαφορετικών συγκεντρώσεων γκρελίνης (0 pg/ml, C, n=476· 200 pg/ml, Ghr 200, n=467· 800 pg/ml, Ghr 800, n=365 και 2000 pg/ml, Ghr 2000, n=511). Στο δεύτερο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε μόνο η συγκέντρωση των 800 pg/ml και τα ζυγωτά που παράχθηκαν όπως στο πείραμα 1, χωρίστηκαν σε 4 ομάδες και η καλλιέργεια τους έγινε με (ομάδες N) ή χωρίς την καθημερινή ανανέωση του υποστρώματος καλλιέργειας, (Ομάδες: C, n=264, CN, n=353, Ghr, n=258 και GhrN, n=545). Όπως και στα προηγούμενα πειράματα η ποιότητα των εμβρύων αξιολογήθηκε με βάση την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (*IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *G6PD*, *GPX1* και *DNMT3A*). Στο πείραμα 1, δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων, Ghr200 Ghr2000 και C, ενώ σημαντικά λιγότερες βλαστοκύστες παράχθηκαν από την ομάδα Ghr800 σε σύγκριση με αυτές της ομάδας C . Στο πείραμα 2, το χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων εντοπίστηκε στην ομάδα Ghr800, ενώ η καθημερινή αντικατάσταση του υποστρώματος καλλιέργειας οδήγησε σε σημαντικότερη αύξηση του ποσοστού βλαστοκύστεων στην ομάδα Ghr800N, της οποίας το ποσοστό ήταν το υψηλότερο μεταξύ όλων των ομάδων. Σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν επίσης στην έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν, οι οποίες οδηγούν σε μια συνολική εκτίμηση ότι τα έμβρυα που παράχθηκαν με την παρουσία της γκρελίνης ήταν καλύτερης ποιότητας από τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δράση της γκρελίνης, πέραν των ωαρίων, ασκείται και στο επίπεδο ανάπτυξης του πρώιμου εμβρύου, υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα επέκτασης και εμβάθυνσης της έρευνας στις οδούς μέσω των οποίων ασκείται η δράση αυτή, ειδικά σε περιπτώσεις που συνδέονται με μειωμένη γονιμότητα, όπως το σύνδρομο της νευρικής ανορεξίας στον

άνθρωπο, ή το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο σε περιόδους υψηλής γαλακτοπαραγωγής στις αγελάδες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής δείχνουν ότι όταν οι συνθήκες παραγωγής δεν ευνοούν την αθρόα παραγωγή ROS, το οξειδωτικό στρες δεν είναι μείζον πρόβλημα για την εξωσωματική παραγωγή εμβρύων. Αντιθέτως, ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες –όπως η γκρελίνη- είναι δυνατό να επηρεάσουν την διαδικασία της παραγωγής και την ποιότητα των εμβρύων μέσω πολλαπλών λειτουργικών οδών, που σχετίζονται με το μεταβολισμό, τη δυνατότητα ανάπτυξης, την απόπτωση, τη μεθυλίωση ή και την οξείδωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	σελίδα
ABSTRACT	23
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I	
Γενική Εισαγωγή	30
Δημιουργία οξειδωτικού στρες	35
Βασικές αιτίες παραγωγής ROS στην IVP	38
Φυσιολογική δράση των ROS στην IVP	40
Αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στην IVP	42
Σκοπός	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II	
Υλικά και μέθοδοι	47
Εξωσωματική Παραγωγή εμβρύων	47
Απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων	56
Πληροφορίες για τα γονίδια που μελετήθηκαν	60
Στατιστική Ανάλυση	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III	
Επίδραση του γουαΐαζουλενίου στην εξωσωματική παραγωγή και στην ποιότητα εμβρύων βοοειδών	63
Το γουαΐαζουλένιο	63
Υλικά και Μέθοδοι	64
Αποτελέσματα	65
Συζήτηση	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	
Βιολογικές δράσεις της γκρελίνης	79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική

ωρίμανση των ωαρίων βοοειδών

Υλικά και μέθοδοι

86

86

Αποτελέσματα

89

Συζήτηση

97

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική

καλλιέργεια εμβρύων βοοειδών

Υλικά και μέθοδοι

104

Αποτελέσματα

106

Συζήτηση

111

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

Συμπεράσματα

120

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

122

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

128

UNIVERSITY OF THESSALIA

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY

**IN VITRO BOVINE EMBRYO PRODUCTION IN MEDIA
MODIFIED WITH THE ADDITION OF GUAIAZULENE
OR GHRELIN**

ELENI G. DOVOLOU

DVM - DDM

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

Larissa 2014

The present PhD thesis deals with the role that antioxidants may have on the *in vitro* embryo production (IVP). In chapter 1 the internationally published literature on the effects of antioxidants on IVP is reviewed. According to published works the Reactive Oxygen Species (ROS) are among the factors that negatively affect the process of IVP. Although yet not fully elucidated, their functions include disturbances related to meiotic divisions, embryonic arrest and induction of apoptosis leading to cellular death. However, the results of published studies are to some extent contradictory. It is likely that the different nature of antioxidants, the different IVP conditions, and the arbitrary selected doses that inevitably provide different levels of antioxidant protection, are the main causes of these discrepancies. For this reason we have selected to use two different types of antioxidants: one that is totally exogenous- guaiazulene, which is of herbal origin- having exclusively antioxidant actions for vertebrate cells, and one endogenous, the stomach derived peptide ghrelin, that apart from antioxidant it contributes to a series of physiological phenomena in mammals. Those two substances have been studied under experimental conditions that do not promote the development of oxidative stress. The criteria used for the selection of the concentrations of the two substances were to provide similar antioxidant protection with the respective parts of the genital tract –guaiazulene-, or to simulate pre-prandial and / or fasting concentrations of the hormone-ghrelin-. The effects of both substances on oocyte and/or embryo quality have been evaluated on the basis of expression of particular known gene markers.

In chapter 2 the materials and methods used for the IVP and gene expression are detailed. A common IVP protocol has been used for all experiments that comprised *in vitro* oocyte maturation (IVM) *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* embryo culture (IVC). Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by aspiration of small and medium size follicles from slaughtered cows. IVM lasted for 24 hours and it was carried out in TCM199 medium supplemented with fetal calf serum (FCS) and epidermal growth factor (EGF), at 39°C in an atmosphere of 5% CO₂, 20% O₂ in maximum humidity. Then, oocytes were fertilized with frozen/thawed bull semen and gametes were co-cultured for 24 hours. Presumptive zygotes were cultured in groups of 25 for 8 days in

synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with FCS at 39°C in modified atmosphere with 5% CO₂, 5% O₂ and maximum humidity. Cleavage rate was assessed 48 hours post insemination, while blastocyst formation rates were evaluated on days 6, 7, 8, and 9 (insemination was defined as day 0).

Pools of Day-7 blastocysts and, according to the experiment, cumulus cells and oocytes, were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA extraction and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) of genes related to oxidation, metabolism, placentation and apoptosis.

Analysis of variance was used to compare blastocyst formation rates, and mRNA abundance between groups.

In chapter 3 the effects of modification of IVM and IVC media with the inclusion of guaiazulene (G) are described. In the first experiment the maturation medium was modified with addition of 0.1mM of G (n=497), or 0.01mM G (n=468), 0.05%DMSO-the G diluent - (control+ n=467), and a group of 459 oocytes were used as the negative control. In the second experiment, the culture medium was modified with the addition of 0.01mM of G (n=344), 0.1 mM of G (n=345), 0.05% DMSO (Control+, n=347) and 355 were the negative control (C). Blastocyst yield was recorded on days 6, 7, 8 and 9. Quantification of transcripts for mRNA of genes related to metabolism (AKR1B1, PGHS-2 – COX-2, GADPH, GLUT-5) and to implantation (GPX1, G6PD, PLAC8) and to oxidation (MnSOD) was carried out qRT-PCR. In the first experiment no differences were found between groups in terms of cleavage rate (Control: 74.20%; Control+:74.58%; 0.1mM: 71.63%; 0.01mM: 71.61%) or day 9 blastocyst yield (Control-: 28.26%; Control+:25.80%; 0.1mM: 25.25%; 0.01mM: 25.86%).

In the second experiment, cleavage rate tended to be higher in 0.01mM group than in Control (77.87% vs 71.41%, p=0.07). No other differences were detected in cleavage rate (Control+:71.32%; 0.1mM: 72.75%) or in the overall blastocyst yield on Day 9 (Control-: 25.50%; Control+:26.71%; 0.1mM: 25.75%; 0.01mM: 29.58%).

In both experiments the relative abundance of genes studied varied between groups, but these differences were not statistically significant.

It appears that under low oxygen incubation conditions, oxidation is not a serious obstacle for *in vitro* embryo developmental competence and quality.

In chapter 4 the effects of modification of IVM medium with the inclusion of ghrelin on oocyte maturation and embryo development are described.

In the first experiment COCs were matured in the presence of four different concentrations of ghrelin (0 pg/ml C, n=484; 200 pg/ml, Ghr200, n=489; 800pg/ml, Ghr800, n=524; and 2000pg/ml, Ghr2000, n=489). *In vitro* fertilization and embryo culture were carried out in the absence of ghrelin, and blastocyst formation rates were examined on days 7, 8 and 9.

In the second experiment only the 800pg/ml dose of ghrelin was used. Four groups of COCs (C18, n=210; Ghr18, n=481; C24, n=243 and Ghr24, n=217) were matured for 18 or 24 hours, and blastocysts were produced as in experiment 1. At the end of maturation a subgroup of COCs were examined for oocyte nuclear maturation, and cumulus layer expansion. The relative mRNA abundance of various genes related to metabolism, oxidation, developmental competence and apoptosis was examined in snap frozen blastocysts (*IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *H6PD*, *GPX1*, *DNMT3A*, and *BAX*), oocytes (*COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *CCNB1*, *LDHA*, *GREM1* and *GADPH*), and cumulus cells (*COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *LDHA*, *CCNB1*, *G6PD*, *GLUT1*, *GADPH* and *GREM1*).

In experiment 1 ghrelin significantly suppressed blastocysts formation rates. In experiment 2 more ghrelin treated oocytes matured for 18h reached MII compared to controls, while no difference was observed at 24 hours. At 18 and 24 hours cumulus layer was more expanded in ghrelin treated COCs than in controls. Blastocysts formation rate was higher ($p < 0.05$) in Ghr18 ($27.7 \pm 2.4\%$) compared to Ghr24 ($17.5 \pm 2.4\%$). Differences were detected in various genes' expression, indicating that in the presence of ghrelin, incubation of COCs for 24h caused over-maturation of oocytes, but formed blastocysts seemed to be of better quality compared to controls. From the results of these experiments we infer that ghrelin exerts a specific and direct role on the oocyte, accelerating its maturational process.

In chapter 5 the possible effects of ghrelin inclusion in the IVC medium on blastocyst yield and quality were examined. Two major experiments were carried out. In experiment 1, *in vitro* produced zygotes were cultured in the

absence (control C, n=476) and in the presence of three different concentrations of acylated ghrelin (200 pg/ml, Ghr200 n=467; 800pg/ml, Ghr800 n=365 and 2000pg/ml, Ghr2000 n=511); blastocysts formation rate was examined on days 7, 8 and 9. In the second experiment only the 800pg/ml dose of ghrelin was used. Zygotes were produced as in experiment 1 and 24 hours post insemination (hpi) they were divided into 4 groups; in two groups (control C, without ghrelin; Ghr800 with ghrelin) embryos were cultured without medium replacement; in the remaining two groups (Control N and GhrN) the culture medium was daily renewed. Similarly to the previous experiments, a pool of day-7 blastocysts were snap frozen for relative mRNA abundance of various genes (*IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *G6PD*, *GPX1* and *DNMT3A*). In experiment 1 no differences were detected between C, Ghr200 and Ghr2000, while fewer blastocysts were produced in the Ghr800 in comparison to C. In experiment 2 the lowest blastocysts yield was found in Ghr800, while daily renewal of ghrelin (Ghr800N) resulted to increased blastocysts formation rate, which on day 7 was the highest among groups ($p<0.05$). Significant differences were detected in various relative mRNA abundance, giving an overall final notion that embryos produced in the presence of ghrelin were of better quality than controls. Our results imply for a specific role of ghrelin in early embryonic development; its role at periods of reduced fertility such as negative energy balance of cattle or metabolic syndromes in humans should be further investigated.

Collectively, the results of the present thesis show that oxidation is not a major hurdle during IVP, provided that the conditions used do not promote the development of oxidative phenomena. Conversely, endogenous antioxidant substances – such as ghrelin- can potentially affect embryo yield and quality by interfering through multiple pathways related to developmental competence, metabolism, methylation, apoptosis and/or oxidation.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πλήρεις ερευνητικές εργασίες που έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή περιοδικά

1. Dovolou E, Messinis IE, Periquesta E, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, and Amiridis GS (2014) Ghrelin accelerates in vitro maturation of bovine oocytes. *Reprod Dom Anim* (in press)
2. Dovolou E, Periquesta E, Messinis IE, Tsiligianni Th, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, and Amiridis GS (2014) Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology* 81, 565-571
3. Dovolou E, Clemente M, Amiridis GS, Messinis IE, Kallitsaris A, Gutierrez-Adan A, Rizos D (2011) Effects of guaiazulene on in vitro bovine embryo production and on mRNA transcripts related to embryo quality. *Reprod Dom Anim* 46: 862-869

Διεθνή συνέδρια

4. E Dovolou, M Clemente, GS Amiridis , IE Messinis, A Kallitsaris , Gutierrez-Adan, D Rizos. Effects of guaiazulene on in vitro maturation of bovine zygotes, and on mRNA transcripts related to embryo quality. 2008 GEMINI- maternal Interactions with gametes & Embryos 9-11 October, Volos , GREECE
5. E Dovolou, M Clemente, GS Amiridis , IE Messinis, A Kallitsaris , A Gutierrez-Adan, D Rizos. 2009 .Effects of guaiazulene on in vitro culture of bovine zygotes, and on mRNA transcripts related to embryo quality. IETS 2009, San Diego, USA. *Reprod. Fertile Devel.* 21 (1) 156
6. E Dovolou, M Clemente, GS Amiridis , IE Messinis, A Kallitsaris, A Gutierrez-Adan, D Rizos. 2010. Effects of an exogenous antioxidant on the in vitro bovine embryo production. Proc of the 8th International Ruminant Reproduction Symposium. Anchorage Alaska, USA. P. 72
7. E Dovolou , K Dafopoulos, A Kallitsaris, IE Messinis, GS Amiridis (2011). Ghrelin affects in vitro maturation of bovine oocytes in a time depended manner. Proceedings of the AETE Annual meeting, Chester UK

8. E Dovolou, E Periquesta, IE Messinis, T Tsiligianni, K Dafopoulos, A Gutierrez-Adan, GS Amiridis. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. 29th AETE meeting, Istanbul, Turkey. Η εργασία επιλέχθηκε ως finalist στο students' competition.
9. E Dovolou, IE Messinis, A Gutierrez-Adan, E Periquesta, K Dafopoulos and G S Amiridis. Ghrelin Accelerates in vitro Maturation of Bovine Oocytes. ESDAR 2014, Helsinki Finland (η περίληψη θα δημοσιευθεί στο 1^ο τεύχος του 2015 του Repr Dom Anim).

Εθνικά Συνέδρια

10. E Ντόβολου, M Clemente, Δ Ρίζος, IE Μεσσήνης, Α Καλλιτσάρης, A Gutierrez-Adan, ΓΣ Αμοιρίδης. Επίδραση ενός εξωγενούς αντιοξειδωτικού στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων αγελάδων. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο κτηνιατρικής Παραγωγικών ζώων. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2011.
11. E Ντόβολου, E Periquesta, Κ Νταφόπουλος, Θ Τσιλιγιάννη, Ι Ε Μεσσήνης, A Gutierrez-Adan, και Γ Σ Αμοιρίδης. Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική παραγωγή εμβρύων βοοειδών. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζων και υγιεινής τροφίμων. Ιωάννινα, Μάιος 2014.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι τελευταίες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα χαρακτηρίστηκαν από έντονη κοινωνική και οικονομική άνθιση για μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού. Όμως στον ίδιο πληθυσμό αναφοράς, οι κατακτήσεις αυτές συνοδεύτηκαν από ανησυχητική μείωση της γονιμότητας (Bryant 2007).

Η γυναικεία χειραφέτηση και η ισότιμη ένταξη του γυναικείου πληθυσμού στον παραγωγικό ιστό, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ηλικίας στην πρώτη τεκνοποίηση και στη μείωση της γονιμότητας σε επίπεδα κατώτερα του δείκτη αναπλήρωσης, με λιγότερα από 2.1 παιδιά / μητέρα (Wilson 2004). Παράλληλα, στο ίδιο χρονικό διάστημα γίνονται συνεχείς αναφορές για μείωση της γονιμότητας του σπέρματος (Carlsen et al 1992, Swan et al 2000). Ο συνδυασμός των ανωτέρω παραγόντων φαίνεται ότι επιτείνει αθροιστικά τη μείωση της γονιμότητας. Η υπογονιμότητα του πληθυσμού αντικατοπτρίζεται στη διαρκώς αυξανόμενη προσπάθεια αναζήτησης λύσης του προβλήματος της αδυναμίας τεκνοποίησης μέσω των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Το 2008 στην ΕΕ είχαν επισήμως καταγραφεί 532.260 περιστατικά που αντιμετωπίστηκαν με εφαρμογή ART (κύκλοι: 124.539 IVF, 280.552 ICSI, 562 in vitro ωρίμανση ωαρίων κλπ). Οι δείκτες του 2008 παρουσιάζουν αύξηση κατά 7.9% σε σχέση με το 2007 (Ferraretti et al 2012).

Παρά την τεράστια πρόοδο που έχει συντελεστεί στις τεχνικές της IVF, τα μέσα ποσοστά εξέλιξης σε στάδιο μεταφοράς εμβρύου κυμαίνονται περί το 10% (6-13%) (Sunkara et al 2011), και τα ποσοστά γέννησης ανά μεταφερόμενο έμβρυο περί το 23% (Ferraretti et al 2012). Επιπλέον, από σειρά μελετών προκύπτει ότι η ηλικία της δότριας ωαρίων επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα του εμβρύου, γεγονός που υποδεικνύει τη βαρύτητα ενδογενών παραγόντων του ωαρίου, που καθορίζουν τη δυνατότητα εξέλιξης του εμβρύου (Padilla & Garcia 1989, Munne et al 1995, Janny & Menezo 1996).

Η σε βάθος διερεύνηση των παραγόντων, που οδηγούν το ωάριο σε μειωμένη εξελικτική ικανότητα, απαιτεί καλά οργανωμένα πειραματικά μοντέλα, τα οποία θα στηρίζονται σε μεγάλο αριθμό παρατηρήσεων. Οι προϋποθέσεις αυτές είναι δυνατό να διασφαλισθούν με την χρησιμοποίηση ζώων εργαστηρίου (ποντικοί - αρουραίοι), τα οποία αναπαράγονται σε μεγάλους αριθμούς, σε σύντομο χρονικό διάστημα, προσφέροντας τεράστιο αριθμό ωαρίων, ή με τη χρήση μοντέλου βασισμένου σε ωάρια βοοειδών που συλλέγονται κατά τη σφαγή. Από τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας προκύπτουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα βοοειδή διασφαλίζουν περισσότερο αξιόπιστο μοντέλο αναφοράς για τον άνθρωπο σε σχέση με τα τρωκτικά. Σύμφωνα με τους Van Soom και συν (2011) το μοντέλο των βοοειδών υπερτερεί αυτού των ποντικών σε τέσσερα βασικά σημεία: (1) τα αμινοξέα στις περισσότερες πρωτεΐνες παρουσιάζουν περισσότερες κοινές ακολουθίες ανάμεσα στα βοοειδή και τον άνθρωπο, παρά ανάμεσα στα ποντίκια και τον άνθρωπο, (2) η οργάνωση των χρωμοσωμάτων εμφανίζει μεγαλύτερες ομοιότητες στα βοοειδή και στον άνθρωπο, παρά στον άνθρωπο και στα ποντίκια, (3) τα έμβρυα του ανθρώπου όπως και των βοοειδών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις συνθήκες καλλιέργειας κάτι που δεν συμβαίνει στον ίδιο βαθμό με τα έμβρυα των ποντικών (Vajta et al 2010), (4) οι ομοιότητες στην εμφύτευση του εμβρύου και στην αναγνώριση της εγκυμοσύνης ανάμεσα στα βοοειδή και στον άνθρωπο, σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος του γεννητικού συστήματος της αγελάδας και τη δυνατότητα της εύκολης πρόσβασης σε αυτό από σφάγια, δίνουν τη δυνατότητα να μελετηθούν τόσο το γονιδίωμα όσο και να διενεργηθούν μελέτες μεταγραφής και πρωτεομικής στο γεννητικό σύστημα της μητέρας και του εμβρύου, ελέγχοντας πιθανές επιγενετικές επιδράσεις. Οι Ostrup και συν. (2011) αναφέρουν ότι ο πλακούντας των βοοειδών και των χοίρων δίνει μία μοναδική ευκαιρία να διερευνηθούν οι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης των ογκογονιδίων κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης του εμβρύου, διότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στον πλακούντα είναι χαμηλά και κυρίως συγκρίσιμα με αυτά των καρκινικών κυττάρων (Ostrup et al 2011).

Οι Menezo and Herubel (2002) σε μια ιδιαίτερα περιεκτική βιβλιογραφική ανασκόπηση, αναλύουν τους παράγοντες που καθιστούν τα ποντίκια ένα καλό μοντέλο, αλλά ταυτόχρονα αιτιολογούν γιατί το μοντέλο των βοοειδών

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άντλησης περισσότερων και ακριβέστερων πληροφοριών. Συνοπτικά, οι ομοιότητες και οι διαφορές ανάμεσα στα τρία είδη που αναφέρονται από τους συγγραφείς, είναι οι ακόλουθες:

Στα ποντίκια, ένα πολυδυμοτόκο είδος, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων και η ωρίμανση των ωαρίων ολοκληρώνεται μόλις σε 48 ώρες, και είναι το μόνο είδος από το οποίο έχουν γεννηθεί ζωντανοί απόγονοι από *in vitro* ωρίμανση ωαρίων από αρχέγονα ή πρώιμα ωοθυλάκια πριν την ανάπτυξη του άντρου. Αντίθετα, τόσο στον άνθρωπο όσο και στις αγελάδες, για να επιτευχθεί η *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων, τα ωοθυλάκια πρέπει να έχουν ένα ελάχιστο μέγεθος και αναπτυγμένο άντρο.

Κατά το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας, το ώριμο ωάριο πρέπει να περιέχει ένα σημαντικό ποσό πρωτεϊνών και mRNA, που θα υποστηρίξουν την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος. Η πολυαδενυλίωση των mRNAs, τα καθιστά έτοιμα για μεταγραφή αλλά και πιο ευάλωτα στην αποδόμηση, και σε αυτή τη διαδικασία εμφανίζονται μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφόρων ειδών. Έτσι, στα ποντίκια, τα mRNA είναι έτοιμα για μετάφραση από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV). Παρά το γεγονός ότι η ρύθμιση της αδενυλίωσης και σταθερότητας των mRNA δεν είναι λεπτομερώς ρυθμισμένη, αυτό δεν δημιουργεί ιδιαίτερο πρόβλημα, διότι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσουν τα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης είναι πολύ μικρός. Στα βοοειδή και στον άνθρωπο η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης των mRNA είναι πολύπλοκα ρυθμισμένη και ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία (Memili et al 1998). Έχοντας υπόψη ότι κάποια mRNA πρέπει να είναι ενεργά ως το στάδιο της βλαστοκύστης, και στα δύο είδη πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων, ώστε να υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στη σταθερότητα και την ικανότητα μεταγραφής των.

Η καλλιέργεια των εμβρύων είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι στην IVP, με την καλλιέργεια των εμβρύων των ποντικών μετά το στάδιο των 2 κυττάρων να γίνεται εύκολα σε οποιοδήποτε υπόστρωμα, μη προσφέροντας ουσιαστικές πληροφορίες και συμπεράσματα. Παράλληλα, όταν τα ποντίκια επιλέγονται ως πειραματικό μοντέλο, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στους κλώνους (strains) και στα υβρίδια που χρησιμοποιούνται. Σε μία από

τις πρώτες συγκριτικές μελέτες ανάμεσα στα έμβρυα ανθρώπων και ποντικών (Chi et al 1988), ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων ενζύμων έδειξε μεγάλες διαφορές – έως και 30 φορές. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι η καλλιέργεια σε ίδιο υπόστρωμα να οδηγεί σε τελείως διαφορετικές ταχύτητες αντιδράσεων και ενζυματικής δράσης, και τελικά σε διαφορετική χρήση των ουσιών του υποστρώματος.

Βασικές διαφορές στη χρήση της γλυκόζης και την εμφάνιση της ονομαζόμενης τοξικότητας της γλυκόζης υπάρχουν ανάμεσα στα τρία είδη, με τα βοοειδή να βρίσκονται πιο κοντά στον άνθρωπο συγκρινόμενα με τα ποντίκια. Στα ποντίκια, η τοξικότητα της γλυκόζης εμφανίζεται ή όχι ανάλογα με τον κλώνο (Ménézo and Khatchadourian 1990), ενώ η αντικατάστασή της από τη φρουκτόζη μπορεί να βοηθήσει στην επίλυση του προβλήματος. Στον άνθρωπο και στα βοοειδή η χρήση της γλυκόζης εξαρτάται από την επάρκεια σε εξοκινάση (El Mouatassim et al 1998) και η καλλιέργεια των εμβρύων σε ατμόσφαιρα με χαμηλή (5%) συγκέντρωση O₂ δεν επηρεάζει αρνητικά το μεταβολισμό τους παρουσία γλυκόζης.

Ιδιαίτερες διαφορές υπάρχουν στη ρύθμιση του pH. Γενικά, τα έμβρυα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο όξινο pH, ενώ μπορούν να επιβιώσουν ευκολότερα σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα ωάρια και τα έμβρυα των ποντικών περιέχουν το ένζυμο MCT4 (H⁺ -monocarboxylate co-transport 4) και μπορούν πολύ πιο εύκολα να ρυθμίσουν το pH τους (Gibb et al 1997). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αιτιολογεί την ανάγκη χρήσης του γαλακτικού οξέος στην καλλιέργεια των εμβρύων των ποντικών, αλλά όχι και στα έμβρυα του ανθρώπου και των βοοειδών, στα οποία δεν έχουν βρεθεί τα αντίστοιχα ένζυμα.

Μια άλλη διαφορά ανάμεσα στα τρία είδη προκύπτει από τη διαφορετική χρήση των ελεύθερων αμινοξέων. Γενικά, είναι γνωστό ότι τα *in vitro* παραγόμενα έμβρυα έχουν μικρότερα αποθέματα αμινοξέων και πρωτεϊνών σε σχέση με τα *in vivo* έμβρυα. Τα ποντίκια εμφανίζουν ιδιαίτερη ικανότητα στην εσωτερική ρύθμιση των αναλογιών των αμινοξέων, κατά συνέπεια ακόμα και η έλλειψη αμινοξέων δεν δημιουργεί σοβαρό πρόβλημα στην ανάπτυξη των εμβρύων (Sellens et al 1981). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα ποντίκια είναι το μόνο είδος, από το οποίο είναι δυνατόν να παραχθούν βλαστοκύστες, ακόμη κι αν δεν προστεθούν αμινοξέα στα υποστρώματα

καλλιέργειας. Στον άνθρωπο και στα βοοειδή, η προσθήκη αμινοξέων στο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι απαραίτητη, με την ποσότητά τους να είναι εξίσου σημαντική όσο και η αναλογία τους. Επιπλέον, ο μεταβολισμός των αμινοξέων στα έμβρυα του ανθρώπου είναι πιο κοντά στον αντίστοιχο των βοοειδών.

Ακόμη, είναι γνωστό ότι η αντοχή των εμβρύων στη διαδικασία της κατάψυξης και απόψυξής τους είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη διάρκεια της *in vitro* παραγωγής τους. Κατά συνέπεια, η κατάψυξη των εμβρύων των ποντικών είναι ιδιαίτερα εύκολη και ταχεία και δεν μπορεί να αποτελέσει πρότυπο για τον άνθρωπο (Van den Abbeel and Van Steirteghem 1987). Αντίθετα, η κατάψυξη ωαρίων και εμβρύων του ανθρώπου στηρίζεται στις γνώσεις από την κατάψυξη ωαρίων και εμβρύων βοοειδών, που προέρχονται από IVM, IVF και IVC (Ménézo and Veiga 1997).

Συμπερασματικά, σε μελέτες που στοχεύουν στην τροποποίηση της μεθοδολογίας ή των υποστρωμάτων της IVP στον άνθρωπο, το μοντέλο των βοοειδών φαίνεται να υπερτερεί σε σύγκριση με αυτό των ποντικών.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην τεχνολογία της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων βοοειδών (Gordon 1994, Galli 2003).

Στην κτηνιατρική πράξη, η μεταφορά εμβρύων εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο για την επιτάχυνση του ρυθμού γενετικής βελτίωσης των πληθυσμών, μέσω της παραγωγής μεγάλου αριθμού απογόνων από ζώα υψηλής γενετικής αξίας (Gordon 1994). Η κύρια μέθοδος παραγωγής εμβρύων ακολουθεί την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και την *in vivo* διατραχηλική συλλογή των εμβρύων την 6^η - 7^η ημέρα μετά την τεχνητή σπερματέγχυση. Τα συλλεγόμενα έμβρυα βρίσκονται στο στάδιο του μοριδίου ή της νεαρής βλαστοκύστης και μεταφέρονται διατραχηλικά -νωπά ή καταψυγμένα / αποψυχθέντα- σε συγχρονισμένες δέκτριες (Gordon 1994). Να σημειωθεί ότι, για την αποφυγή του ερμαφροδισμού στα θηλυκά έμβρυα (σύνδρομο Freemartin), στα βοοειδή μεταφέρεται αυστηρά ένα και μόνο έμβρυο, εκτός της περίπτωσης που έχει χρησιμοποιηθεί φυλοκαθορισμένο σπέρμα ή έχει προηγηθεί προεμφυτευτικός προσδιορισμός του φύλου των εμβρύων. Σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του AETE (European Embryo Transfer

Society) το 2012 στην ΕΕ συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν περισσότερα από 120.000 έμβρυα αγελάδων (Kniijn 2013).

Ομοίως με την εξωσωματική παραγωγή εμβρύων στον άνθρωπο, ένα μεγάλο ποσοστό ωαρίων / εμβρύων βοοειδών διακόπτουν την εξέλιξή τους κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της IVP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ποσοστό των κατάλληλων για μεταφορά εμβρύων που παράγονται να είναι τελικά μικρότερο του 40% του αρχικού αριθμού των ωαρίων που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα *in vivo* παραγόμενα έμβρυα έχουν μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης συγκρινόμενα με αυτά που παρήχθησαν *in vitro* (Lonergan et al 2003a,b). Η διαφορά αυτή αποδίδεται σε παράγοντες τόσο ενδογενείς –κυρίως ποιότητα ωαρίων- όσο και εξωγενείς, όπως η σύσταση των υποστρωμάτων καλλιέργειας και οι συνθήκες επώασης (Yanagisawa et al 1990, Rizos et al 2002a&b, Lonergan et al 2003a).

Δημιουργία οξειδωτικού στρες

Ακόμα και υπό συνθήκες βασικού μεταβολισμού, είναι αναπόφευκτη η δημιουργία ορισμένων ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι ασταθείς ουσίες με υψηλή δραστικότητα. Τα μόρια αυτά, προκειμένου να σταθεροποιηθούν χημικά, προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες ή από οποιοδήποτε γεινιάζον μόριο, προκαλώντας την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων, που τελικά οδηγούν στην καταστροφή του κυττάρου. Για παράδειγμα, η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου σε βιολογικά υποστρώματα προάγει την οξειδωση, η οποία εκδηλώνεται με την αθρόα παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου - reactive oxygen species (ROS)-, οι οποίες είναι ελεύθερες ρίζες που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Στις πιο κοινές ROS συμπεριλαμβάνονται τα ανιόντα υπεροξειδίου του οξυγόνου (O_2^-), το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα του υδροξυλίου OH^\cdot . Μια δεύτερη κατηγορία παραγόμενων ελευθέρων ριζών είναι το οξειδίου του αζώτου, το διοξειδίου του αζώτου, και το νιτρικό υπεροξειδίου. Στον υγιή οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται σχεδόν άμεσα από ενδογενείς προστατευτικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν τη δράση αντιοξειδωτικών παραγόντων. Κάτω όμως από κάποιες συνθήκες, η ισορροπία ελευθέρων ριζών – αντιοξειδωτικών μηχανισμών διαταράσσεται υπέρ των ελευθέρων ριζών, με

αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Forman et al 1981, Fruehauf and Meyskens 2007). Ο οργανισμός έχει αναπτύξει ένα πολύπλοκο σύστημα μηχανισμών εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, τα ενδογενή ενζυματικά ή μη ενζυματικά (συνθετικά ή προερχόμενα από την τροφή- βιταμίνες) αντιοξειδωτικά. Σύμφωνα με τον κλασικό ορισμό των Halliwell and Gutteridge (1989), ως αντιοξειδωτικό θεωρείται *‘κάθε ουσία που, σε μικρή συγκέντρωση συγκριτικά με το ευάλωτο στην οξείδωση υπόστρωμα, μπορεί να καθυστερήσει ή και να εμποδίσει την οξείδωση του υποστρώματος’*. Παράλληλα, διάφοροι χημικοί παράγοντες εξουδετερώνουν τα ιόντα μετάλλων. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι οι πρωτεΐνες αλβουμίνη και τρανσφερίνη.

Στην κατηγορία των ενζυματικών αντιοξειδωτικών στο κύτταρο εντάσσονται :

- η καταλάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε H_2O και O_2 .
- η δισμουτάση του υπεροξειδίου με δύο μορφές, τη Cu-Zn SOD και τη Mn SOD, η οποία καταλύει τη μετατροπή της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου σε H_2O_2 και O_2 .
- η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την οξείδωση της γλουταθειόνης σε δισουλφίδιο με κατανάλωση την ρίζα H_2O_2 και
- η αναγωγάση της γλουταθειόνης, που αναγάγει το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης σε γλουταθειόνη, με κατανάλωση κατιόντων υδρογόνου.

Κύριοι εκπρόσωποι των συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι

- η βιταμίνη C, η οποία είναι συνένζυμο αρκετών ενζύμων, και δρα ως δότης ηλεκτρονίων
- η βιταμίνη E, η οποία αντιδρώντας με υπεροξειδικές και αλκαλικές ρίζες προστατεύει τις βιολογικές μεμβράνες, διακόπτοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση των μεμβρανών.
- το β-καροτένιο και τα καροτένια
- τα μέταλλα σελήνιο (Se) και ψευδάργυρος (Zn),
- η ταυρίνη και η πρόδρομη μορφή της, η υποταυρίνη, οι οποίες θεωρούνται ότι δρουν ως σαρωτές (scavengers) ελεύθερων ριζών
- η γλουταθειόνη, η οποία αποτελεί το συνένζυμο πολλών ενζύμων. Η γλουταθειόνη δρα ως αντιοξειδωτικό, προκαλώντας αναγωγή και απενεργοποίηση πολλών ενζύμων και παγιδεύοντας τις ρίζες HO^\cdot .

Επιπλέον, η γλουταθειόνη είναι το υπόστρωμα σύνθεσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Ρέκκα 2001)

Αναλόγως της εντόπισης τους στους οργανισμούς, τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες (Gutteridge 1995):

Αντιοξειδωτικά, που δρουν ενδοκυτταρικά

- Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)
- Καταλάση
- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
- Κυτόχρωμα –α₃
- Γλουταθειόνη

Αντιοξειδωτικά, που δρουν στις κυτταρικές μεμβράνες

- α- τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε)
- β-καροτένια
- Ουβικινόλη -10

Αντιοξειδωτικά, που δρουν εξωκυτταρικά

- Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)
- Τρανσφεράση
- Λακτοφερίνη
- Αλβουμίνη
- Σερουλοπλασμίνη
- Χολερυθρίνη
- Ασκορβικό οξύ
- Ουρικό οξύ

Συνθήκες που ευνοούν την οξειδωση στην IVP

Όπως κάθε ζωντανό κύτταρο, το ωάριο και το σπερματοζωάριο καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες μέσω του ATP, που παράγεται από γλυκόλυση και οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια (Alberts et al 1989). Υπό αυτές τις συνθήκες, ο αερόβιος και αναερόβιος μεταβολισμός οδηγεί στην παραγωγή ROS, η συγκέντρωση των οποίων καθορίζει και το βαθμό του οξειδωτικού στρες για τους γαμέτες ή/και τα πρώιμα έμβρυα. Παρά την πρόοδο που έχει συντελεστεί στην IVP, οι ιδανικές συνθήκες οι οποίες θα προσομοιάζουν το *in vitro* με το *in vivo* περιβάλλον δεν έχουν ακόμα επιτευχθεί. Συνέπεια αυτού είναι η συσσώρευση ROS στα υποστρώματα, οι οποίες προάγουν το οξειδωτικό

στρες για τους γαμέτες και τα έμβρυα. Οι λόγοι, που οδηγούν στη συσσώρευση των ROS, είναι αφενός η αναπόφευκτη ενδογενής παραγωγή και η απουσία αμυντικών μηχανισμών στα υποστρώματα, και αφετέρου η έκθεση των γαμετών / εμβρύων σε χειρισμούς και μικροπεριβάλλον, που προάγουν την δημιουργία των ROS (Alberts et al 1989).

Οι βασικές αιτίες παραγωγής ROS στην IVP

1. Συγκέντρωση οξυγόνου

Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού είναι 40% ή και ακόμη μικρότερη της συγκέντρωσης του O₂ στον ατμοσφαιρικό αέρα (απόλυτη συγκέντρωση <8%, Mastroianni and Jones 1965, Fischer and Bavister 1993). Υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου κατά τη διάρκεια της IVP ευνοεί την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οξειδωτικών ενζύμων με συνεπακόλουθο σχηματισμό και συσσώρευση ROS, οι οποίες επηρεάζουν την εξέλιξη των εμβρύων. Σύμφωνα με μελέτες, η καλύτερη αντιμετώπιση του φαινομένου υπερπαραγωγής ROS κατά τη διάρκεια της IVP επιτυγχάνεται με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στην οποία οι συγκεντρώσεις O₂ ρυθμίζονται για μεν την ωρίμανση και γονιμοποίηση των ωαρίων στο 20%, για δε την καλλιέργεια στο 5%. Υπό αυτές τις συνθήκες, αυξάνονται: το ποσοστό των παραγωγής βλαστοκύστεων, ο συνολικός αριθμός κυττάρων των βλαστοκύστεων, και μειώνεται ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων (Yuan et al 2003).

2. Μεταλλικά ιόντα

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα ιόντα του σιδήρου (Fe) και του χαλκού (Cu) τα οποία επάγουν την άμεση αύξηση παραγωγής ROS μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (Catt and Henman 2000), ενώ ο σίδηρος μπορεί να επιτείνει την οξειδωση των λιπιδίων με άμεση επίδραση σε αυτά (Nasr-Esfahani et al 1990b). Ίχνη μεταλλικών στοιχείων μπορεί να υπάρχουν στο νερό, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των υποστρωμάτων της IVP. Ο πιο αξιόπιστος δείκτης ποιότητας του νερού από την πλευρά της ύπαρξης ή όχι

μεταλλικών ιόντων είναι η μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητάς του, η οποία θα πρέπει να βρίσκεται στα όρια του $0.06\mu\text{Sml}^{-1}$ (Fukuda et al., 1987). Αυξημένα ποσά ψευδαργύρου (Zn) έχουν μετρηθεί στο έλαιο, που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια των εμβρύων σε μικροσταγόνες, χωρίς όμως η δράση του στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών να είναι απόλυτα αποσαφηνισμένη (Van Soom et al 2001).

3. Έκθεση στο φως

Στην IVP, οι διάφοροι χειρισμοί εκθέτουν τόσο τα ωάρια όσο και τα πρώιμα έμβρυα στο φως, φυσικό και τεχνητό. Έκθεση στο φως (ιδίως στην υπεριώδη ακτινοβολία) μπορεί να αυξήσει την παραγωγή των ROS και να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες, όπως οξειδωση των βάσεων του DNA και αποτιμήσεις στην αλυσίδα του DNA (Nakayama et al 1994). Η παραμονή των εμβρύων για 5 λεπτά υπό φυσικό φωτισμό βρέθηκε να αυξάνει την παραγωγή H_2O_2 (Goto et al 1993). Σήμερα, στα περισσότερα εργαστήρια λαμβάνεται μέριμνα να αποφεύγεται η έκθεση των ωαρίων-εμβρύων στο φυσικό φως. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία χώρων χωρίς παράθυρα ή με την κάλυψη των τελευταίων με ειδικά φίλτρα –φραγμούς υπεριώδους ακτινοβολίας- και με μείωση στο ελάχιστο του χρόνου έκθεσης των εμβρύων σε πηγές τεχνητού φωτισμού.

4. Σπερματοζωάρια

Στο υπόστρωμα της IVF, η συνήθης συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι 1×10^6 /ml και η συνεπώαση των γαμετών γίνεται για 18-24 ώρες (Ward et al 2002). Ενώ είναι γνωστή η ευεργετική επίδραση των ROS στη γονιμοποίηση (de Lamirande & Gagnon 1993), η πιθανή παρουσία λευκοκυττάρων και ο μεγάλος αριθμός των σπερματοζωαρίων, που παραμένουν γύρω από το ωάριο για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να οδηγήσουν σε υπέρμετρη αύξηση των ROS και αρνητική τελικά δράση στη γονιμοποίηση (Blondin et al 1997, Guerin et al 2001). Παράλληλα τα νεκρά σπερματοζωάρια παράγουν αμινοοξειδάσες, που αυξάνουν ακόμα περισσότερο τις ROS, επηρεάζοντας κατά κύριο λόγο την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και τη συγχώνευσή τους με τα ωάρια.

Φυσιολογική δράση των ROS στην IVP

1. Επίδραση στα ωάρια

Είναι γνωστό ότι οι ROS, σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σε καλά ισορροπημένα επίπεδα, ευνοούν την ωρίμανση των ωαρίων, επάγοντας τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, όπως η ενεργοποιημένη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (mitogen activated protein kinase - MAPK), και ο παράγοντας προαγωγής της ωρίμανσης (maturation promoting factor - MPF) (Fissore et al 1996, Wu et al 1997, Blondin et al 1997). Ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις ROS θεωρούνται θετικοί δείκτες επιτυχίας της IVF (Taylor 2001), οι υψηλές συγκεντρώσεις έχουν αρνητική προγνωστική αξία για την εγκυμοσύνη (Agarwal et al 2003). Η υπέρμετρη παρουσία των ROS στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών, που συμμετείχαν σε IVF συνδέθηκε με επιμόλυνση του ωοθυλακικού υγρού με αίμα ή με ωοθυλακικό υγρό παρακείμενων ωοθυλακίων, τα οποία παρακεντήθηκαν κατά λάθος. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις ROS έχουν καταστροφικές συνέπειες για τη δομική συνοχή του ωαρίου καθώς επηρεάζουν τη δημιουργία της ατράκτου κατά τη μετάφαση II και προκαλούν διαταραχές στον κυτταροσκελετό του ωαρίου και στη δράση των μικροσωληνίσκων (Choi et al 2007).

2. Επίδραση στο σπέρμα.

Χαμηλές συγκεντρώσεις ROS επάγουν τη δραστηριοποίηση του σπέρματος, την ενεργοποίηση, την αντίδραση του ακροσώματος και τη συγχώνευση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, ενισχύοντας τελικά τα ποσοστά γονιμοποίησης στην IVF (de Lamirande et al 1997). Σε ποσοστό περίπου 50% το σπέρμα που χρησιμοποιείται στην IVF, προέρχεται από περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες, καθώς στο εκσπερμάτισμα υπάρχουν ανώμαλες μορφές σπερματοζωαρίων και λευκοκύτταρα, που αποτελούν την κύρια πηγή των ROS (Agarwal et al 2006). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS προκαλούν καταστροφή του DNA, η οποία θεωρείται ίσως η σπουδαιότερη αιτία

αποβολών, παιδικών καρκίνων, και συγγενών ανωμαλιών (Baker και Aitken 2005).

3. Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα πρώιμα έμβρυα

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα της μειωμένης απόδοσης της *in vitro* παραγωγής εμβρύων. Σύμφωνα με τους Dalvit et al (2005b), κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης, τα επίπεδα των ROS παραμένουν σταθερά. Αντίθετα, σημαντική συσσώρευση ROS παρατηρείται στα έμβρυα από το στάδιο των 2 κυττάρων μέχρι το στάδιο του μοριδίου. Η αύξηση αυτή αποδίδεται τόσο στην απογύμνωση των ζυγωτών από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου πριν την έναρξη της καλλιέργειας όσο και στην αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας του πρώιμου εμβρύου. Οι Thompson et al (1996a) αναφέρουν ότι η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου, γλυκόζης και πυρουβικού από τα έμβρυα συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των ROS. Από το στάδιο της βλαστοκύστης και μετά, η παραγωγή των ROS μειώνεται ξανά, γεγονός που συνδέεται με την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης και την παραγωγή ATP μέσω της γλυκόλυσης (Thompson et al 1996b). Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS προκαλούν οξείδωση των λιπιδίων και καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και του κυτταροπλάσματος, διαταράσσοντας τη μεταφορά ουσιών, τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τη σύντηξη των γαμετών και την κυτταρική διαίρεση (Yang et al 1998). Η σουλφοδριλική οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση πολλών ενζυματικών συστημάτων και να διαταράξει το μεταβολισμό των ωαρίων και των εμβρύων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επίδραση στο μιτοχονδριακό RNA, η οποία έχει ως συνέπεια μεταβολικές δυσλειτουργίες και διαταραχές στην ανάπτυξη των εμβρύων (Guerrin et al 2001). Το φαινόμενο της αναστολής ανάπτυξης στο στάδιο των δύο κυττάρων (2-cell block) στα έμβρυα ποντικών, αποδίδεται στην αύξηση των ROS. Συσσώρευση ROS με παράλληλη μείωση των αποθεμάτων των εμβρύων σε αντιοξειδωτικά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, μέσω του φαινομένου της απόπτωσης (Jurisicova et al 1996, Kitagawa et al 2004). Μικρές ποσότητες ROS αποτρέπουν τη γήρανση του ωαρίου, όμως σε ώρια στα οποία έχει αρχίσει η διαδικασία της γήρανσης, την επιταχύνουν

(Yanagisawa et al 1990, Johnson and Nasr-Esfahani 1994, Velez-Pardo et al 2007, Miao et al 2009).

Αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στην IVP

Το οξειδωτικό στρες στα ωάρια και στα έμβρυα αυξάνεται είτε λόγω αυξημένης παραγωγής ROS είτε λόγω μειωμένης εξουδετέρωσης τους. *In vivo*, τόσο το ωοθυλακικό υγρό όσο και το υγρό του ωαγωγού προσφέρουν ισχυρή αντιοξειδωτική προστασία στο ωάριο και στα πρώιμα έμβρυα, αντίστοιχα (Guerin et al 2001). Στο *in vitro* περιβάλλον η αντιοξειδωτική προστασία προέρχεται από αυξημένη μεταγραφή mRNA, που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα ή από την πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών, που προστίθενται για αυτό το σκοπό στα υποστρώματα. Από τη στιγμή, που η βλαπτική επίδραση των ROS τεκμηριώθηκε ως μία από τις κύριες αιτίες της μειωμένης απόδοσης της IVP, δύο μεγάλες κατηγορίες μεθόδων εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκειά της για να ελεγχθούν οι επιδράσεις των ROS.

1. Τροποποίηση της συγκέντρωσης του O₂

Στην IVP των βοοειδών και των ανθρώπων, η ωρίμανση και η γονιμοποίηση των ωαρίων γίνεται σε περιβάλλον με συγκέντρωση O₂ 20%. Αυξημένη συγκέντρωση O₂ στην ωρίμανση οδηγεί σε αύξηση των ROS (Hashimoto et al 2000a) και αλλαγές στο μεταβολισμό των ωαρίων, με το πυρουβικό οξύ να αποτελεί το κύριο άμεσο ενεργειακό υπόστρωμα. Το πυρουβικό μαζί με το γαλακτικό οξύ, που αποτελούν προϊόντα της αναερόβιας γλυκόλυσης, ευνοούν την ωρίμανση των ωαρίων (Hashimoto et al 2000a,b). Η απαιτούμενη ενέργεια υπό τη μορφή του ATP προέρχεται από τη γλυκόλυση ή κυρίως, από μεταφορά από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου.

Ωρίμανση σε χαμηλή συγκέντρωση O₂ (5%) ευνοεί την πυρηνική ωρίμανση των ωαρίων των ποντικών και των χάμστερ (Haidri 1971, Gwatkin 1974). Στα βοοειδή, η χαμηλή συγκέντρωση O₂ μειώνει τη συγκέντρωση των ROS, εμποδίζει την κατανάλωση της γλουταθειόνης, και οδηγεί στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης, αυξάνοντας ταυτόχρονα τα απαιτούμενα ποσά γλυκόζης στο υπόστρωμα για να ολοκληρωθεί η ωρίμανση

(Hashimoto et al 2000 a&b, Oyamada and Fukui, 2004). Σύμφωνα με τους Bermejo-Alvarez et al (2010), ωρίμανση σε 5% O₂ βελτιώνει την ποιότητα των ωαρίων και την παραγωγή εμβρύων όχι όμως και την ποιότητα των εμβρύων.

Στην *in vitro* γονιμοποίηση, οι μελέτες στις οποίες η συγκέντρωση του οξυγόνου μειώθηκε στο 5% δίνουν αντιφατικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι Takahashi and Kanagawa (1998) αναφέρουν ευεργετική επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης, που αντικρούει προηγούμενη δημοσίευση των Pinyorummintr and Bavister (1995).

Στα σύγχρονα συστήματα εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων, στα περισσότερα είδη, η καλλιέργεια των εμβρύων γίνεται σε μικροσταγόνες κάτω από έλαιο μετά από απογύμνωση των ζυγωτών από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Πληθώρα μελετών δείχνει ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, 5%, βελτιώνει τα ποσοστά παραγωγής και την ποιότητα των εμβρύων. Αυξημένη συγκέντρωση οξυγόνου μπορεί να δώσει το ίδιο καλά αποτελέσματα, αν η καλλιέργεια γίνει με την παρουσία άλλων κυττάρων (co- culture) ή χωρίς απογύμνωση των ζυγωτών. Στην περίπτωση αυτή, θεωρείται ότι τα κύτταρα αυτά εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας τα έμβρυα από τις βλαβερές συνέπειες του αυξημένου οξειδωτικού στρες (Cetica et al 2001).

2. Προσθήκη αντιοξειδωτικών στα υποστρώματα

Η δεύτερη προσέγγιση της αντιμετώπισης του προβλήματος της αυξημένης οξειδωσης στην εξωσωματική είναι η τροποποίηση των υποστρωμάτων, με την προσθήκη ενδογενών ή εξωγενών ουσιών, με γνωστή αντιοξειδωτική δράση. Οι ουσίες αυτές προστίθενται στα διάφορα στάδια της εξωσωματικής και η επίδραση τους, στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες, φαίνεται να είναι ευεργετική για την παραγωγή των εμβρύων (Taylor 2001, du Plessis et al 2008). Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι, στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, η επιλογή της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού που χρησιμοποιήθηκε, ήταν μάλλον τυχαία (Boldin et al 1997, Dalvit et al 2005b). Η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης έχει ιδιαίτερη σημασία για να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών, καθόσον υπερ- ή υπο-

δοσολογία είναι πιθανό να απαλείψουν ή ακόμη και να αντιστρέψουν το προστατευτικό αποτέλεσμα τους (Choi et al 2007).

Κρίσιμο σημείο, επίσης, αποτελεί ο χρόνος προσθήκης των αντιοξειδωτικών στα υποστρώματα. Για παράδειγμα, η προσθήκη αντιοξειδωτικών στο στάδιο της ωρίμανσης των ωαρίων, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη, βοηθά στη διατήρηση υψηλών επιπέδων γλουταθειόνης στα ωάρια μετά το πέρας της ωρίμανσης, με το θετικό αποτέλεσμα να γίνεται εμφανές στην παραγωγή των εμβρύων (de Matos and Furnus 2000). Στην καλλιέργεια των εμβρύων, τα αντιοξειδωτικά προστίθενται είτε εφ'άπαξ, από την αρχή και για όλη τη διάρκειά της ή σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, που αντιστοιχούν σε σημαντικά στάδια εξέλιξης των εμβρύων. Η προσέγγιση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η παραγωγή των ROS καθώς και η ευαισθησία των εμβρύων στο οξειδωτικό στρες είναι ανάλογη του σταδίου εξέλιξης. Έτσι, στα βοοειδή, τα έμβρυα στο στάδιο των 9-16 κυττάρων φαίνονται ιδιαίτερα ανθεκτικά στην οξείδωση σε σχέση με τα ζυγωτά και τις βλαστοκύστες (Van Langendonck et al 1998). Η αυξημένη ευαισθησία των εμβρύων στην οξείδωση και η αυξημένη ανάγκη αντιοξειδωτικής προστασίας στο στάδιο της δημιουργίας της βλαστοκοίλης, αποδίδεται στον αυξημένο μεταβολισμό, στην έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων και της εμφάνισης του φαινομένου της απόπτωσης (Feugang et al 2004).

Ο τρόπος δράσης είναι ανάλογος της αντιοξειδωτικής ουσίας, που προστίθεται. Άλλες δρουν προληπτικά, καταστέλλοντας το σχηματισμό ROS, όπως η καταλάση, και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), που διασπών το H₂O₂, η αλβουμίνη, η τρανσφαιρίνη και η λακτοφερίνη που δεσμεύουν τον σίδηρο, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), που εξουδετερώνει τη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου προς H₂O₂. Άλλες εξουδετερώνουν –σαρώνουν- τις ROS (free radical scavengers), όπως η βιταμίνες A, C και E, η χολερυθρίνη, η γλουταθειόνη (GSH) και η υποταυρίνη. Άλλα αντιοξειδωτικά εντάσσονται στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών επισκευής, διότι συμβάλλουν στην αποκατάσταση των βλαβών, που προκαλούνται από τη δράση των ROS στις κυτταρικές μεμβράνες, όπως οι λιπάσες, οι τρανσφεράσες, και η GPx (Gutteridge 1995, Guerin et al 2001). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι κάποιες άλλες ουσίες, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και ορισμένες ορμόνες,

αυξάνουν τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών ενζύμων, παρέχοντας έμμεση αντιοξειδωτική προστασία.

Οι περισσότερες από τις ουσίες, που αναφέρονται στις διάφορες μελέτες, είναι ενδογενείς, πρόκειται δηλαδή για διάφορες βιταμίνες (ρετινόλη, ρετινοειδή, α-τοκοφερόλη και παράγωγά της, ασκορβικό οξύ), γλουταθειόνη και άλλες θειόλες (Wang et al 2002, Ali et al 2003, Livingston et al 2004, Agarwal et al 2005a & b, Dalvit et al 2005a&b), οι οποίες εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση θα μπορούσαν και με διαφορετικό τρόπο να επηρεάσουν τη διαδικασία ωρίμανσης των ωαρίων και την ικανότητα ανάπτυξης του εμβρύου.

Σκοπός

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η παρουσία-ανάπτυξη έντονων ή/και ανεξέλεγκτων οξειδωτικών διεργασιών στα υποστρώματα της IVP προκαλεί δυσμενές περιβάλλον για την εξελικτική δυνατότητα του ωαρίου και του πρώιμου εμβρύου. Στην προσπάθεια να κατασταλεί η έκθεση των γαμετών και εμβρύων σε οξειδωτικό στρες, έχουν τυποποιηθεί πρωτόκολλα καλλιέργειας σε συνθήκες ατμόσφαιρας χαμηλής συγκέντρωσης O₂ με προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στα υποστρώματα. Τα αντιοξειδωτικά, που χρησιμοποιούνται, είναι, όπως αναφέρεται σε προηγούμενο κεφάλαιο, συνήθως ενδογενείς ουσίες, οι οποίες πέραν της αντιοξειδωτικής τους δράσης επηρεάζουν τους κυτταρικούς κύκλους, παρεμβαίνοντας σε διάφορα μεταβολικά και βιοχημικά μονοπάτια. Επιπλέον, οι χρησιμοποιούμενες δόσεις συνήθως επιλέγονται αυθαίρετα. Από τη βιβλιογραφία, λείπουν οι αναφορές για την δράση αποκλειστικά εξωγενών αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες να έχουν χρησιμοποιηθεί σε συγκεντρώσεις που να εξομοιώνουν την αντιοξειδωτική προστασία των καλλιεργητικών υποστρωμάτων με αυτήν του περιβάλλοντος των αντίστοιχων τμημάτων του γεννητικού συστήματος.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος αντιοξειδωτικών ουσιών σε όλα τα στάδια της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων βοοειδών, σε συνθήκες που δεν προάγουν την ανάπτυξη οξειδωτικών φαινομένων και να αποτυπωθεί ο ρόλος των αντιοξειδωτικών τόσο στην ποσοτική απόδοση σε έμβρυα κατάλληλα για μεταφορά, όσο και στην ποιότητα τους, όπως αυτή

εκτιμάται με τη χρήση συγκεκριμένων γονιδιακών δεικτών. Επιλέχθηκε μια εξωγενής ουσία, το γουαΐαζουλένιο, της οποίας οι βιολογικές ιδιότητες αφορούν αποκλειστικά στο ρόλο της ως αντιοξειδωτικό και μια ενδογενής, η γκρελίνη, με πολλαπλό βιολογικό ρόλο. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της IVP των βοοειδών, το οποίο περιλαμβάνει την εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων, τη γονιμοποίηση και την καλλιέργεια μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε από κοινού στην Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Τμήματος Ιατρικής του ΠΘ, και στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ. Μέρος της έρευνας εκπονήθηκε στο Τμήμα Αναπαραγωγής των Ζώων του Ινστιτούτου INIA – Μαδρίτης (Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA, Madrid)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εκτός των περιπτώσεων, που περιγράφονται διαφορετικά, όλα τα χημικά, αντιδραστήρια και υποστρώματα αγοράστηκαν από τη Sigma Aldrich (Taufkirchen- Munich, Germany). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή όλων των υποστρωμάτων, ήταν κατάλληλο για μεταφορά εμβρύων (water for embryo transfer). Η αποστείρωση των διαλυμάτων γινόταν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Horizontal laminar flow, Mini-H Telstar, Spain), με τη δίοδο όλων των υποστρωμάτων διαμέσου ηθμού μιας χρήσης διαμέτρου 0.22 μm (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Germany).

Η σύνθεση όλων των διαλυμάτων και υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες φάσεις της IVP, περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα – σελίδες 115-120.

Εξωσωματική παραγωγή εμβρύων

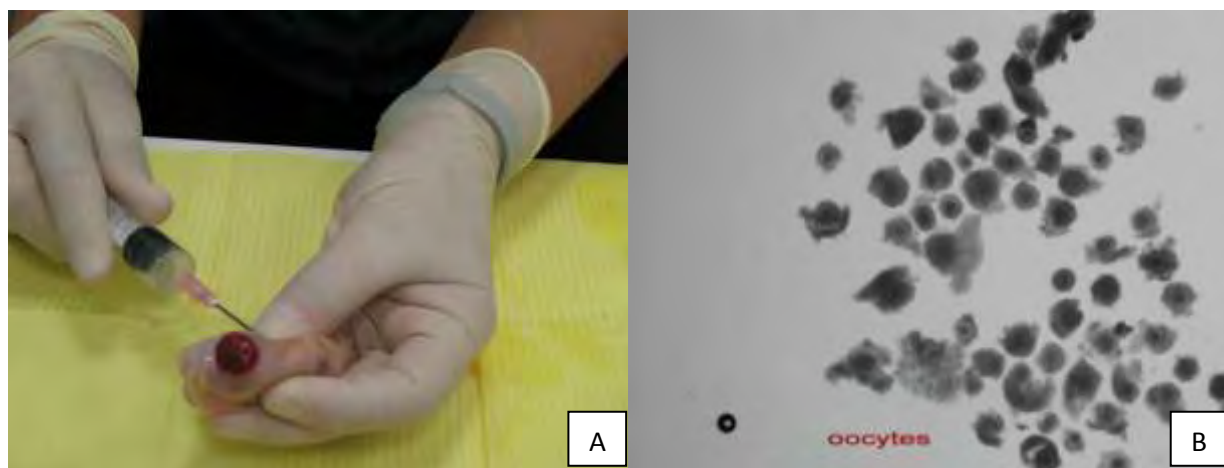
Συλλογή Ωοθηκών –Ωαρίων

Για τα πειράματα της IVP, χρησιμοποιήθηκαν πτωματικές ωοθήκες αγελάδων, των οποίων η συλλογή πραγματοποιήθηκε από το τοπικό σφαγείο της Καρδίτσας. Αμέσως μετά τον εκσπλαχνισμό των αγελάδων, γινόταν συλλογή των ωοθηκών, ξέπλυμα με φυσιολογικό ορό και τοποθέτησή τους 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 τη μεταφορά τους στο εργαστήριο εξωσωματικής, ήταν 1½ ώρες. Για να μειωθεί το αυξημένο μικροβιακό φορτίο των ωοθηκών (από πιθανή επιμόλυνση στο σφαγείο), πριν από την συλλογή των ωαρίων,

πραγματοποιούνταν διαδοχικές εκπλύσεις των ωοθηκών σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (37°C) και επιφανειακή απολύμανσή τους με γάζα εμποτισμένη σε διάλυμα αλκοόλης 70%. Μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας 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, Εικόνα 1) πραγματοποιούνταν με σύριγγα των 10 ml και βελόνα 18G x 1 1/2" (KDL®, Hamburg, Germany). Η συλλογή του ωοθυλακικού υγρού γινόταν σε 50 ml falcon (Cellstar® Tubes, greiner bio-one, Germany), τα οποία καθ' όλη τη διάρκεια της αναρρόφησης παρέμεναν σε υδατόλουτρο (37° C). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, 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 min, προκειμένου όλα τα έμμορφα συστατικά του να κατακαθίσουν στον πυθμένα και μαζί με αυτά και τα συμπλέγματα ωαρίων-ωοφόρων δίσκων (Cumulus - Oocytes Complexes, COCs). Στη συνέχεια, το διαυγές υπερκείμενο υγρό απομακρυνόταν προσεκτικά από το σωλήνα, το ίζημα αναμειγνυόταν με PBS, και τοποθετούνταν σε μικροβιολογικό τρυβλίο (petri dish) διαμέτρου 9.4 cm (Greiner bio-one, Germany).

Εικόνα 1



Συλλογή ωαρίων (COCs) : αναρρόφηση ωοθυλακίων (A) και COCs πριν την επιλογή και την έναρξη της ωρίμανσης (B)

Όλες οι εργασίες που ακολούθησαν μετά τη συλλογή των ωαρίων, γινόταν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Horizontal laminar flow, Mini-H Telstar, Spain).

Η επιλογή των καλής ποιότητας COC's γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (Stereoscopic Zoon Microscope SMZ1500, Nikon) και η συλλογή τους με τη χρήση ειδικής γυάλινης πιπέτας (mouth pipet), που κατασκευαζόταν στο εργαστήριο μετά από πύρωση σε λύχνο Bunsen και ταυτόχρονη έλξη κοινής πιπέτας Pasteur (Εικόνα 2).

Εικόνα 2



Επιλογή και έκπτυξη των ωαρίων (COCs) σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής.

Τα ωάρια, που επιλέγονταν για να χρησιμοποιηθούν στην εξωσωματική, ήταν τα 1^{ης} και 2^{ης} κατηγορίας, σύμφωνα με τα κριτήρια των de Loos et al (1989) και Younis et al (1989). Στην 1^η κατηγορία ανήκουν, όσα ωάρια διαθέτουν ομοιογενές και διάφανο ωόπλασμα, του οποίου ο ωοφόρος δίσκος αποτελείται από πολλές συμπαγείς στοιβάδες κυττάρων, ενώ στη 2^η κατηγορία ανήκουν τα COC's με λιγότερο διαυγές ωόπλασμα που περιβάλλεται από τουλάχιστον 3 συμπαγείς στοιβάδες κυττάρων. Μετά την επιλογή, τα COCs τοποθετούνταν σε μικροβιολογικά τρυβλία, διαμέτρου 3.5 cm, που περιείχαν διάλυμα PBS προκειμένου να «καθαριστούν» περαιτέρω από τα κύτταρα του ωοθυλακικού υγρού. Για το σκοπό αυτό, ακλουθούσαν

τρεις διαδοχικές εκπλύσεις τους σε διάλυμα PBS, και δύο σε υπόστρωμα ωρίμανσης, εξασφαλίζοντας έτσι την πλήρη απομάκρυνση άλλων κυττάρων και την αποφυγή πρόσμιξης υπολειμμάτων PBS στο υπόστρωμα ωρίμανσης.

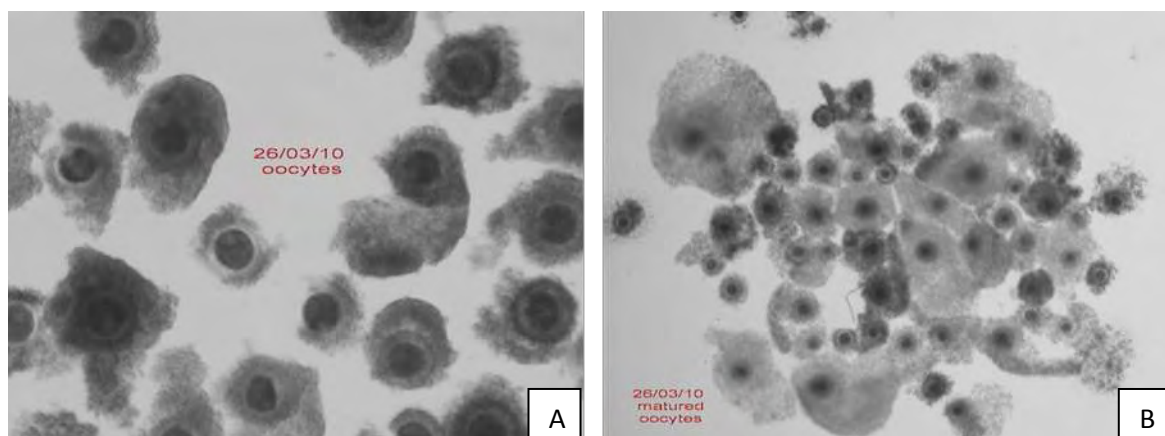
In vitro ωρίμανση των ωαρίων

Η ωρίμανση των ωαρίων γινόταν ανά ομάδες των 50, μετά από τυχαία επιλογή, σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 4-βοθρίων (4-well dishes, Nunk-Thermofisher Scientific, Denmark), τα οποία περιείχαν 500 μl υποστρώματος ωρίμανσης M199 εμπλουτισμένου με 10 ng/ml Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και 10% Ορό Εμβρύου Μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS).

Η γλουταμίνη, που περιέχεται στο υπόστρωμα ωρίμανσης, είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε αλλαγές της θερμοκρασίας ή/και του pH, καθώς η παρατεταμένη παραμονή της στο θρεπτικό μέσο μπορεί να προκαλέσει την αποδόμησή της. Για το λόγο αυτό, το υπόστρωμα ωρίμανσης προετοιμαζόταν 1 ώρα και όχι νωρίτερα, πριν από τη χρήση του, και διατηρούνταν στον επωαστικό κλίβανο CO₂ (39°C, 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία).

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

Εικόνα 3



Ωάρια (COCs) πριν [A] και μετά [B] την *in vitro* ωρίμανση. Διακρίνεται η έντονη διάταξη της στιβάδας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου [B]

Επεξεργασία σπέρματος και ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων

Σε όλα τα πειράματα της διατριβής, χρησιμοποιήθηκε καταψυγμένο σπέρμα ταύρου φυλής Holstein, γνωστής *in vivo* και *in vitro* γονιμότητας, από το ίδιο εκσπερμάτισμα. Για την αναβίωση των καταψυγμένων σπερματοζωαρίων, η διαδικασία περιελάμβανε την απόψυξη των σωληνίσκων (ministraws) σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C, για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, το σπέρμα τοποθετούνταν σε 15 ml falcon tube, το οποίο περιείχε 3 ml διαλύματος Sp-TALP και ακολουθούσε φυγοκέντρηση του δείγματος στα 1000x g, για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη διαδικασία αυτή αφαιρούνται όλα τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την κατάψυξη του σπέρματος (έκπλυση) και καθιζάνουν τα σπερματοζωάρια.

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 την διαδικασία έκπλυσης του σπέρματος, και ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος από το falcon, κάλυψη του ιζήματος με 1 ml υποστρώματος IVF και τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο CO₂ με γωνία 45°, για 1 ώρα. Μόνο τα ζωντανά και με προοδευτική κίνηση σπερματοζωάρια μπορούν να μετακινηθούν στην υπερκείμενη στοιβάδα του υποστρώματος της IVF (swim-up method). Αναρροφώντας 800μl του επιφανειακού υποστρώματος χωρίς να διαταραχτεί το ίζημα, συλλέγονται μόνο τα ζωντανά και καλής ποιότητας σπερματοζωάρια. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό 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 σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, χρησιμοποιώντας αραιωμένο δείγμα (1/10) σε νερό. Η μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος γινόταν με 10x/0.25 μεγεθυντικό φακό (Zeiss A-Plan, Germany), χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar Plus, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Ο μέσος όρος συγκέντρωσης, που προέκυπτε μετά την επεξεργασία, κυμαινόταν περί τα 17x10⁶ σπερματοζωάρια ανά ml και στη συνέχεια το υπόστρωμα γονιμοποίησης με τα σπερματοζωάρια αραιωνόταν περαιτέρω με προσθήκη υποστρώματος

γονιμοποίησης για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 1×10^6 σπερματοζωάρια ανά ml.

In vitro γονιμοποίηση

Αμέσως μετά την 24^η ωρίμανση των ωαρίων και πριν τη διαδικασία της γονιμοποίησης, προηγούνταν η έκπλυση των COCs δύο φορές με διάλυμα PBS και δύο σε τυποποιημένο υπόστρωμα IVF. Τα COC's τοποθετούνταν σε τρυβλίο 4-βοθρίων, που περιείχε 250 μl τυποποιημένου υποστρώματος. Οι γαμέτες συν-επωάζονταν 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.

In vitro καλλιέργεια των εμβρύων

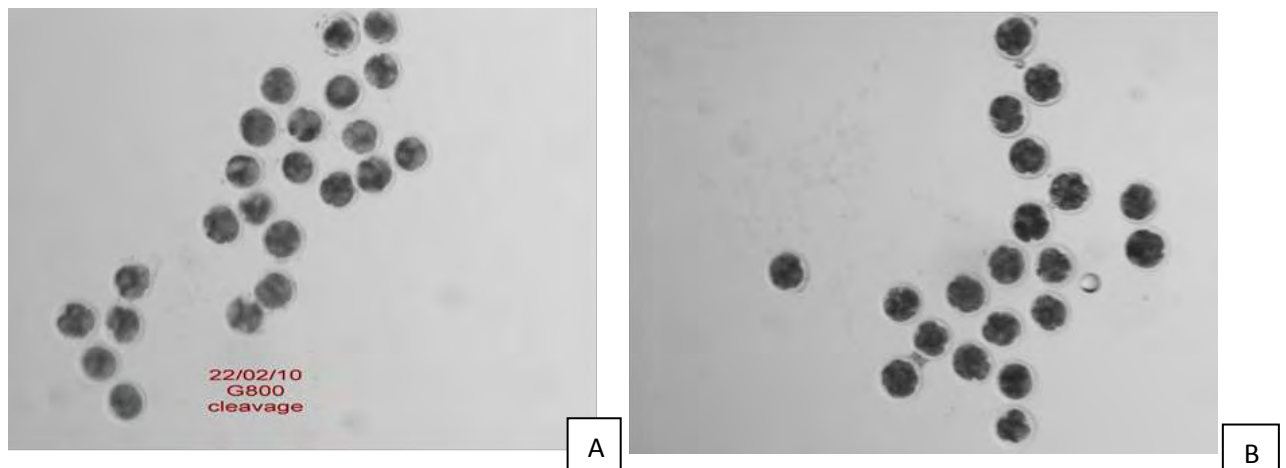
Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, όλα τα εν δυνάμει γονιμοποιημένα ωάρια (πιθανά ζυγωτά) αφαιρούνταν από το υπόστρωμα IVF και μεταφέρονταν σε φιαλίδια των 15 ml, τα οποία περιείχαν 2 ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια, γινόταν μηχανική αφαίρεση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου με ανατάραξη για 2-3 min σε ειδική 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 μl κάτω από έλαιο.

Τα τρυβλία ιστοκαλλιέργειας, που 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 μl), 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°

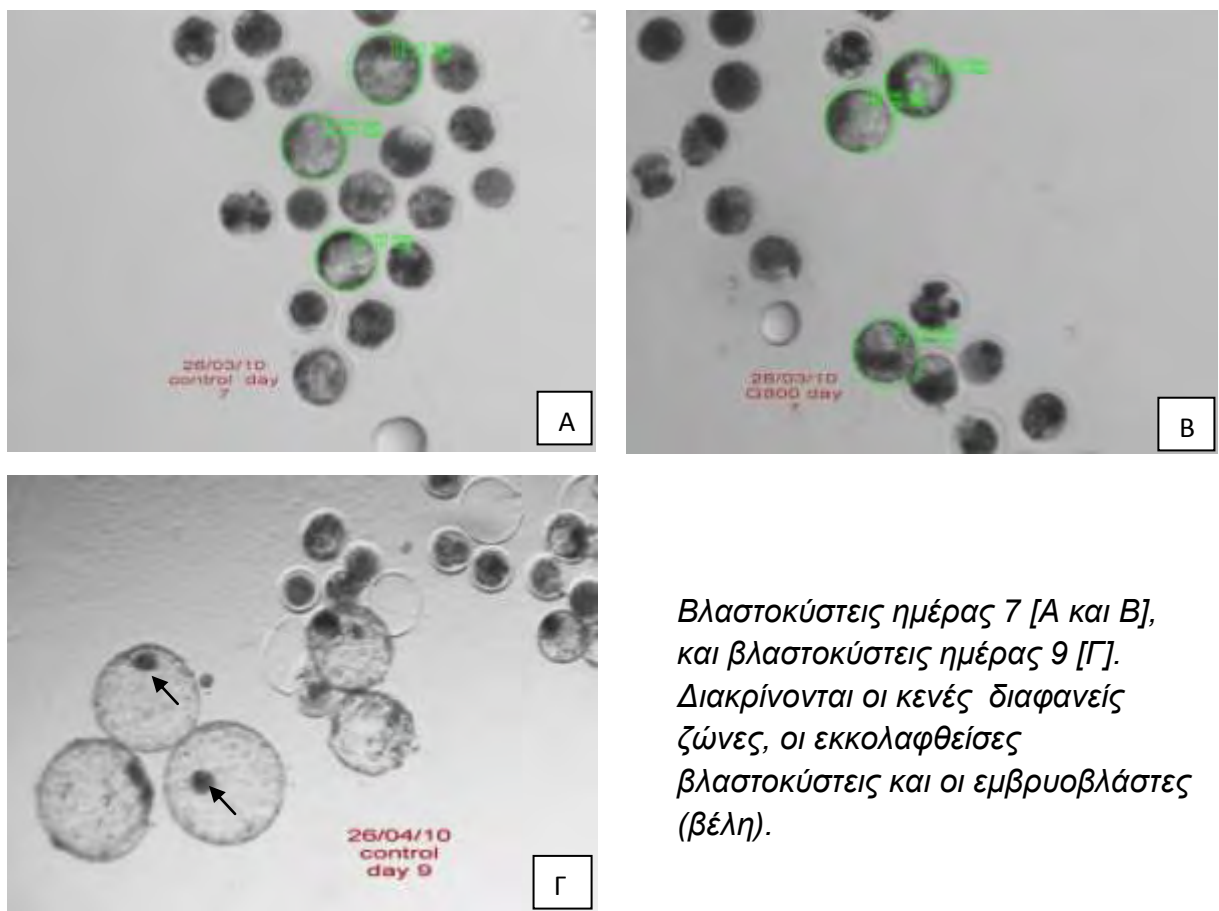
C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ και μέγιστη υγρασία. Η εκτίμηση του ποσοστού πρώιμων εμβρύων με αυλάκωση (cleavage rate) και παραγωγής βλαστοκύστεων γινόταν 48 ώρες και 7, 8, και 9 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αντίστοιχα (Εικόνες 4 και 5).

Εικόνα 4



[A] Έμβρυα μετά από 48 ώρες *in vitro* καλλιέργειας (αυλάκωση). [B] Μορίδια μετά από 72 ώρες στην IVC.

Εικόνα 5

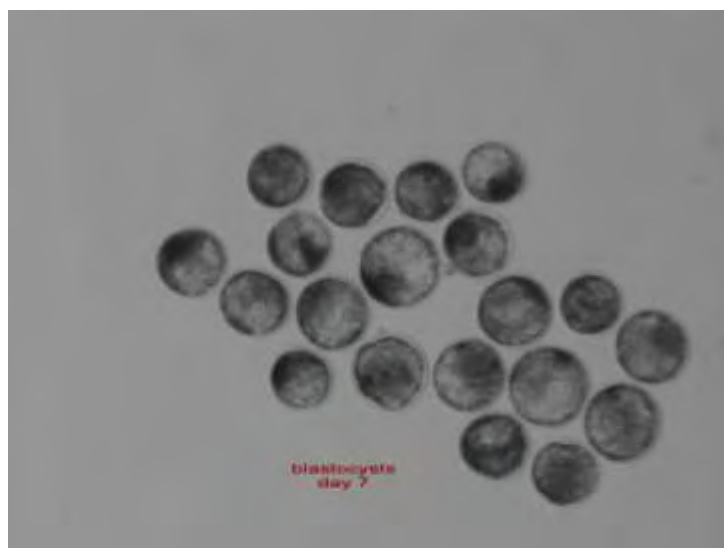


Βλαστοκύστες ημέρας 7 [A και B], και βλαστοκύστες ημέρας 9 [Γ]. Διακρίνονται οι κενές διαφανείς ζώνες, οι εκκολαφθείσες βλαστοκύστες και οι εμβρυοβλάστες (βέλη).

Ταχεία κατάψυξη και αποθήκευση ωαρίων, κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και βλαστοκύστεων για μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης

Για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ωαρίων, των αντίστοιχων κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και των παραγόμενων βλαστοκύστεων ημέρας 7, ακολουθήθηκε η διαδικασία της ταχείας κατάψυξης σε υγρό άζωτο (snap freezing) Εικόνα 6.

Εικόνα 6



Βλαστοκύστες ημέρας 7 πριν την ομαδοποίηση τους και την εμφύτευσή τους σε υγρό άζωτο

Για τη γονιδιακή ανάλυση των ωαρίων προηγούταν της ταχείας κατάψυξής τους η απογύμνωσή τους από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Η απογύμνωση γινόταν μηχανικά στο τέλος της ωρίμανσης, σε ομάδες των 10 ωαρίων, με επανελημένες διόδους των COCs μέσα από λεπτή πιπέτα χωρίς τη χρήση θρυψίνης. Τα απογυμνωμένα ωάρια στη συνέχεια μεταφέρονταν σε σταγόνα PBS (10 µl), μέσα σε erpendorf (χωρητικότητα 0.5 ml), το οποίο ταχύτατα εμφυτεύονταν σε υγρό άζωτο.

Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου μετά από φυγοκέντρηση σε 1500 rpm, για 10 min και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος καταψύχονταν με την ίδια διαδικασία.

Στην περίπτωση της κατάψυξης βλαστοκύστεων (ημέρα 7), ομάδες των 10 πρώιμων εμβρύων, παρόμοιου μεγέθους και καλής μορφολογίας, μετά την

έκπλυσή τους 3-4 φορές διαδοχικά σε διάλυμα PBS, μεταφέρονταν σε σταγόνα PBS (10 µl) σε errendorf (χωρητικότητας 0.5 ml), και εμβαπτιζόνταν σε υγρό άζωτο. Τέλος, όλα τα δείγματα διατηρούνταν σε βαθιά κατάψυξη (-80° C), έως ότου αναλυθούν.

Απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων.

Σε κάθε πειραματική ομάδα, γινόταν απομόνωση του ολικού RNA από ομάδες, βλαστοκύστεων ημέρας 7 (n=10), ώριμων ωαρίων (n=10) και κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, στο οποίο στη συνέχεια μετρήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων. Για τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, το απομονωθέν RNA ήταν το προϊόν κυττάρων που αποκολλήθηκαν από 10 COCs. Η συγκέντρωση RNA κάθε δείγματος προσδιοριζόταν με φασματοφωτομετρική μέθοδο και γινόταν ποιοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Για την απομόνωση του πολυαδενυλιωμένου mRNA, χρησιμοποιήθηκε το mRNA Direct Extraction KIT (DynaL Biotech), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αμέσως μετά την απομόνωση, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή του mRNA σε cDNA (complementary DNA), χρησιμοποιώντας το kit της Promega (Promega, Madrid, Spain). Χρησιμοποιήθηκαν poly(T) εκκινητές (oligo dT), τυχαίοι εκκινητές (random primers, εκκινητές με μικρή και τυχαία αλληλουχία) και η AMV αντίστροφη μεταγραφάση (του ιού μυελοβλαστώματος των πτηνών). Τα φιαλίδια θερμαίνονταν στους 70° C για 5 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί η δευτεροταγής δομή του RNA και στη συνέχεια προστίθεντο 5 IU (διεθνείς μονάδες κατά IUPAC) του ενζύμου Superscript RT. Για την αντίστροφη μεταγραφή, ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετούνταν στους 42° C, για 1 ώρα και τέλος στους 70° C, για 10 λεπτά, έτσι ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο. Η ποσοτικοποίηση όλων των mRNA μεταγράφων πραγματοποιείτο με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR, qRT-PCR). Για κάθε υπό μελέτη γονίδιο, οι αντιδράσεις ετοιμάστηκαν εις τριπλούν. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Rotorgene 6000 (Corbett Research, Cambridge, UK) με τη βοήθεια της χρωστικής SYBR GREEN, η οποία φθορίζει εξαιτίας της

παρεμβολής / σύνδεσης της σε δίκλωνο DNA. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης όλων των γονιδίων και την ποσοτικοποίηση αυτών, χρησιμοποιήθηκαν τα ενδογενή γονίδια της ιστόνης (*H2AFZ*) και της β ακτίνης (*ACTB*), τα επίπεδα έκφρασης των οποίων διατηρούνται σταθερά ανά κύτταρο. Κάθε αντίδραση της RT-PCR ετοιμαζόταν με την προσθήκη 2.5 μl cDNA δείγματος (ίδιας συγκέντρωσης) σε διάλυμα αντίδρασης PCR, το οποίο εκτός από τη φθορίζουσα χρωστική και το RT-PCR διάλυμα, περιείχε τους αντίστοιχους ειδικούς εκκινητές για να ενισχυθούν τα 17 υπό μελέτη γονίδια. Το πρωτόκολλο της PCR περιλάμβανε ένα αρχικό στάδιο επώασης στους 94° C (για 2 min), ακολουθούμενο από 35 κύκλους 94° C (15 sec), 56-58° C (30 sec) και 70° C (30 sec). Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω κύκλων, ακολουθούσε το πρόγραμμα για τη δημιουργία καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), το οποίο αποτελείται από διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στους 40° C για 60 sec και στη συνέχεια σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 50° στους 94° C, παραμένοντας σε κάθε στάδιο για 5 sec με παράλληλη καταγραφή των μετρήσεων του φθορισμού. Η ταυτοποίηση του προϊόντος επιβεβαιωνόταν παράλληλα με ηλεκτροφόρηση των RT-PCR προϊόντων σε 2% γέλη αγαρόζης, μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Για κάθε ζεύγος εκκινητών, μια αντίδραση που δεν περιείχε δείγμα χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρας επιμολύνσεων. Η αλληλουχία των εκκινητών και τα μεγέθη των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων όλων των μεταγράφων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι συνθήκες της PCR, που αναφέρονται παραπάνω, βελτιστοποιήθηκαν προκειμένου η απόδοση της ενίσχυσης της μεθόδου να πλησιάζει στο 100% και οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των τροποποιημένων ή μη δειγμάτων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της συγκριτικής μεθόδου 2- $\Delta\Delta C_t$. Οι συνθήκες της PCR βελτιστοποιήθηκαν έτσι ώστε να επιτευχθεί αποδοτικότητα κοντά στο 1 και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος που συγκρίνει τα όρια του κάθε κύκλου προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης. Ο φθορισμός μετρήθηκε σε κάθε κύκλο για να οριστεί το όριο του κύκλου ή ο κύκλος, κατά τη διάρκεια του οποίου ο φθορισμός αυξάνεται σημαντικά πάνω από το όριο ανίχνευσης. Σύμφωνα με τη συγκριτική C_T μέθοδο, η ΔC_T τιμή καθορίστηκε με αφαίρεση της *H2AFZ* C_T τιμής για κάθε δείγμα και για κάθε C_T τιμή κάθε γονιδίου. Ο υπολογισμός του $\Delta\Delta C_T$ έγινε χρησιμοποιώντας την

υψηλότερη τιμή ΔCT (για παράδειγμα το δείγμα με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης), ως μια αυθαίρετη σταθερά η οποία αφαιρούνταν από όλες τις τιμές ΔCT όλων των δειγμάτων. Οι διαφορές στα σχετικά επίπεδα έκφρασης προσδιορίσθηκε με τη βοήθεια της μεθοδολογίας 2- $\Delta\Delta CT$.

Πίνακας 1 Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για τη *real time PCR* και μέγεθος προϊόντος

Σύμβολο	Επίσημο όνομα (κατά MGI)	Αλληλουχία εκκινητών (5' – 3')	Μέγεθος	Κωδικός πρόσβασης
ACTB	Actin, beta	GAGAAGCTCTGCTACGTGG CCGGACAGCACCGTGTGG	263	BC142413.1
H2AFZ	H2A histone family, member Z	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209	H2A histone family, member Z
BAX	BCL2-associated X protein	CTACTTTGCCAGCAAACCTGG TCCCAAAGTAGGAGAGGA	158	NM_173894.1
SOD2	Superoxide dismutase 2	GCTTACAGATTGCTGCTTGT AAGGTAATAAGCATGCTCCC	101	S67818.1
GPX1	Glutathione peroxidase 1	GCAACCAGTTTGGGCATCA CTCGCACTTTTGAAGAGCATA	116	NM_174076.3
GADPH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	ACCCAGAAGACTGTGGATGG AYGCCTGCTTACCACCTTC	247	BC102589
SCL2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	CTGATCCTGGGTCGCTTCAT ACGTACATGGGCACAAAACCA	168	NM_174602.2
H6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	TTGCGGCCGCCGTCTCTATGTG GCCMGGCTTCTTGGTCATCATC	220	XM_583628
LDHA	Lactate dehydrogenase A	TTCTTAAGGAAGAACATGTC, TTCACGTTACGCTGGACCAA	310	NM_174099.2
CCNB1	M-phase promoting factor subunit Cyclin B1	TGGGTCGCCCTCTACCCCTGC AGATGTGGCATACTTGTCTTGATA GTCA	332	NM_001045872
COX-2	Prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2)	ATCTACCCGCCTCATGTTCTT GGATTAGCCTGCTTGTCTGGA	187	AF031698
GREM1	Gremlin	AACAGCCGTACCATCATCAAC TTCAGGACAGTTGAGAGTGACC	156	NM_001082450
IGF2R	insulin-like growth factor receptor 2	GCTGCGGTGTGCCAAGTGAAAAAG AGCCCCTCTGCCGTTGTTACCT	201	NM_174352.2
DNMT3A	DNA cytosine-5- methyltransferase 3 alpha	CTGGTGCTGAAGGACTTGGGC CAGAAGAAGGGGCGGTCATC	318	XM_001252215.1
AKR1B1	Aldo-keto-reductase family1-member1	CGTGATCCCCAAGTCAGTGA AATCCCTGTGGGAGGCACA	152	M31463.1
PLAC8	Placenta-specific 8	CGGTGTTCCAGAGGTTTTTCC AAGATGCCAGTCTGCCAGTCA	163	NM_016619
SLC2A5	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5	AGTCATCTCCATCATCGTCCT GTACCCGCCACCATGTAGGCAG	531	AF308830

Σύντομες γενικές πληροφορίες για τα γονίδια που μελετήθηκαν.

- 1) *BAX*: (Bcl-2-Associated X protein): είναι ένα προαποπτωτικό γονίδιο, που εκφράζεται σε όλη την προεμφυτευτική περίοδο της ανάπτυξης. Αποτελεί ένδειξη κακής ποιότητας εμβρύων, ως ανταγωνιζόμενο την αντι-αποπτωτική Bcl-2 (Gutierrez-Adan et al 2004).
- 2) *SOD2* ή *MnSOD* (υπεροξειδάση της δισμουτάσης 2): καταλύει τη μετατροπή του $H_2O_2^-$ σε H_2O και μοριακό οξυγόνο και είναι ενδεικτικό αυξημένης λειτουργίας των μιτοχονδρίων και αντιοξειδωτικής προστασίας. Έχει ουσιώδη ρόλο τόσο στην προστασία των εμβρύων από οξειδωτικές βλάβες όσο και στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στο σχηματισμό του μοριδίου (Iwata et al 1998, Lonergan et al 2003, Gutierrez-Adan et al 2004).
- 3) *GPX1* (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης): χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη για να εξουδετερώσει τα υπεροξειδία του υδρογόνου και τα λιπιδικά υπεροξειδία (Lonergan et al 2003).
- 4) *GAPDH* (δεϋδρογονάση της γλυκεραλδεύδης): είναι υπεύθυνη για την κατάλυση του έκτου σταδίου της γλυκόλυσης και συμμετέχει σε αρκετές μη μεταβολικές διεργασίες, όπως η ενεργοποίηση της μεταγραφής και η έναρξη της απόπτωσης (Wrenzycki et al 1998).
- 5) *SLC2A1* (διευκολυντής μεταφοράς γλυκόζης/ φρουκτόζης-1 ή *GLUT1*): αποτελεί έναν κλασσικό δείκτη κυτταρικού στρες (το στρες προκαλεί συσσώρευση του μεταφορέα γλυκόζης στην επιφάνεια των κυττάρων). Αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης καθώς και αυξημένες συγκεντρώσεις ROS προκαλούν υπερέκφραση του γονιδίου (Wrenzycki et al 1998, Van Hoeck et al 2011).
- 6) *G6PD* (δεϋδρογονάση της 3 φωσφορικής γλυκόζης): καταλύει το πρώτο και μη αντιστρεπτό στάδιο της γλυκόλυσης μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης. Λειτουργεί ως αισθητήρας των κυττάρων για το οξειδωτικό στρες. Η υπερέκφραση του γονιδίου συνδέεται με αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και αυξημένη αναερόβια γλυκόλυση (Lonergan et al 2003).

- 7) LDHA (γαλακτική δεϋδρογενάση): καταλύει τη μετατροπή του πυρουβικού οξέος σε γαλακτικό και αντιστρόφως και είναι ενδεικτικό αναερόβιας γλυκόλυσης (Bermejo-Alvarez et al 2010).
- 8) *CCNB1* ή *Cyclin B1* (κυκλίνη B1): αποτελεί τμήμα του παράγοντα προαγωγής της ωρίμανσης των ωαρίων και η έναρξη της μεταγραφής της σηματοδοτεί την έναρξη της μειωτικής διαίρεσης (Lonergan et al 2003, Tremblay et al 2005).
- 9) *COX2* ή *PTGS2* (κυκλοοξυγενάση 2 ή ενδοπεροξειδάση των προσταγλανδινών): σχετίζεται με την διάταση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και η έκφρασή του εξαρτάται από τη διάρκεια της ωρίμανσης και την ποιότητα του ωαρίου (Nuttinck et al 2002, Vigneron et al 2003, McKenzie et al 2004, Yamashita et al 2011).
- 10) *GREM1* (γκρεμλίνη 1): είναι ανταγωνιστής της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP, bone morphogenic protein). Η έκφρασή του στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των ωαρίων, τόσο των βοοειδών όσο και του ανθρώπου, σχετίζεται θετικά με την ωρίμανση του ωαρίου, τη γονιμοποίηση και την ποιότητα του εμβρύου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της IVF (Assidi et al 2008, Bermejo-Alvarez et al 2010).
- 11) *IGF2R* (υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης 2): είναι ένα γονίδιο μητρικής προέλευσης, του οποίου η υπερέκφραση προκαλεί διαταραχές στην εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου. Η θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου και τη μορφολογία των εμβρύων, το καθιστά δείκτη βιωσιμότητας των *in vitro* εμβρύων (Warzych et al 2007, Bermejo-Alvarez et al 2010).
- 12) *DNMT3A*: είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την DNA μεθυλτρανσφεράση. Στα πρώιμα έμβρυα εμφανίζεται μια ραγδαία αύξηση της μεθυλίωσης του DNA, η έκφραση της οποίας αποτελεί ένδειξη επιγενετικών φαινομένων. Υπερέκφραση του γονιδίου σχετίζεται με την εμφάνιση του large offspring syndrome, υποέκφραση με τη γέννηση βιώσιμων απογόνων, ενώ η απενεργοποίηση του με πρώιμους εμβρυικούς θανάτους (Okano et al 1999, Wrenzycki et al 2007).

- 13) *AKR1B1* (αναγωγή της αλδόζης-κετόζης της 1 οικογένειας): η έκφρασή του έχει συνδεθεί αρνητικά με την πιθανότητα να γεννηθούν ζωντανά μοσχάρια από τα έμβρυα (El-Sayed et al 2006).
- 14) *PLAC8* (το ειδικό γονίδιο του πλακούντα- 8): η έκφρασή του έχει συνδεθεί θετικά με την ανάπτυξη του πλακούντα, την εγκατάσταση του κυήματος και με την πιθανότητα να γεννηθούν βιώσιμα μοσχάρια (El-Sayed et al 2006).
- 15) *SLC2A5* (διευκολυντής μεταφοράς γλυκόζης / φρουκτόζης – μέλος 5 ή *GLUT5*): συσχετίζεται με τον μεταβολισμό των εμβρύων (Van Hoek et al 2011).

Στατιστική ανάλυση

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο στατιστικής ανάλυσης SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Η ανάλυση για τα ποσοστά αυλάκωσης και σχηματισμού βλαστοκύστεων έγινε με μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης με πολλαπλές μετρήσεις. Στις περιπτώσεις, που η δοκιμή έδειχνε ανομοιογένεια, γίνονταν οι κατάλληλοι μετασχηματισμοί των τιμών (arcsine transformation). Για τις συγκρίσεις στην έκφραση των γονιδίων, προκειμένου να αξιολογηθεί ο βαθμός επίδρασης του χρόνου και της συγκέντρωσης της ουσίας, που χρησιμοποιήθηκε στους διάφορους πειραματισμούς, χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης με πολλαπλές κατά ζεύγη συγκρίσεις. Όταν με τη μέθοδο αυτή δεν εντοπιζόνταν αλληλεπιδράσεις, τα αποτελέσματα εξετάζονταν με μονοπαραγοντική ανάλυση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Student-Newman-Kleus με πολλαπλές κατά ζεύγη συγκρίσεις (post-hoc). Σε όλες τις περιπτώσεις το όριο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05. Εκτός και αν διευκρινίζεται διαφορετικά, όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (SEM).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Επίδραση του γουαΐαζουλενίου στην εξωσωματική παραγωγή και στην ποιότητα εμβρύων βοοειδών

Το Γουαΐαζουλένιο

Το Guaiiazulene –(1,4-διμέθυλ-7-ισοπρόπυλαζουλένιο)- είναι ένα βασικό συστατικό του εκχυλίσματος διαφόρων ειδών χαμομηλιού [*Guajacum officinale* (Zygophyllaceae), *Marticaria chamomilla* (Asteraceae)]. Είναι μία ισχυρά λιπόφιλη, μη τοξική ουσία, ευρέως διαδεδομένη στη φύση (Rekka et al 2002). Στον άνθρωπο, η ουσία έχει αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές και αντιελκωτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στην ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση (Yanasigawa et al. 1990). Ως αντιοξειδωτικό έχει βρεθεί ότι μπορεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες του OH^\cdot και να αδρανοποιήσει τις υπεροξειδικές και αλκοξειδικές ρίζες, εμποδίζοντας έτσι *in vitro* την λιπιδική υπεροξειδωση των μικροσωμιακών μεμβρανών του ήπατος του επίμυος. Η επαγόμενη από το γουαΐαζουλένιο διατήρηση υψηλών επιπέδων γλουταθειόνης στα κύτταρα πιστεύεται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το γουαΐαζουλένιο προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα από την προκαλούμενη από το οξειδωτικό στρες καταστροφή τους (Kourounakis et al 1997). Η ικανότητα του γουαΐαζουλενίου να εξουδετερώνει τις ρίζες του OH^\cdot είναι παρόμοια ή και ισχυρότερη από αντιοξειδωτικά αναφοράς –όπως η μανιτόλη (Kourounakis et al 1997).

Σε προηγούμενη μελέτη που έγινε στη Μαιευτική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ, βρέθηκε ότι το γουαΐαζουλένιο ευνόησε την ωρίμανση των

ωαρίων, τη γονιμοποίηση τους, και βελτίωσε το ποσοστό αυλάκωσης των πρώιμων εμβρύων βοοειδών (Dimitriadis et al 2006, Dimitriadis 2007). Οι μελέτες αυτές έγιναν σε περιβάλλον, που ευνοούσε την οξειδωση (συγκέντρωση οξυγόνου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας 10%) και όλα τα πειράματα τερματίζονταν μετά από 48 ώρες καλλιέργειας των εμβρύων.

Ο Dimitriadis (2006) στις ίδιες έρευνες μετά από συστηματική μελέτη της αντιοξειδωτικής προστασίας, που παρέχουν το ωοθυλακικό υγρό και το υγρό του ωαγωγού, προσδιόρισε επακριβώς τη συγκέντρωση του γουαϊαζουλενίου, η οποία όταν ενσωματώνεται στα υποστρώματα παρέχει τελική αντιοξειδωτική προστασία στο υπόστρωμα, αντίστοιχη με αυτή του *in vivo* περιβάλλοντος. Στην παρούσα μελέτη, διατηρώντας τις ίδιες συγκεντρώσεις, καταβλήθηκε η προσπάθεια να διερευνηθεί εάν το γουαϊαζουλένιο μπορεί να ευνοήσει την παραγωγή βλαστοκύστεων και να βελτιώσει την ποιότητά τους κάτω από συνθήκες, που θεωρητικά δεν ευνοούν την αύξηση των ROS.

Η τεκμηριωμένη γνώση ότι οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ROS, κατά τη διάρκεια της IVF, ευνοούν την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και υποστηρίζουν αποτελεσματικά τη συγχώνευση του ωαρίου με το σπερματοζώαριο (Aitken et al. 1996, Blondin et al 1997, Ali et al 2003) μας οδήγησε στην απόφαση να μην τροποποιήσουμε το υπόστρωμα της IVF με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού. Οι πειραματισμοί που περιγράφονται στο Κεφάλαιο αυτό αποσκοπούν στο να διασαφηνίσουν τον πιθανό ρόλο ενός αποκλειστικά εξωγενούς αντιοξειδωτικού στην απόδοση σε έμβρυα της IVP και στην ποιότητα των παραγόμενων βλαστοκύστεων.

Υλικά και Μέθοδοι

Ως ισχυρά λιπόφιλη ουσία το γουαϊαζουλένιο διαλύθηκε σε οργανικό διαλύτη, διμεθυλσουλφοξειδίο (DMSO), το οποίο αποτελούσε μέρος των υποστρωμάτων σε συγκέντρωση 0.05%.

Η μέθοδοι και οι συνθήκες παραγωγής εμβρύων και ανάλυσης των αποτελεσμάτων είναι αυτές, που περιγράφονται στο Κεφάλαιο II της παρούσας διατριβής.

Πειραματικός σχεδιασμός

Πείραμα 1

Ο στόχος του πειραματισμού αυτού ήταν να εκτιμηθεί η επίδραση της αυξημένης αντιοξειδωτικής προστασίας των ωαρίων από το υπόστρωμα της IVM μετά την προσθήκη γουαΐαζουλενίου σε αυτό, στο ποσοστό απόδοσης της IVC σε βλαστοκύστες και στην ποιότητά τους. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 1891 COCs τα οποία κατανεμήθηκαν σε 4 ομάδες: Μάρτυρες, n=459· Μάρτυρες + (DMSO) n=467· G0.01, n=468, με προσθήκη γουαΐαζουλενίου σε συγκέντρωση 0.01 mM και G0.1, n=497, με προσθήκη γουαΐαζουλενίου 0.1mM. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 6 πειραματικές επαναλήψεις.

Πείραμα 2

Ο σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να διερευνηθεί ο βαθμός επίδρασης του γουαΐαζουλενίου στο ποσοστό απόδοσης σε βλαστοκύστες και στην ποιότητά τους, όταν αυτό προστίθεται στο υπόστρωμα καλλιέργειας εμβρύων (IVC). Σε έξι επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν 1391 COCs κατανεμημένα σε 4 ομάδες : Μάρτυρες, n=355· μάρτυρες +, n=347· G0.01, n=344, με προσθήκη γουαΐαζουλενίου σε συγκέντρωση 0.01mM και G 0.1mM, n=345, με προσθήκη γουαΐαζουλενίου 0.1mM.

Σε βλαστοκύστες της ημέρας 7, που προέκυψαν και από τους δυο πειραματισμούς, αναλύθηκε η σχετική αφθονία του mRNA (relative mRNA abundance) των γονιδίων *H2AFZ*, *AKR1B1*, *PLAC8*, *SLC2A5*, *G6PD*, *PTGS2*, *GPX1*, και *GAPDH*. Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιήθηκαν για τους μοριακούς προσδιορισμούς, περιγράφονται στο αντίστοιχο Τμήμα του Κεφαλαίου II και στο Παράρτημα.

Αποτελέσματα

Πείραμα 1

Μεταξύ των τεσσάρων ομάδων, δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά αυλάκωσης (Μάρτυρες 74.20%, Μάρτυρες + 74.58%,

G0.01mM 71.67%, 0.1mM 71.63%). Ομοίως, την ημέρα 9, το ποσοστό δημιουργίας βλαστοκύστεων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων (Μάρτυρες 28.26%, Μάρτυρες + 25.80%, G0.01mM 25.86%, 0.1mM 25.86%). Τα αναλυτικά αποτελέσματα, που αφορούν συνολικά στα ποσοστά εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Τα αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των γονιδιακών εκφράσεων έδειξαν μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των ομάδων, όμως οι διαφορές δεν ήταν σε καμία περίπτωση στατιστικά σημαντικές. Στο Γράφημα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των 7 γονιδίων.

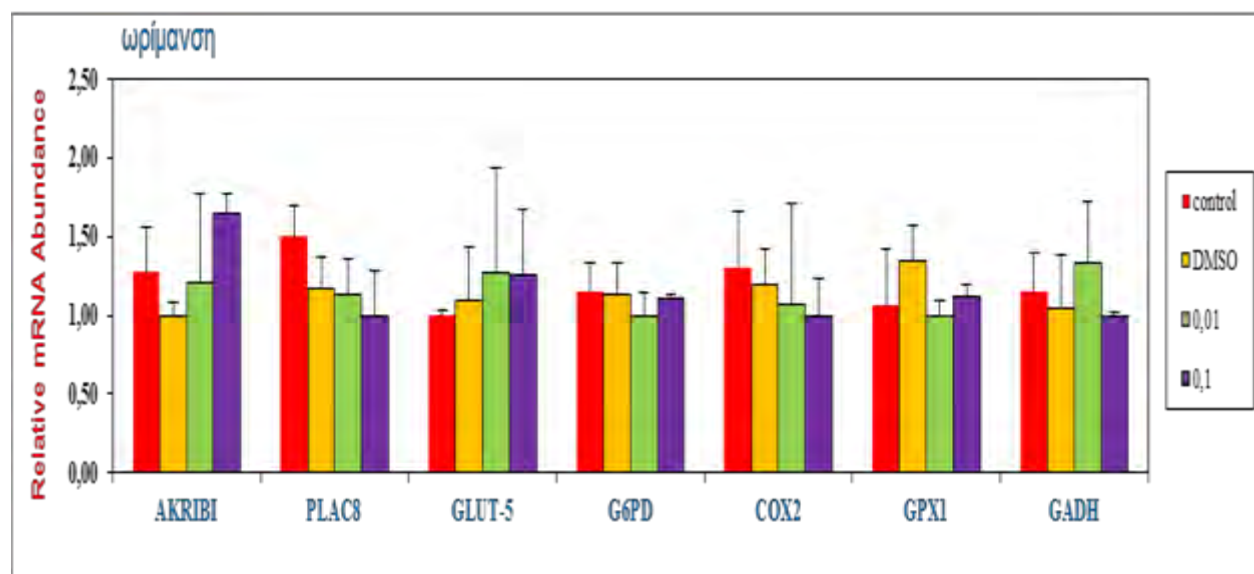
Πίνακας 2

Αποτελέσματα της τροποποίησης του υποστρώματος εξωσωματικής ωρίμανσης (IVM) ωαρίων με προσθήκη γουαϊαζουλενίου. Τα αποτελέσματα αφορούν σε 6 επαναλήψεις και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα.

	N COCs	αυλάκωση n %	Απόδοση σε βλαστοκύστες			
			Ημ 6	Ημ 7	Ημ 8	Ημ 9
			n %	n %	n %	n %
Μάρτυρες	459	344 74.20 \pm 2.32	16 5.54 \pm 1.73	102 22.86 \pm 2.00	122 27.38 \pm 2.23	127 28.26 \pm 2.64
Μάρτυρες + (DMSO)	467	351 74.58 \pm 2.42	23 5.20 \pm 1.80	98 20.88 \pm 2.73	118 25.22 \pm 2.91	121 25.80 \pm 3.09
0.01mM	468	345 71.61 \pm 3.71	26 5.89 \pm 2.21	95 20.33 \pm 2.98	117 25.22 \pm 3.44	121 25.86 \pm 3.58
0.1mM	497	353 71.63 \pm 1.49	17 4.08 \pm 1.46	91 17.45 \pm 3.29	119 24.11 \pm 3.57	123 25.25 \pm 3.75

Γράφημα 1

Ποσοτικός προσδιορισμός με χρήση rRT-PCR της έκφρασης 7 γονιδίων μετά από τροποποίηση του υποστρώματος ωρίμανσης ωαρίων με 2 συγκεντρώσεις γουαϊαζουλενίου. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ομάδων: μάρτυρες, μάρτυρες+ (DMSO), 0.01mM και 0.1mM.



Πείραμα 2

Τα ποσοστά αυλάκωσης στην ομάδα G0.01mM (77.87%) έτειναν ($p=0.07$) να είναι υψηλότερα αυτών της ομάδας του μάρτυρα (71.41%). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα ποσοστά αυλάκωσης μεταξύ των υπολοίπων ομάδων (μάρτυρες+ 71.32%, 0.01mM 72.75%). Τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων την ημέρα 9 ήταν: μάρτυρες 25.50%, μάρτυρες+ 26.71%, 0.01mM 29.58%, και 0.1mM 25.75%. Τα συνολικά αποτελέσματα αναφορικά με τα ποσοστά παραγωγής εμβρύων μετά από τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Οι γονιδιακές εκφράσεις παρουσίασαν διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων, όμως οι διαφορές αυτές δεν ήταν σε καμία περίπτωση στατιστικά σημαντικές. Αναλυτικά τα αποτελέσματα επί του ποσοτικού προσδιορισμού έκφρασης των 7 γονιδίων, παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.

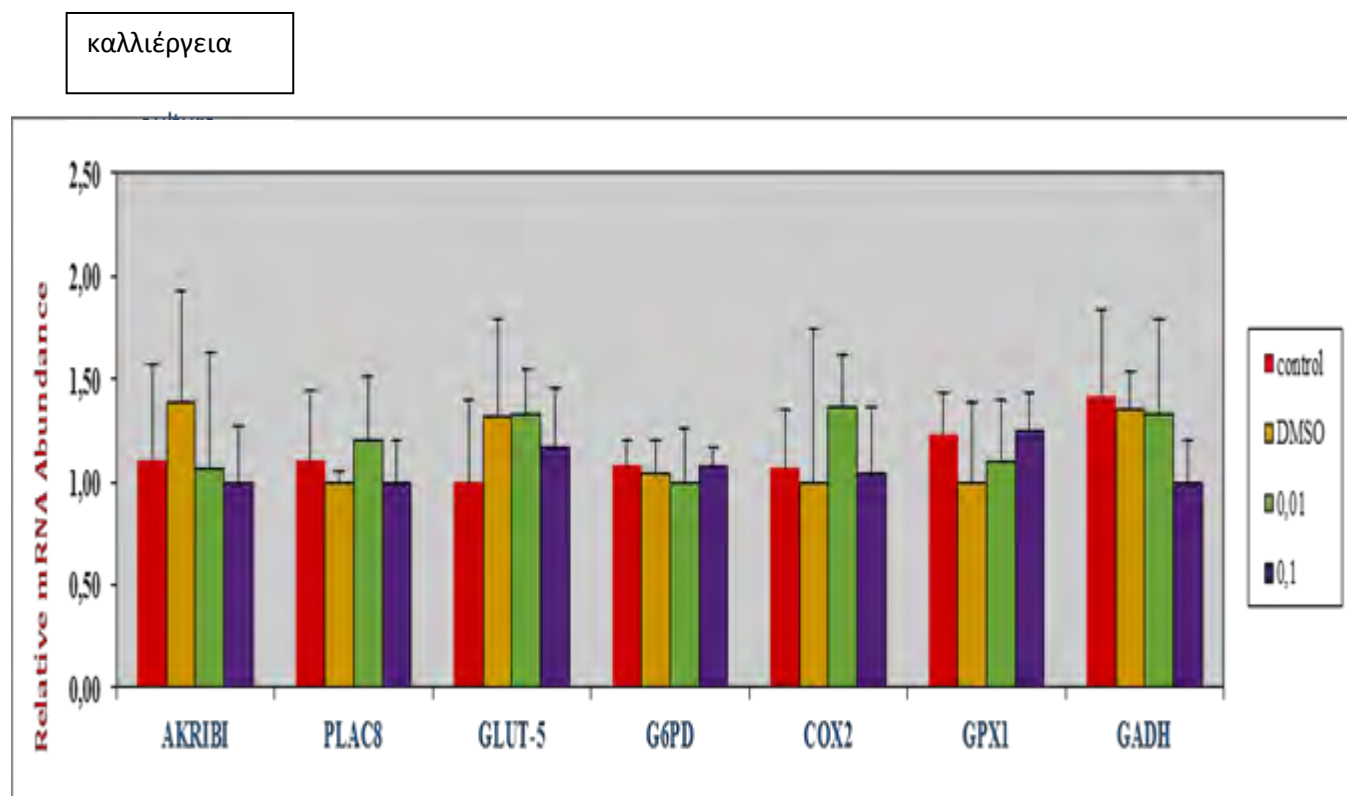
Πίνακας 3

Αποτελέσματα της τροποποίησης του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων με προσθήκη γουαϊαζουλενίου. Τα αποτελέσματα αφορούν σε 6 επαναλήψεις και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα.

		Απόδοση σε βλαστοκύστες				
		αυλάκωση	Ημ 6	Ημ 7	Ημ 8	Ημ 9
N COCs		n	n	n	n	n
		%	%	%	%	%
Μάρτυρες	355	253	15	60	85	92
		71.41 \pm 2.97	3.99 \pm 0.83	16.04 \pm 2.42	23.50 \pm 1.15	25.50 \pm 1.20
Μάρτυρες + (DMSO)	347	247	15	68	83	93
		71.32 \pm 1.23	4.64 \pm 2.28	19.49 \pm 4.24	23.90 \pm 4.18	26.71 \pm 4.84
0.01mM	345	267	19	73	99	104
		77.87 \pm 1.97	5.48 \pm 0.97	21.04 \pm 1.76	28.36 \pm 2.30	29.58 \pm 2.86
0.1mM	344	251	7	63	86	92
		72.75 \pm 1.59	2.10 \pm 0.28	17.90 \pm 1.86	24.39 \pm 2.16	25.75 \pm 2.99

Γράφημα 2

Ποσοτικός προσδιορισμός με χρήση rRT-PCR της έκφρασης 7 γονιδίων μετά από τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων με 2 συγκεντρώσεις γουαϊαζουλενίου. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ομάδων: μάρτυρες, μάρτυρες+ (DMSO), 0.01mM, και 0.1mM.



Συζήτηση

Σε κάθε λειτουργικά ισορροπημένο κυτταρικό σύστημα, οι ROS, οι οποίες παράγονται διαρκώς ως αναπόφευκτο (υπο) προϊόν του μεταβολισμού και τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διατηρούνται σε ισορροπία, η οποία διασφαλίζει την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος. Διαταραχή αυτής της ισορροπίας υπέρ των ROS, ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγής ή / και αδυναμίας των ενδογενών αντιοξειδωτικών να προλάβουν την σύνθεση τους ή να τις εξουδετερώσουν, οδηγεί στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες, που επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργικότητα των διαφόρων συστημάτων. Από πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της IVP το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμπεριληφθεί ως μια από τις βασικές αιτίες για την αδυναμία εξέλιξης ενός μεγάλου ποσοστού εμβρύων (de Matos et al 1995, Dalvit et al 2005a,b).

Το DMSO χρησιμοποιείται αρκετά συχνά ως διαλύτης ουσιών με μηδενική διαλυτότητα στο νερό. Σε μικρές συγκεντρώσεις, έχει χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης φαρμακευτικών ουσιών, που στη συνέχεια ενσωματώνονται σε υποστρώματα καλλιέργειας, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (12-25%) χρησιμοποιείται στην κατάψυξη ωαρίων και εμβρύων ως κρυοπροστατευτικό (Vajta et al 1998). Το 2000, οι Avere and Greve γνωρίζοντας ότι υψηλές συγκεντρώσεις DMSO είναι επιβλαβείς για τα έμβρυα, προσπάθησαν να καθορίσουν τα ασφαλή όρια χρήσης του στην IVP. Τα αποτελέσματα της έρευνας τους έδειξαν ότι προσθήκη στο υπόστρωμα ωρίμανσης ωαρίων σε ποσοστό $\leq 1\%$ δεν επηρεάζει την ωρίμανση των ωαρίων ή την αυλάκωση των εμβρύων, ενώ η παραγωγή βλαστοκύστεων επηρεάζεται αρνητικά και γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση του DMSO. Το όριο ασφαλείας με βάση τα παραπάνω καθορίστηκε από τους συγγραφείς σε συγκεντρώσεις $\leq 0,5\%$, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας.

Κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων, το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι επηρεάζει αρνητικά τα ωάρια εξαιτίας εκτεταμένης υπεροξειδωσής στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία τελικά οδηγεί σε διαταραχές στη σύνθεση διαφόρων κυτταρικών μακρομορίων, όπως των νουκλεϊκών οξέων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Halliwell and Gutteridge

1990a&b). Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού εξασφάλιζε την αντιοξειδωτική προστασία, που παρέχει το ωοθυλακικό περιβάλλον στην προ-ωοθυλακιορρηκτική περίοδο (Dimitriadis 2006). Η χρήση του γουαϊαζουλενίου, το οποίο είναι ένα λιπόφιλο αντιοξειδωτικό, ακόμη και σε συγκεντρώσεις που παρείχαν 10 φορές μεγαλύτερη προστασία από το *in vivo* περιβάλλον, αποδείχθηκε αναποτελεσματικό στο να βελτιώσει την εξελικτική ικανότητα των ωαρίων, το ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων, ή την ποιότητα τους, όπως αυτή εκτιμήθηκε σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

Σε αρκετές μελέτες, αναφέρεται ευεργετική επίδραση της προσθήκης αντιοξειδωτικών στο υπόστρωμα ωρίμανσης των ωαρίων, αποτιμώμενη από την αύξηση του ποσοστού σχηματισμού βλαστοκύστεων. Έτσι, θετική δράση έχει αποδοθεί στην κυστεαμίνη (de Matos et al 1995, 1996), στην κυστεΐνη (de Matos and Furnus 2000, Ali et al 2003), και στη ρετινόλη (Livingston et al 2004). Θα πρέπει όμως να τονισθεί ότι όλες αυτές οι ουσίες είναι ενδογενή συστατικά, τα οποία πέραν της αντιοξειδωτικής τους δράσης, έχουν επιπροσθέτως και άλλες βιολογικές ιδιότητες οι οποίες μπορεί να επηρέασαν την ικανότητα εξέλιξης των ωαρίων. Άλλες όμως μελέτες, με τις οποίες βρίσκονται σε συμφωνία τα αποτελέσματά μας, απέτυχαν να τεκμηριώσουν θετική συσχέτιση μεταξύ της προσθήκης αντιοξειδωτικών στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης και του ποσοστού παραγωγής εμβρύων. Έχει διαπιστωθεί ότι η προσθήκη N-ακετυλκυστεΐνης, καταλάσης και δισμουτάσης (Ali et al 2003), ατοκοφερόλης, ή ασκορβικού οξέος (Dalvit et al 2005a) στο υπόστρωμα ωρίμανσης δεν είχαν κάποια επίδραση στα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων, ενώ ο συνδυασμός τοκοφερόλης και ασκορβικού οξέως, ο οποίος κατ' υπολογισμό παρείχε ισχυρότερη αντιοξειδωτική προστασία από το κάθε ένα συστατικό χωριστά, προκάλεσε σημαντική μείωση στα ποσοστά παραγωγής εμβρύων (Dalvit et al 2005a,b). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της IVM, ελεγχόμενες συγκεντρώσεις κάποιων λιγότερο επιβλαβών ROS, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου που επάγονται από το σύστημα υποξανθίνης-ξανθίνης, μπορεί να έχουν ευεργετική επίδραση στα ωάρια, καθιστώντας τα περισσότερο ικανά για περαιτέρω εξέλιξη (Boldin et al 1997)

Είναι γνωστό, ότι κατάλληλα ποσά ROS κατά τη διάρκεια της IVF υποστηρίζουν αποτελεσματικά και ευνοούν την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και τη συγχώνευση του ωαρίου με το σπερματοζωάριο (Aitken et al 1996, Blondin et al 1997, Ali et al 2003). Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη, αποφασίσθηκε να μην τροποποιηθεί το υπόστρωμα της *in vitro* γονιμοποίησης με την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών.

Η προσθήκη του γουαϊαζουλενίου σε συγκέντρωση 0.01mM στο υπόστρωμα καλλιέργειας, η οποία εξασφαλίζει αντιοξειδωτική προστασία αντίστοιχη με αυτή που παρέχει *in vivo* το περιβάλλον του ωαγωγού (Dimitriadis 2006), οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού αυλάκωσης των εμβρύων ($p=0.07$). Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεκαπλάσιας συγκέντρωσης γουαϊαζουλενίου δεν διέφεραν από αυτά των μαρτύρων. Αντιστρόφως, δοσοεξαρτώμενη δράση έχει παρατηρηθεί όταν ενδογενείς βιταμίνες (C και E) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιοξειδωτικά στην ανάπτυξη εμβρύων ποντικού. Συγκεκριμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις και οι δύο βιταμίνες δεν επηρέασαν τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων, σε υψηλότερες όμως (200 έως 800 μmol) ήταν εμβρυοτοξικές, αλλά ο συνδυασμός τους αντέστρεψε αποτελεσματικά την εμβρυοτοξικότητα, που προκλήθηκε από εξωγενείς παράγοντες (Wang et al 2002).

Είναι γνωστό, ότι η ευαισθησία των πρώιμων εμβρύων στο οξειδωτικό στρες είναι ανάλογη του σταδίου, στο οποίο βρίσκονται, με τη μεγαλύτερη ευαισθησία να εμφανίζεται στο στάδιο του ζυγωτού και της βλαστοκύστης, ενώ τα έμβρυα 8-16 κυττάρων δείχνουν τη μεγαλύτερη αντοχή (Van Langendonck et al 1998). Κατά συνέπεια, τα αυξημένα ποσοστά αυλάκωσης θα μπορούσαν να ερμηνευτούν με βάση την υπόθεση ότι στο τροποποιημένο υπόστρωμα της καλλιέργειας των εμβρύων, το γουαϊαζουλένιο διαπέρασε τις κυτταρικές μεμβράνες και εξουδετέρωσε τις ενδοκυτταρικά δημιουργημένες ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας από την οξειδωτική βλάβη τα ενδοκυτταρικά μακρομόρια. Με αυτό τον τρόπο, υποθέτουμε ότι το γουαϊαζουλένιο προστάτεψε τα πρώιμα έμβρυα από πιθανές βλάβες των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες επάγονται εξαιτίας κατακερματισμού του DNA (fragmentation) και των μεταβολών στα μιτοχόνδρια. Είναι γνωστό, ότι οι βλάβες αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε καθυστερημένη ανάπτυξη, σε μεταβολικές διαταραχές και σε εμφάνιση πρόωρης απόπτωσης (Halliwell and Aruoma 1991, Halliwell and Chirico 1993, Guerin et

al 2001). Έχει διαπιστωθεί ότι το γουαϊαζουλένιο, διατηρώντας υψηλά τα επίπεδα γλουταθειόνης, προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα των αρουραίων από την επαγόμενη καταστροφή τους εξαιτίας του προκληθέντος οξειδωτικού στρες (Kourounakis et al 1997). Η γλουταθειόνη είναι μία μη πρωτεϊνικής φύσης ουσία, με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων των θηλαστικών από την οξείδωση (Meister and Tate 1976). Εξάντληση των αποθεμάτων γλουταθειόνης προκαλεί συσσώρευση H_2O_2 και καταστροφή του DNA στα πρώιμα έμβρυα των βοοειδών (Takahashi et al 1993). Υποθέτουμε λοιπόν, ότι το γουαϊαζουλένιο διατήρησε υψηλή συγκέντρωση γλουταθειόνης κατά τη διάρκεια των πολύ πρώιμων σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης και αυτό πιθανόν συνετέλεσε στο αυξημένο ποσοστό αυλάκωσης. Σε προηγούμενη μελέτη (Dimitriadis 2006, Dimitriadis et al 2007), αναφέρεται ότι η συγκέντρωση των 0.01mM γουαϊαζουλενίου αύξησε σημαντικά ($p < 0.05$) το ποσοστό αυλάκωσης, όμως θα πρέπει να αναφερθεί ότι η καλλιέργεια των εμβρύων γινόταν σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου (10%), η οποία αφ' εαυτής ευνοεί την παραγωγή ROS. Επιπλέον, στις προαναφερθείσες μελέτες, η καλλιέργεια των εμβρύων διαρκούσε μόνο 48 ώρες, και ουσιαστικά η δράση του γουαϊαζουλενίου ελέγχθηκε αποκλειστικά επί των ποσοστών αυλάκωσης.

Τα στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία αποκαλύπτουν έντονη διχογνωμία ως προς το εάν η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής προστασίας στο υπόστρωμα της καλλιέργειας των εμβρύων θα μπορούσε να βελτιώσει το ποσοστό απόδοσης σε βλαστοκύστες. Μελέτες σε κουνέλια και ποντικούς έδειξαν ότι η προσθήκη υπεροξειδίου της δισμουτάσης βελτιώνει το ρυθμό ανάπτυξης των εμβρύων όταν η καλλιέργειά τους γίνεται υπό υψηλή (20%) συγκέντρωση οξυγόνου (Umaoka et al. 1992, Li and Foote 1993). Οι Caamano et al (1996) αναφέρουν βελτίωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στα βοοειδή, όταν β-μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται στην καλλιέργεια των εμβρύων υπό χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Τέλος, όταν το υπόστρωμα καλλιέργειας τροποποιήθηκε με προσθήκη κυστεΐνης σε συγκέντρωση 0.6 mM, τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν αντιφατικά (Van Soom et al 2002, Ali et al 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, οι συνθήκες της IVM καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα των ωαρίων να αναπτυχθούν και τη μετέπειτα ποιότητα των εμβρύων. Το ίδιο, και ίσως περισσότερο καθοριστικές για την ποιότητα των

εμβρύων όμως είναι οι συνθήκες καλλιέργειας που ακολουθούν τη γονιμοποίηση (Niemann and Wrenzycki 2000, Rizos et al 2008). Για να καθοριστεί η πιθανή επίδραση του γουαϊαζουλενίου στην ποιότητα των βλαστοκύστεων, μετά την ενσωμάτωσή του στα υποστρώματα της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων ή της καλλιέργειας των εμβρύων, αναλύθηκε η σχετική συγκέντρωση mRNA γονιδίων, που σχετίζονται: α) με το μεταβολισμό (*PTGS2*, *SLC2A5*, *GAPDH* και *G6PD*), β) με την αντιοξειδωτική ανταπόκριση (*GPX1*) και γ) με την αναγνώριση της εγκυμοσύνης καθώς και το σχηματισμό του πλακούντα (*AKR1B1* και *PLAC8*). Το γονίδιο *GAPDH* είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση ενός ειδικού ένζυμου, που καταλύει το έκτο στάδιο της γλυκόλυσης και συμμετέχει σε αρκετές μη μεταβολικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων η ενεργοποίηση της μεταγραφής και η έναρξη της απόπτωσης. Το γονίδιο *G6PD*, από την άλλη πλευρά, επάγει ένα ένζυμο, που καταλύει το πρώτο και μη αναστρέψιμο στάδιο της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης (pentose phosphate pathway). Οι Bermejo et al (2010a) βρήκαν ότι και τα δύο αυτά γονίδια υπερεκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα όταν τα COCs ωριμάζουν κάτω από χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (5%), γεγονός που συνηγορεί υπέρ της αυξημένης δυνατότητας πρόσληψης γλυκόζης και της αυξημένης αναερόβιας γλυκόλυσης. Στην ίδια έρευνα δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στις γονιδιακές εκφράσεις στις βλαστοκύστες, γεγονός που μάλλον θα πρέπει να αποδοθεί στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (5%), που χρησιμοποιήθηκε στην IVC. Αυξημένη έκφραση του mRNA του γονιδίου *PTGS2* στα κοκκώδη κύτταρα του ανθρώπου έχει συνδεθεί με καλύτερη ανάπτυξη και ποιότητα των εμβρύων μετά την IVF (McKenzie et al 2004). Ομοίως, στα βοοειδή υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ υπερ-έκφρασης *PTGS2*, η οποία επάγεται από την FSH, όταν αυτή προστίθεται στο υπόστρωμα της IVM και της ποιότητας των ωαρίων (Assidi et al 2008). Στην παρούσα μελέτη, δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στη γονιδιακές εκφράσεις μεταξύ των ομάδων είτε όταν το γουαϊαζουλένιο χρησιμοποιήθηκε στην IVM υπό ατμοσφαιρική συγκέντρωση οξυγόνου (20%) ή στην IVC υπό χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (5%). Έχει αναφερθεί ότι η υπερ-έκφραση του *PTGS2* μπορεί να επάγεται από την αυξημένη πίεση οξυγόνου, καθώς δρα τόσο ως διοξυγενάση όσο και ως υπεροξειδάση (Eligini et al 2009). Το γεγονός ότι και στις δυο μελέτες η καλλιέργεια των εμβρύων έγινε υπό χαμηλή συγκέντρωση O₂, ενώ η FSH δεν συμπεριλαμβανόταν στο υπόστρωμα ωρίμανσης στην παρούσα μελέτη, πιθανόν

να εξηγήσει τις διαφορές στα ευρήματα των δυο ερευνών. Για να ελεγχθούν πιθανές διαφορές στην αντίδραση των εμβρύων στο οξειδωτικό στρες, μελετήθηκε το mRNA του γονιδίου *GPX1*. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική αντίδραση των εμβρύων, σε σχέση πάντα με το συγκεκριμένο γονίδιο. Παρόλα αυτά, η παράμετρος αυτή είναι πολύ περιορισμένη και ίσως δεν αντανάκλα τις μεταβολές της παραγωγής των ROS, καθώς η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια των εμβρύων και στα δύο πειράματα, ευνοεί το συγκεκριμένο μετάγραφο, καλύπτοντας το πιθανό αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, που θα προέκυπτε από τη χρήση του γουαϊαζουλένιο, εάν η συγκέντρωση του οξυγόνου ήταν 20%.

Τέλος επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα μετάγραφα των *AKR1B1* και το *PLAC8*, γιατί η έκφρασή τους έχει συνδεθεί αρνητικά και θετικά, αντίστοιχα, με την πιθανότητα να γεννηθούν ζωντανά μοσχάρια (El-Sayed et al 2006). Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των ομάδων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το εξωγενές αντιοξειδωτικό γουαϊαζουλένιο, ανεξάρτητα της συγκέντρωσης, με την οποία συμμετείχε, τόσο στο υπόστρωμα ωρίμανσης όσο και σε αυτό της καλλιέργειας, δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό των ζυγών, που εξελίσσεται έως το στάδιο της βλαστοκύστης. Επίσης, το γουαϊαζουλένιο δεν επηρέασε την ποιότητα των εμβρύων, όπως αυτή εκτιμήθηκε με βάση την ποσοτική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία συνδέονται με το μεταβολισμό, την οξείδωση, την αναγνώριση της εγκυμοσύνης και την ανάπτυξη του πλακούντα. Το γεγονός ότι τα ποσοστά αυλάκωσης ήταν ελαφρώς αυξημένα στην ομάδα του γουαϊαζουλένιο αποτελεί ένδειξη βελτίωσης ποιότητας, η οποία όμως δεν καταγράφηκε στους ποιοτικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο, θα πρέπει να τονισθεί ότι οι συνθήκες και τα υποστρώματα, που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τέτοια που δεν ενισχύουν την ανάπτυξη οξειδωτικών φαινομένων. Κατά συνέπεια, η αντιοξειδωτική προστασία των εμβρύων που παράγονται *in vitro* διασφαλίζεται πρωτίστως από τις συνθήκες (υποστρώματα – ατμοσφαιρικές συνθήκες) παραγωγής εμβρύων, ενώ η ενσωμάτωση

εξωγενών, αποκλειστικά αντιοξειδωτικών ουσιών στα υποστρώματα, δεν φαίνεται να έχει βαρύνοντα ρόλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Η γκρελίνη και οι βιολογικές της δράσεις

Η γκρελίνη

Το 1999 οι Kojima et al ανακάλυψαν το πεπτιδίο γκρελίνη, το οποίο εκκρίνεται από τον βλεννογόνο του στομάχου και χαρακτηρίστηκε ως ο ενδογενής παράγοντας σύνδεσης του υποδοχέα επαγωγής έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (growth hormone secretagogue receptor, GHS-R). Στα περισσότερα θηλαστικά, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης αυξάνουν πριν την προγραμματισμένη πρόσληψη τροφής, και μειώνονται τάχιστα μετά από αυτήν (Jurimae et al 2007, Bradford and Allen 2008, Sugino et al 2010). Η γκρελίνη, χορηγούμενη εξωγενώς αυξάνει την κατανάλωση τροφής στον άνθρωπο και στα τρωκτικά (Wren et al. 2001, Druce et al 2005), ενώ στα μηρυκαστικά, παρά την αύξηση της συγκέντρωσης που παρατηρείται πριν από την προγραμματισμένη πρόσληψη τροφής, η ορεξιογόνος δράση του πεπτιδίου δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένη (Iqbal et al 2006).

Το πεπτιδίο αποτελείται από 28 αμινοξέα και προέρχεται από την προ-προγκρελίνη (preproghrelin). Η προ-προγκρελίνη αποτελείται από 117 αμινοξέα. Μετά από διάσπαση στη θέση 23, αποσπάται ένα τμήμα του πεπτιδίου και προκύπτει το πεπτιδίο προγκρελίνη, που αποτελείται από 94 αμινοξέα και φέρει γλυκίνη στο N άκρο του. Υπό την επίδραση της κονβερτάσης προορμονών PC1/3 προκύπτει η γκρελίνη με διάσπαση στο σημείο αργινίνη-28. Έτσι, από το N άκρο της προγκρελίνης προέρχεται η γκρελίνη, ενώ το υπόλοιπο τμήμα με το C-άκρο ονομάζεται ομπεστατίνη (Zhu et al 2006). Η ορμόνη κυκλοφορεί στον οργανισμό σε δύο μορφές μια αποακυλιωμένη μορφή και μια ακυλιωμένη, η οποία προκύπτει μετά από σύνδεση οκτανοϊκής ομάδας στη θέση σερίνη 3. Η ακυλίωση της γκρελίνης καταλύεται από το ένζυμο Ο-ακυλτρανσφεράση της γκρελίνης (Ghrelin O-Acyltransferase- GOAT), το οποίο είναι μέλος μιας ομάδας υδρόφοβων

ενζύμων, που βρίσκονται συνδεδεμένα στις μεμβράνες. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν λιπαρά οξέα μακράς αλύσου σε υποδοχείς ενώσεων, που βρίσκονται στις μεμβράνες (MBOATs, Membrane-Bound O-Acyltransferases) (Hofmann 2000). Τα λιπαρά οξέα τα οποία μεταφέρονται από τις MBOAT έχουν περισσότερα από 16 άτομα C. Το GOAT, αποτελώντας ίσως τη μοναδική εξαίρεση, καταλύει τη μεταφορά οκτανοϊκού οξέος. Εικάζεται ότι η γκρελίνη είναι το μοναδικό υπόστρωμα, που καταλύεται από το ένζυμο αυτό. Η ακυλιωμένη μορφή του πεπτιδίου θεωρείται αυτή με ενεργές βιολογικές ιδιότητες (Kojima et al 2005) και αποτελεί μοναδική περίπτωση πεπτιδικής ορμόνης που τροποποιείται με την προσθήκη λιπαρού οξέος (Kojima et al 1999).

Η ορμόνη έχει ταυτοποιηθεί σε πολλά θηλαστικά (ανθρώπους, ποντίκια, αρουραίους, πιθήκους, χοίρους, βοοειδή, πρόβατα, σκύλους κλπ) με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την διατήρηση της δομής της ανάμεσα στα είδη: τα 10 αμινοξέα του NH₂- άκρου του πεπτιδίου είναι κοινά και η ακυλίωση γίνεται πάντα στο τρίτο αμινοξύ, που είναι η σερίνη, αποδεικνύοντας τη σημασία του τμήματος αυτού για την ενεργότητα της ορμόνης. Η γκρελίνη των βοοειδών και των προβάτων αποτελείται από 27 αμινοξέα - απουσιάζει το Gln14.

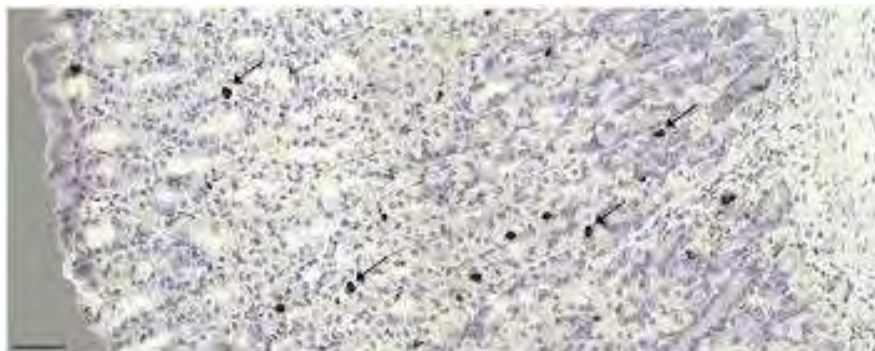
Εντόπιση της γκρελίνης σε διάφορους ιστούς

Συστηματικές μελέτες των τελευταίων δυο δεκαετιών οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η γκρελίνη δεν έχει μόνο μεταβολικό ρόλο και αυτό γιατί τόσο η ορμόνη όσο και ο υποδοχέας της βρέθηκαν να εκφράζονται σε πολλούς και διαφορετικών τύπων ιστούς (Dupont et al. 2010). Η γκρελίνη παράγεται από ειδικά οξεόφιλα κύτταρα του στομάχου (X/A-like cells), τα οποία εντοπίζονται στο βλεννογόνο, υπάρχουν σε αφθονία στο θόλο και σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στον πυλωρό (Date 2000), Εικόνα 7.

Τα κύτταρα αυτά, που περιέχουν σφαιρικά συμπαγή κοκκία γεμάτα με ακυλιωμένη γκρελίνη, είναι πολύ λίγα στο στομάχι του εμβρύου και ο αριθμός τους αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 5 εβδομάδα μετά τη γέννηση (Hayashida 2002). Τα ίδια κύτταρα εντοπίζονται και στο δωδεκαδάκτυλο, τον ειλεό και το κόλον, με τη συγκέντρωσή τους να μειώνεται σταδιακά. Το πάγκρεας, ομοίως, είναι ένα όργανο, που παράγει γκρελίνη, χωρίς να έχει ακόμη καθοριστεί ο

τύπος των κυττάρων που την παράγουν (Date 2002). Τα επίπεδα της παγκρεατικής γκρελίνης είναι ιδιαίτερα αυξημένα από το μέσο της κύησης μέχρι το πρώτο διάστημα μετά τον τοκετό και στη συνέχεια μειώνονται. Θα πρέπει να τονισθεί, ότι η εκκριτική ικανότητα των κυττάρων αυτών δεν επηρεάζεται από την έλλειψη τροφής (Chanoine 2004).

Εικόνα 7



Ανοσοϊστοχημική μικροφωτογραφία των X/A κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου (βέλη) ποντικού μετά από κατά βούληση πρόσληψη τροφής. Τα κύτταρα βρίσκονται διάσπαρτα σε όλη την επιφάνεια του βλεννογόνου

Η γκρελίνη έχει ανιχνευθεί στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου (Kojima 1999), σημαντική περιοχή ελέγχου της πείνας καθώς και σε υποθαλαμικούς νευρώνες στην τρίτη κοιλία μεταξύ παρακοιλιακού και τοξοειδούς πυρήνα. Πιστεύεται ότι η γκρελίνη επηρεάζοντας τους νευρώνες, που περιέχουν το νευροπεπτιδίο Υ και την agouti-related πρωτεΐνη, υπεισέρχεται στη ρύθμιση της πρόσληψης της τροφής (Cowley 2003). Τα σωματοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης αποτελούν τα κύτταρα στόχο για τη γκρελίνη. Η γκρελίνη έχει βρεθεί στην υπόφυση, με την έκφρασή της να είναι υψηλή αμέσως μετά τη γέννηση και να μειώνεται κατά την περίοδο της εφηβείας (Korbonits 2001a,b). Στους νεφρούς, εκφράζεται το mRNA της γκρελίνης και ανευρίσκεται τόσο η ακυλιωμένη όσο και η μη ακυλιωμένη πρωτεΐνη. Οι τιμές της γκρελίνης στο πλάσμα σχετίζονται άμεσα με αυτές της κρεατινίνης και σε τελικά στάδια νεφρικής νόσου αυξάνονται υπέρμετρα, υποδεικνύοντας ότι οι νεφροί αποτελούν σημαντικό σημείο αποδόμησης ή/και κάθαρσης της γκρελίνης (Yoshimoto 2002).

Η εντόπιση της γκρελίνης στο αναπαραγωγικό σύστημα θα αναφερθεί αναλυτικά σε ειδικό κεφάλαιο.

Ο υποδοχέας της γκρελίνης

Ο υποδοχέας της γκρελίνης, GHS-R, ανήκει στην ομάδα των G συνδεδεμένων πρωτεϊνών με 7 διαμεμβρανικές περιοχές (7-TM). Έχουν βρεθεί δύο τύποι: ο GHS-R1a, με τον οποίο ενώνεται η ακυλιωμένη γκρελίνη και ασκεί τη βιολογική δράση της και ο GHS-R1b, που δεν συνδέεται με τη γκρελίνη και του οποίου ο βιολογικός ρόλος δεν έχει ακόμα διασαφηνισθεί (Smith 2001). Η δομή του υποδοχέα της γκρελίνης είναι ιδιαίτερα σταθερή ανάμεσα στα σπονδυλωτά (Palyha 2000). Η εντόπιση τόσο του υποδοχέα όσο και του αντίστοιχου mRNA στον οργανισμό ακολουθεί την κατανομή της γκρελίνης (Guan 1997). Ο μηχανισμός έκκρισης της αυξητικής ορμόνης μέσω της γκρελίνης διαφέρει από αυτόν του εκλυτικού παράγοντα της αυξητικής ορμόνης (GHRH). Ο GHRH ενώνεται με τη Gs υπο-ομάδα, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό cAMP, που στη συνέχεια χρησιμοποιείται σαν δεύτερος αγγελιοφόρος για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αντίθετα, η γκρελίνη με τον υποδοχέα της ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C, παράγεται IP3 και διακυλογλυκερόλη, με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ga^{2+} , δείχνοντας ότι ο υποδοχέας συνδέεται με τη Gq υπο-ομάδα των G πρωτεϊνών (Holst 2004, 2005).

Ο μεταβολισμός της γκρελίνης

Μελέτες στον άνθρωπο δείχνουν ότι ο ρυθμός απομάκρυνσης διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στην ακυλιωμένη και στη μη ακυλιωμένη γκρελίνη, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 21 και 36 λεπτά, αντίστοιχα (Paulo 2008). Αύξηση της συγκέντρωσης γκρελίνης αυξάνει και το χρόνο ημίσειας ζωής σε 47 και 64 λεπτά, για την ενεργή και μη ενεργή μορφή, αντίστοιχα. Πιθανολογείται ότι αυτή η δόσοεξαρτώμενη αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής οφείλεται σε μετατροπή της μίας μορφής στην άλλη ή μπορεί να σχετίζεται με τη σύνδεση της ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα με υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL), που περιέχουν την εστεράση παραοξονάση (paraoxonase) (Beaumont 2003). Παράλληλα, από το στομάχι των αρουραίων

απομονώθηκε το γαστρικό ένζυμο λυσοφωσφολιπάση 1, που αποακυλιώνει τη γκρελίνη (Shanado et al 2004). Το 2010 οι Satou et al βρήκαν στον ορό εμβρύου μόσχου μια λυσοφωσφολιπάση I, την ακυλοπρωτεΐνη θειοεστεράση (APT1), που αποακυλιώνει τη γκρελίνη με χρονοεξαρτώμενη δράση. Η προέλευση της APT1 στον ορό, η ρύθμιση της συγκέντρωσης της και η βιολογική σημασία της, δεν έχουν απόλυτα διευκρινιστεί. Τέλος, η ακυλιωμένη γκρελίνη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ (Gauna 2007), ενώ η μη ακυλιωμένη στους νεφρούς (Yoshimoto 2002).

Η γκρελίνη ως αντιοξειδωτικό

Είναι γνωστό ότι η γκρελίνη αυξάνει την πρόσληψη και την κατανάλωση της γλυκόζης σε διάφορους τύπους κυττάρων μέσω των MAPK και PI3/Akt μονοπατιών (Baltanzi et al 2002, Kim et al 2004).

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της γκρελίνης έχει τεκμηριωθεί σε αρκετές μελέτες. Στον καρδιακό μυ, η αντιοξειδωτική δράση ασκείται με δύο τρόπους: α) εμποδίζει τη μείωση της αναλογίας ATP/ADP σε κυτταρικό επίπεδο. Είναι γνωστό ότι η μείωση της αναλογίας ATP/ADP προκαλεί αύξηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια, μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$) και αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων, με απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος C (Cyt-C), που οδηγεί σε ενεργοποίηση των κασπασών και σε παραγωγή ROS. Η γκρελίνη αποτρέπει τα παραπάνω και παράλληλα αυξάνει α) την έκφραση των mRNA για τα αντιαποπτωτικά *Bcl-2* και *Bal-xl*, το προαποπτωτικό *Bcl-xs*, β) τη σχέση *Bcl-2/Bax* προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση και γ) την έκφραση του MnSOD δίνοντας ισχυρή αντιοξειδωτική προστασία στα κύτταρα (Xu et al 2008, Kheradmand et al 2010).

Σε πειραματική μελέτη σε αρουραίους, βρέθηκε ότι η συστηματική χορήγηση γκρελίνης πριν από την πειραματική πρόκληση γαστρικής ισχαιμίας, αύξησε τα επίπεδα γλουταθειόνης και μείωσε την έκφραση της πρωτεΐνης iNOS, η οποία επάγεται σε καταστάσεις ελλιπούς αιμάτωσης. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η γκρελίνη μειώνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την *in vitro* παραγωγή ROS από ανθρώπινα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (El Eter et

al 2007). Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε προκαλούμενο οξειδωτικό στρες με χορήγηση πεντυλενετετραζόλης (PTZ) σε αρουραίους, η προηγούμενη χορήγηση γκρελίνης προλαμβάνει τη λιπιδική υπεροξειδωση και τη μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της γλουταθειόνης στα κύτταρα (Obay et al 2008).

Τέλος, έχει βρεθεί ότι η γκρελίνη προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τις βλάβες, που προκαλεί η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, εμποδίζοντας την παραγωγή ROS (Zhao 2007).

Η γκρελίνη στο αναπαραγωγικό σύστημα

Είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι η γκρελίνη στο αναπαραγωγικό σύστημα έχει μάλλον κατασταλτικό ρόλο (Veldhuis & Bowers 2010, Repaci et al 2011, Tena-Sempere 2007), με κύρια δράση τη συμμετοχή της στη ρύθμιση της έκκρισης της LH. Η τελευταία έχει διαπιστωθεί κυρίως σε αρουραίους και ποντίκια, ιδιαιτέρως σε πρόβατα και βοοειδή (Furuta et al 2001, Miller et al 2005, Iqbal et al 2006, Roche et al 2008, Donolou et al 2013) προσφάτως δε και στον άνθρωπο (Kluge et al 2013, Messini et al 2014). Το πλέον πιθανό σενάριο για τον μηχανισμό δράσης της γκρελίνης στην έκκριση της LH, περιλαμβάνει την ανασταλτική δράση στους υποθαλαμικούς νευρώνες, με διαμεσολάβηση του νευροπεπτιδίου Υ, της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης, και πιθανόν της κισπεπτίνης (Vulliamoz et al 2008, Forbes et al 2009).

Αντίθετα με την LH, οι πληροφορίες που αφορούν στη δράση της γκρελίνης στην έκκριση της FSH, είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Κάποιες μελέτες αναφέρουν ουδέτερη δράση (Messini et al 2009, Fernandez-Fernandez et al 2004) και κάποιες άλλες ανασταλτική δράση (Kluge et al. 2009, Donolou et al 2013).

Πέραν του ρόλου της σε κεντρικό επίπεδο, η γκρελίνη και ο υποδοχέας της έχουν ανιχνευθεί στην ωοθήκη πολλών ειδών (Caminos et al 2003, Miller et al 2005, Deaver et al 2013, Sirotkin et al 2009). Μετά από συστηματική

χορήγηση γκρελίνης σε αρουραίους παρατηρήθηκε ανάσχεση της ωοθυλακικής και της ωχρινικής ανάπτυξης της ωοθήκης. Η επίδραση στην ωοθήκη δεν αφορούσε μόνο στους επιμέρους ωοθηκικούς σχηματισμούς (ωοθυλάκια, ωάρια, και ωχρά σωματία), αλλά και ο συνολικός όγκος της ωοθήκης μειώθηκε σημαντικά (Kheradmand et al 2009). Η προσθήκη γκρελίνης σε καλλιέργειες ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού μείωσε σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων και παράλληλα εξασθένησε την ικανότητα των κυττάρων να παράξουν προγεστερόνη και οιστραδιόλη (Tropea et al 2007). Σε ωάρια προβάτων που ωρίμασαν *in vitro*, όπως επίσης και σε έμβρυα που παράχθηκαν *in vitro*, ανιχνεύθηκε mRNA της γκρελίνης και του υποδοχέα της, σε ποσότητες που συνδέονταν με το στάδιο ωρίμανσης ή ανάπτυξης του εμβρύου (Du et al 2010). Η δράση της γκρελίνης στα *in vitro* παραγόμενα έμβρυα φαίνεται να καθορίζεται από το είδος του ζώου και τη συγκέντρωση της γκρελίνης. Έτσι, μέτριες συγκεντρώσεις γκρελίνης αύξησαν την ικανότητα ανάπτυξης εμβρύων προβάτων, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκάλεσαν σημαντική καταστολή της ανάπτυξής τους (Wang et al 2013). Στα ποντίκια, η παρουσία γκρελίνης στα υποστρώματα της IVC μείωσε τον αριθμό των βλαστοκύστεων, ενώ στους χοίρους τον αύξησε, επιδρώντας όμως αρνητικά στην ποιότητα των εμβρύων (Kawamura et al 2003, Zhang et al 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων βοοειδών

Σκοπός

Ο ρόλος της γκρελίνης στη ρύθμιση πολλών επιμέρους λειτουργιών στην αναπαραγωγή των θηλαστικών είναι πλέον αναμφισβήτητος. Όμως τα δεδομένα για τον επακριβή ρόλο της γκρελίνης στην ανάπτυξη των πρώιμων εμβρύων είναι ακόμα ελλιπή. Σκοπός των πειραματισμών του κεφαλαίου αυτού ήταν αρχικά να διερευνηθεί εάν η προσθήκη γκρελίνης στο υπόστρωμα ωρίμανσης, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, επιδρά στη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων και στη συνέχεια να εξεταστεί, με βάση γονιδιακούς δείκτες η πιθανότητα αύξησης της αντιοξειδωτικής προστασίας του εμβρύου και η επίδραση της στην συνολική ποιότητα των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων.

Υλικά και μέθοδοι

Εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων και παραγωγή εμβρύων

Οι μέθοδοι και οι συνθήκες παραγωγής εμβρύων και ανάλυσης των αποτελεσμάτων είναι αυτές που περιγράφονται στο Κεφάλαιο II και στο Παράρτημα της παρούσας διατριβής. Στο παρόν Κεφάλαιο, γίνεται αναφορά μόνο στις ειδικές τροποποιήσεις των γενικών μεθόδων.

Πειραματικός σχεδιασμός

Αρχικά, σχεδιάσθηκαν δυο πειράματα. Στο πείραμα 1 ενσωματώθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις γκρελίνης στο υπόστρωμα της IVM και ελέγχθηκαν τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων. Η συγκέντρωση που θα απέδιδε την περισσότερο εμφανή δράση, θα επιλεγόταν να χρησιμοποιηθεί στον δεύτερο πειραματισμό, του οποίου σκοπός ήταν να μελετηθούν πιθανοί

μηχανισμοί, μέσω των οποίων ασκείται η δράση της γκρελίνης στα ωάρια/έμβρυα.

Πείραμα 1

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 1994 COCs, τα οποία κατανεμήθηκαν τυχαία σε 4 ομάδες: Αρνητικοί μάρτυρες Control, n=484 και τρεις ομάδες των οποίων το υπόστρωμα της IVM τροποποιήθηκε με προσθήκη 2000 pg/ml (Ghr2000, n=497), 800 pg/ml (Ghr800 n=524) και 200 pg/ml (Ghr200 n=489) βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης (Anaspec, Germany). Διενεργήθηκαν συνολικά 10 πειραματικές επαναλήψεις.

Πείραμα 2

Το πείραμα αυτό διενεργήθηκε μετά την ολοκλήρωση του πειράματος 1. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος 1 έδειξε ότι, όταν η γκρελίνη χρησιμοποιείται στην IVM σε συγκέντρωση 800pg/ml, έχει σημαντικότερη επίδραση στο ρυθμό παραγωγής βλαστοκύστεων. Έτσι, η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για τον 2^ο πειραματισμό. Με βάση παρατήρηση του 1^{ου} πειραματισμού, σύμφωνα με την οποία μετά την ολοκλήρωση της IVM τα COCs των ομάδων της γκρελίνης παρουσίαζαν εξαιρετικά μεγάλο βαθμό διάταση της στιβάδας του ωοφόρου δίσκου, αποφασίσθηκε η ωρίμανση στον 2^ο πειραματισμό να διαρκεί 18 ή 24 ώρες.

Σε 5 επαναλήψεις, χρησιμοποιήθηκαν 1151 COCs κατανεμημένα σε 4 ομάδες, των οποίων το υπόστρωμα IVM εμπλουτιζόταν (ομάδες Ghr) ή όχι (ομάδες C) με 800 pg/ml ακυλιωμένης βόειας γκρελίνης και η διάρκεια της ωρίμανσης ήταν 18 (ομάδες C18, n=210 και Ghr18 n=481) ή 24 ώρες (ομάδες C24 n=243 και Ghr24 n=217). Βλαστοκύστες ημέρας 7 καταψύχθηκαν ταχέως με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο σε ομάδες των 10, για μελλοντική απομόνωση mRNA και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων των γονιδίων *IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *H6PD*, *GPX1*, *DNMT3A*, και *BAX* με real-time qRT-PCR.

Για τον προσδιορισμό του βαθμού διάτασης της στιβάδας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου, χρησιμοποιήθηκαν 387 COCs σε 3 επαναλήψεις, που κατανεμηθήκαν σε 4 ομάδες (C18 n=92, C24 n= 83, Ghr18 n=105, Ghr24 n=107). Μετά από την εκτίμηση της διάτασης της στιβάδας του ωοφόρου δίσκου, τα COCs απογυμνώνονταν από τα περιβάλλοντα κύτταρά τους με μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιείχε 2 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 3%, όπου παρέμειναν για 5 min και στη συνέχεια ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση για 40 sec περίπου. Αμέσως μετά, τοποθετούνταν σε τρυβλίο, που περιείχε 3 ml υπότονου διαλύματος KCl (0.075M), στο οποίο παρέμειναν για 7 min σε θερμοκρασία 37°C, για να διευρυνθεί η απόσταση μεταξύ των χρωματοσωμάτων τους. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε γυάλινο πλακίδιο και καλύπτονταν με καλυπτρίδα, η οποία σταθεροποιούταν με τέσσερες σταγόνες μίγματος βαζελίνης – παραφίνης σε αναλογία 40/1. Μετά από ελαφρά συμπίεση, τα ωάρια μονιμοποιούνταν για 48 ώρες σε διάλυμα οξικού οξέος- μεθανόλης 1/3. Στη συνέχεια γινόταν χρώση των ωαρίων με 2% οξική ορκεΐνη και τέλος τα ωάρια εξετάζονταν σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Ένα ωάριο χαρακτηριζόταν ως ώριμο, όταν η διάταξη της χρωματίνης του ανταποκρινόταν στην εικόνα της τελόφασης I ή στη μετάφαση II.

Απογυμνωμένα ωάρια (ομάδες των 10) και κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα οποία απομονώνονταν μετά από φυγοκέντρηση σε 1500 rpm για 10 min (302g) του υποστρώματος, στο οποίο έγινε η απογύμνωση των ωαρίων, καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο για απομόνωση mRNA. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της real time qRT-PCR, έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγράφων των γονιδίων *COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *CCNB1*, *LDHA*, *GREM1*, *GADH*, και *COX2*, *GPX1*, *SOD2*, *LDHA*, *CCNB1*, *G6PD*, *GLUT1*, *GADPH*, *GREM1* στα ωάρια και στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, αντίστοιχα.

Στατιστική ανάλυση

Τα ποσοστά απόδοσης σε βλαστοκύστες και οι γονιδιακές εκφράσεις συγκρίθηκαν με τις μεθόδους που περιγράφονται στο Κεφάλαιο II.

Τα αποτελέσματα της διάταξης της στιβάδας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και της ωρίμανσης του πυρήνα ελέγχθηκαν με χ^2 .

Αποτελέσματα

Πείραμα 1

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά αυλάκωσης μεταξύ των 4 ομάδων. Σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, η γκρελίνη μείωσε σημαντικά το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η μεγαλύτερη σημαντικότητα διαφοράς αφορούσε τις ομάδες Ghr800 και Ghr200. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων της γκρελίνης. Όλα τα δεδομένα που αφορούν στην ανάπτυξη των εμβρύων περιγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4

Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος ωρίμανσης ωαρίων με την προσθήκη τριών συγκεντρώσεων βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης στα ποσοστά αυλάκωσης, ανάπτυξης βλαστοκύστεων και εκκόλαψης. Οι τιμές αναφέρονται σε 10 επαναλήψεις και εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (SEM). Η *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων διαρκούσε για 24 ώρες.

ομάδα	ζυγωτά	αυλάκωση (%)	Βλαστοκ ημέρα 7 (%)	Βλαστοκ ημέρα 8 (%)	Βλαστοκ ημέρα 9 (%)	Εκκόλαψη ημέρα 9 (%)
C	484	366 75.6 \pm 3.3	109 22.5 \pm 1.2 ^a	123 25.4 \pm 1.3 ^a	127 26.2 \pm 1.3 ^a	22 17.3 \pm 6.2 ^a
Ghr2000	497	347 69.8 \pm 2.7	68 13.7 \pm 1.9 ^b	88 17.1 \pm 2.0 ^b	91 18.3 \pm 2.6 ^b	21 23.1 \pm 7.3 ^{ab}
Ghr800	524	353 67.3 \pm 2.8	64 12.2 \pm 1.24 ^b	93 17.7 \pm 1.5 ^b	95 18.1 \pm 2.3 ^b	33 34.7 \pm 6.7 ^b
Ghr200	489	335 68.5 \pm 1.8	78 15.9 \pm 1.8 ^b	91 18.6 \pm 2.6 ^b	104 21.3 \pm 2.8 ^{ab}	32 30.8 \pm 4.6 ^b

Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)

Για όλες τις συγκρίσεις μεταξύ ομάδων C και Ghr800 : $p < 0.005$

Πείραμα 2

Εκτίμηση του βαθμού διάτασης (*expansion*) του ωοφόρου δίσκου και της ωρίμανσης του πυρήνα.

Στις 18 και στις 24 ώρες, το ποσοστό των COCs, που κατατάχθηκαν στην κατηγορία 4, ήταν μεγαλύτερο ($p < 0.001$) στην ομάδα Ghr800 (16.2% και

45.8%) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά της ομάδας C (4.3% και 16.8%).

Όσον αφορά στην ωρίμανση του πυρήνα, δεν εντοπίστηκαν διαφορές στις ομάδες της γκρελίνης, όταν η διάρκεια της IVM ήταν 18 ή 24 ώρες (86.7% και 90.0% αντίστοιχα. Αντιθέτως, περισσότερα ($p < 0.05$) ώριμα ωάρια εντοπίστηκαν στην ομάδα C24 (85.0%) σε σύγκριση με αυτά της ομάδας C18 (71.7%). Στις 18 ώρες, το ποσοστό ώριμων ωαρίων της ομάδας Ghr 800 (86.7%) ήταν μεγαλύτερο από αυτό της ομάδας C18 (71.7%) ($p < 0.05$).

Αναλυτικά τα αποτελέσματα της εκτίμησης της ωρίμανσης των ωαρίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 .

Πίνακας 5

Εκτίμηση του βαθμού διάτασης της στιβάδας των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (κατηγορία 4) και ποσοστά μετάβασης στην μετάφαση II ωαρίων που καλλιεργήθηκαν in vitro για 18 και 24 ώρες με την παρουσία ή απουσία 800 pg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης. Αποτελέσματα επί 3 επαναλήψεων.

	18h	24h
<i>Διάταση κατηγορίας 4</i>		
Ghr800 (n=212)	17/105 (16,2%) ^a	49/107 (45,8%) ^a
Controls (n=176)	4/92 (4,3%) ^b	14/83 (16,8%) ^b
<i>Ωρίμανση του πυρήνα</i>		
Ghr800 (n=120)	52/60 (86.7%) ^a	54/60 (90.0%)
Controls (n=120)	43/60 (71.7%) ^b	51/60 (85.0%)

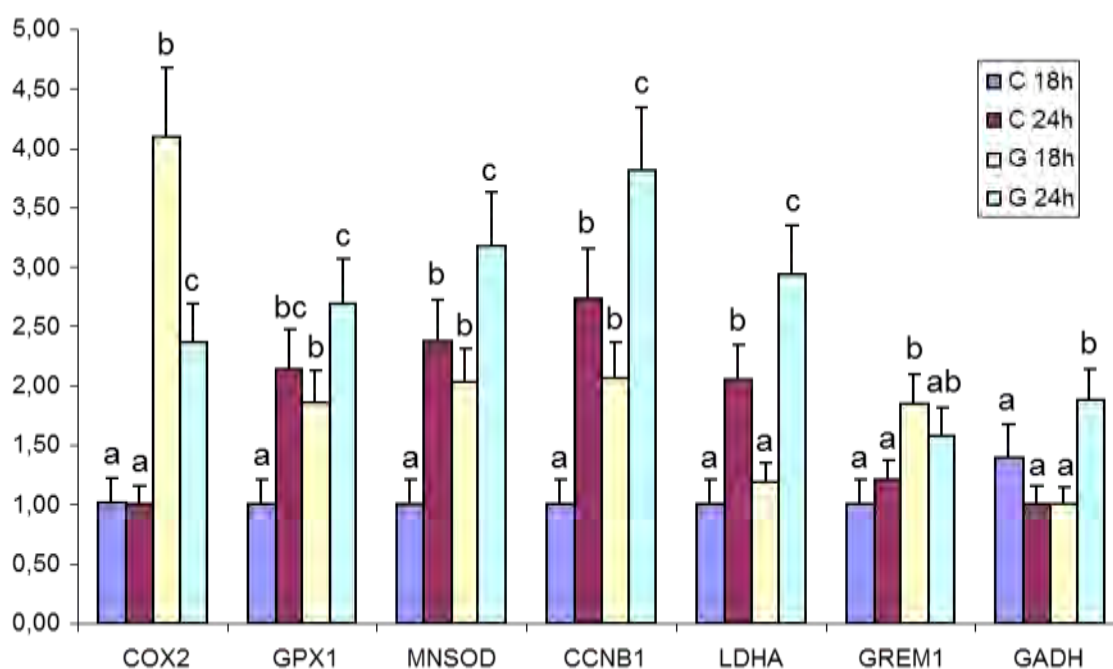
Για κάθε τμήμα του πίνακα, τα δεδομένα στην ίδια στήλη που φέρουν διαφορετικούς εκθέτες, διαφέρουν σημαντικά ($p < 0.05$)

Γονιδιακές εκφράσεις στα ωάρια .

Στην 18ωρη *in vitro* ωρίμανση, η γκρελίνη προκάλεσε υπερέκφραση των γονιδίων *COX2*, *GPX1*, *MNSOD*, *CCNB1* και *GREM1* σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Στην 24ωρη ωρίμανση, ανάλογες διαφορές εντοπίστηκαν στην έκφραση των γονιδίων *COX2*, *MNSOD*, *CCNB1*, *LDHA*, *GAPDH*. Τα συνολικά αποτελέσματα των γονιδιακών εκφράσεων παρουσιάζονται στο Γράφημα 3 .

Γράφημα 3

Ποσοτική έκφραση διαφόρων γονιδίων σε ωάρια που ωρίμασαν για 18 ή 24 ώρες με την απουσία ή παρουσία 800 pg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης



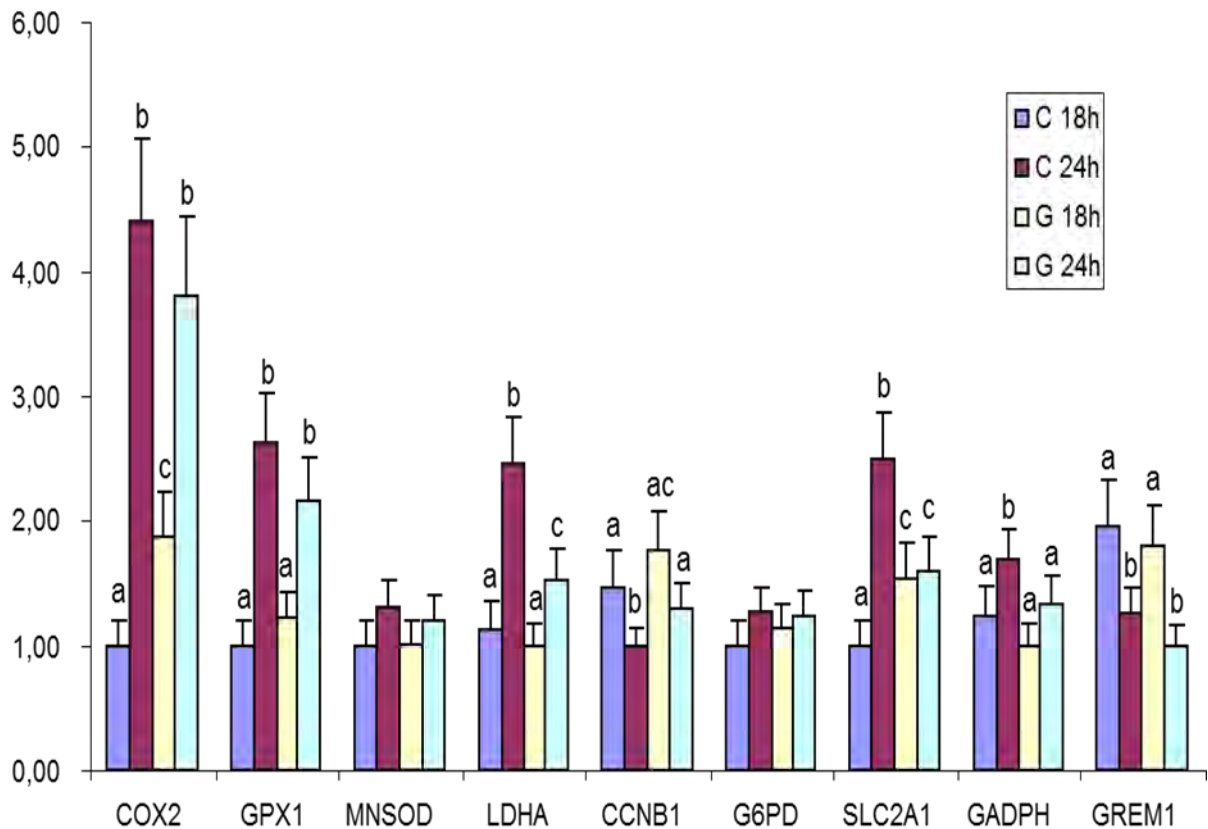
Σε κάθε τετράδα, στήλες με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$)

Έκφραση γονιδίων στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου

Στην 18ωρη ωρίμανση η γκρελίνη προκάλεσε υπερέκφραση των γονιδίων *COX2*, *SLC2A1*, ενώ στην 24ωρη προκάλεσε υποέκφραση των *LDHA*, *SLC2A1*, *GAPDH*, και υπερέκφραση του *CCNB1*. Τα συνολικά αποτελέσματα των γονιδιακών εκφράσεων παρουσιάζονται στο Γράφημα 4 .

Γράφημα 4

Ποσοτική έκφραση διαφόρων γονιδίων σε κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που ωρίμασαν για 18 ή 24 ώρες με την απουσία ή παρουσία 800 pg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης



Σε κάθε τετράδα, στήλες με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$)

Ποσοστά ανάπτυξης εμβρύων

Μεταξύ των ομάδων, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά αυλάκωσης. Στην ομάδα Ghr24, τα ποσοστά ανάπτυξης των εμβρύων ήταν τα χαμηλότερα μεταξύ όλων των ομάδων του πειράματος.

Στην ομάδα Ghr18, το ποσοστό εκκόλαψης των βλαστοκύστεων ήταν υψηλότερο αυτού των ομάδων C18 και C24 ($p < 0.005$), ενώ στην ομάδα Ghr24 το αντίστοιχο ποσοστό έτεινε να είναι υψηλότερο αυτού της ομάδας C24 ($p = 0.08$). Όλα τα δεδομένα, που αφορούν στην ανάπτυξη των εμβρύων, περιγράφονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6

Ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων από ωάρια, που ωρίμασαν *in vitro* για 18 ή 24 ώρες, με την απουσία ή την παρουσία 800 pg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης, (ομάδες C18, C24, Ghr 18 και Ghr24). Οι τιμές αναφέρονται σε 5 επαναλήψεις και εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (SEM).

Ομάδα	ζυγώτες	αυλάκωση (%)	Βλαστοκ Ημέρα 7 (%)	Βλαστοκ Ημέρα 8 (%)	Βλαστοκ Ημέρα 9 (%)	εκκόλαψη Ημέρα 9 (%)
C18	210	149 71.0 \pm 2.8	48 22.9 \pm 2.5 ^a	59 28.1 \pm 2.4 ^a	60 28.5 \pm 2.8 ^a	14 23,3 \pm 5.1 ^a
C24	243	178 73.2 \pm 4.7	52 21.4 \pm 1.6 ^a	65 26.8 \pm 4.2 ^a	67 27.5 \pm 5.1 ^a	14 20.9 \pm 6.0 ^a
Chr18	481	346 71.9 \pm 3.0	113 23.5 \pm 1.9 ^a	133 27.7 \pm 2.4 ^a	140 29.1 \pm 2.4 ^a	58 41.4 \pm 8.9 ^b
Ghr24	217	142 65.4 \pm 4.5	24 11.1 \pm 1.8 ^b	38 17.5 \pm 2.4 ^b	38 17.5 \pm 2.4 ^b	13 34.2 \pm 6.2 ^{ab}

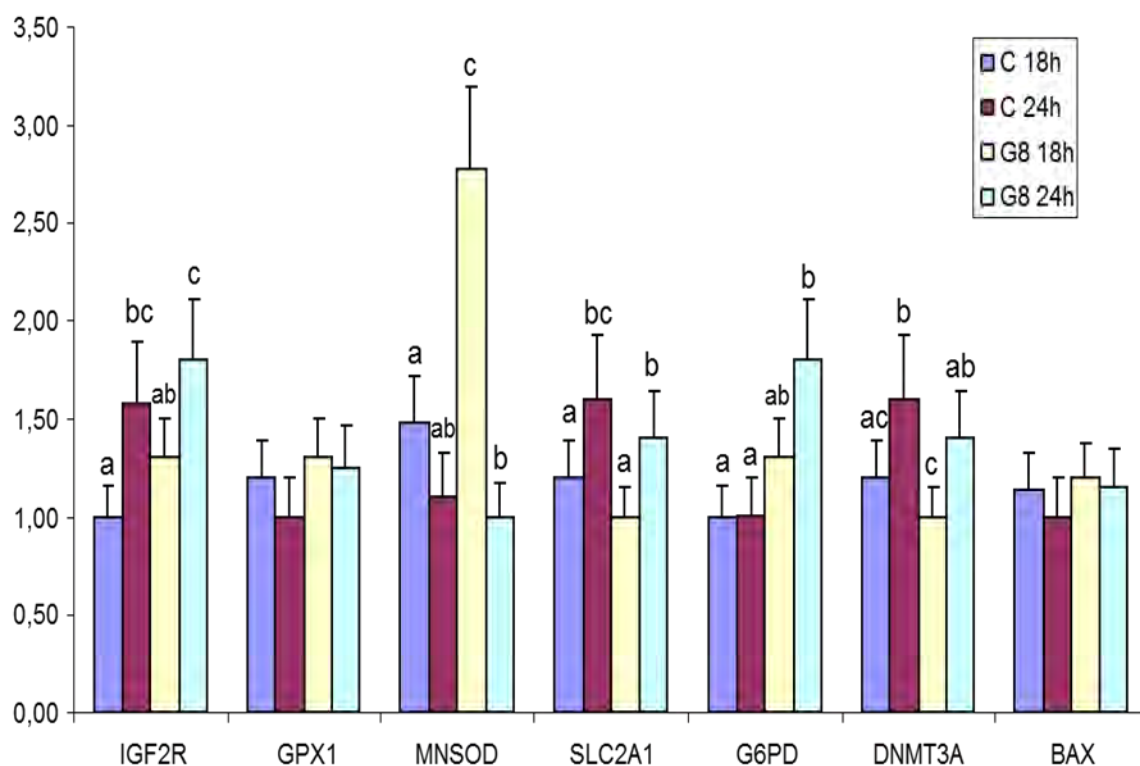
Διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)

Έκφραση γονιδίων στις βλαστοκύστες

Στις βλαστοκύστες που παράχθηκαν μετά από *in vitro* 18ωρη ή 24ωρη ωρίμανση, βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σε σύγκριση με τους μάρτυρες τα γονίδια *MNSOD* και *G6PD*. Σε γενικές γραμμές, ο χρόνος και η παρουσία της γκρελίνης επέδρασαν σημαντικά στον τρόπο έκφρασης πολλών γονιδίων, όπως φαίνεται στο Γράφημα 5.

Γράφημα 5

Ποσοτική έκφραση διαφόρων γονιδίων σε βλαστοκύστες ημέρας 7 που ωρίμασαν για 18 ή 24 ώρες, με την απουσία ή παρουσία 800 pg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης



Σε κάθε τετράδα, στήλες με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$)

Συζήτηση

Με τα πειράματα του Κεφαλαίου αυτού, διαπιστώνεται για πρώτη φορά ότι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γκρελίνης στο υπόστρωμα της IVM επιταχύνει την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην IVP των βοοειδών αλλά και του ανθρώπου, όταν ωάρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή εμβρύων, προέρχονται από δότριες με εγγενή υπεργκρελιναιμία.

Μολονότι η γκρελίνη και ο υποδοχέας της έχουν ανιχνευθεί στις γονάδες, ο ρόλος της στους γαμέτες και στο πρώιμο έμβρυο δεν έχει ακόμα μελετηθεί πλήρως (Camino et al 2003, Miller et al 2005, Deaver et al 2013). Η ενδελεχής ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας απέδωσε μόνο 3 δημοσιεύσεις, που παρέχουν κάποιες πληροφορίες για την άμεση δράση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων (Popelkova et al 2006, Dashtizad et al 2010, Wang et al 2013). Σε μία μικρού μεγέθους μελέτη, αναφέρεται ότι η ενσωμάτωση στο IVM υπόστρωμα 5 ng/ml γκρελίνης δεν επηρέασε την ωρίμανση των ωαρίων βοοειδών (Popelkova et al 2006). Σε άλλη μελέτη στα πρόβατα, αναφέρεται ότι υψηλή (250 ng/ml) συγκέντρωση γκρελίνης στην ωρίμανση οδήγησε σε μειωμένο ρυθμό αυλάκωσης και υποβάθμισε την ποιότητα των βλαστοκύστεων (Wang et al 2013). Οι Dashtizad et al (2010), χρησιμοποιώντας πολύ υψηλές συγκεντρώσεις γκρελίνης στο υπόστρωμα της IVM, έδειξαν ότι ο αριθμός των ωαρίων αγελάδων, που βρίσκονταν στη MII μετά την *in vitro* ωρίμανσή τους, αυξανόταν μετά την προσθήκη 5 ng/ml, ενώ αντιθέτως μειωνόταν με την προσθήκη 1000 ng/ml. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σχολιασθεί ότι ακόμη και η χαμηλή δόση που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν αντιστοιχεί σε καμία *in vivo* συγκέντρωση, καθώς είναι τουλάχιστον 5 φορές υψηλότερη από την υψηλότερη συγκέντρωση που έχει μετρηθεί στις αγελάδες μετά από πλήρη και παρατεταμένη νηστεία (Wertz-Lutz et al 2006). Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 200, 800 και 2000 pg/ml. Οι δυο πρώτες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στα *in vivo* επίπεδα της ορμόνης στις χρονικές περιόδους πριν από το προκαθορισμένο γεύμα και μετά από νηστεία, αντίστοιχα (Wertz-Lutz et al 2006). Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της γκρελίνης στο ωοθυλακικό υγρό έχουν άμεση συσχέτιση με αυτά του πλάσματος και ότι αυξημένη συγκέντρωση γκρελίνης στο ωοθυλακικό υγρό της γυναίκας έχει ως

αποτέλεσμα τη μείωση των ποσοστών αυλάκωσης και της βιωσιμότητας των εμβρύων 3 ημερών (Li et al 2011). Το ίδιο θεωρούμε ότι ισχύει και στις αγελάδες.

Η επιτυχής *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων συμπεριλαμβάνει εκτός από την πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωαρίου και την διάταση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Watson 2007). Η διάταση των κυττάρων της στοιβάδας αυτής έχει συνδεθεί με αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης του ωαρίου. Όμως κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις αυξημένης ενεργότητας του συστήματος βιοσύνθεσης εξοζαμίνης, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου μπορούν να παρεμποδίσουν / αντιστρέψουν την ωρίμανση (Sutton-McDowell et al 2010) ή ακόμη να προκαλέσουν την πρόωρη γήρανση του ωαρίου (Miao et al 2005, 2009). Σε όλες τις επαναλήψεις του πρώτου πειράματος, όταν τα ωάρια μεταφέρονταν από το υπόστρωμα ωρίμανσης στο υπόστρωμα γονιμοποίησης, γίνονταν η παρατήρηση και καταγράφονταν ότι τα ωάρια που είχαν ωριμάσει με την παρουσία γκρελίνης, περιβάλλονταν από εξαιρετικά διογκωμένη κυτταρική στοιβάδα και τα περισσότερα από αυτά επέπλεαν στο υπόστρωμα ωρίμανσης. Η εικόνα αυτή των υπερώριμων COCs θα μπορούσε να αιτιολογήσει τη μειωμένη παραγωγή εμβρύων στις ομάδες της γκρελίνης. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε πλήρως στο δεύτερο πείραμα, στο οποίο διαπιστώθηκε ότι τα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης, βρέθηκαν στην MII στις 18 ώρες ωρίμανσης, σε αντίθεση με τους μάρτυρες που η αντίστοιχη χρονική περίοδος ήταν οι 24 ώρες. Πρώιμες μελέτες του Gordon (1994) αναφέρουν ότι η μετάβαση των *in vitro* ωριμασμένων ωαρίων βοοειδών στη MII καταγράφεται μετά από 20 ώρες ωρίμανσης.

Η ισχυρή επίδραση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων επιβεβαιώνεται με τη μεταβολή της έκφρασης ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων. Η κυκλίνη B αποτελεί ένα από τα δύο συστατικά του παράγοντα προαγωγής της ωρίμανσης (MPF), το άλλο συστατικό είναι η πρωτεϊνική κινάση p34cdc2 (Palmer et al 1998). Στα ωάρια των βοοειδών, η ενεργότητα του MPF είναι χαμηλή στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV), αυξάνεται σταδιακά ως το στάδιο της αποδιάταξης του GV (GVBD) και φτάνει στα μέγιστα επίπεδα στο στάδιο της μετάφασης I. Στα ωάρια που συλλέγονται από ωοθήκες σφαγίων αγελάδων, ενώ δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη της κυκλίνης, υπάρχει η γονιδιακή έκφραση της

(Vigneron et al 2002). Η κυκλίνη B φαίνεται ότι συμμετέχει στη διαδικασία της μείωσης και η έκφραση της αποτελεί ένα αξιόπιστο δείκτη των μετα-μεταγραφικών μηχανισμών (Robert et al 2002, Lonergan et al 2003). Στα ωάρια που έχουν ωριμάσει *in vitro*, η ενεργότητα του MPF παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το ποσοστό των ωαρίων που φθάνουν στο στάδιο της μετάφασης II (Wu et al 1997). Μετά από 20 ώρες επώασης στο υπόστρωμα της IVM σχεδόν 80% των ωαρίων φθάνουν στο στάδιο της μετάφασης II και παράλληλα την ίδια στιγμή η ενεργότητα του MPF παρουσιάζει ισχυρή αύξηση, η οποία παραμένει αμετάβλητη μέχρι τις 30 ώρες της ωρίμανσης. Στη συνέχεια, μειώνεται σταδιακά, φθάνοντας στο ελάχιστο ποσοστό ενεργότητας 10 ώρες αργότερα (Wu et al 1997). Με βάση τα προηγούμενα, υποθέσαμε ότι η αυξημένη έκφραση του *CCNB1*, που μετρήθηκε στα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης για 24 ώρες, είναι ενδεικτική υπερωρίμανσης, η οποία επηρέασε τη δυνατότητα μετέπειτα εξέλιξης των ωαρίων αυτών. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με τα χαμηλά ποσοστά βλαστοκύστεων που παρήχθησαν από αυτή την ομάδα.

Η γκρεμλίνη 1 (*GREM1*), αποτελεί ανταγωνιστή της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP) και έχει συνδεθεί με την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων (Pangas et al 2004, Gazzero et al 2007). Η έκφραση του *GREM1* στα κοκκώδη κύτταρα των ωαρίων του ανθρώπου και των βοοειδών θεωρείται αξιόλογος προγνωστικός δείκτης της ικανότητας ανάπτυξης των ανώριμων ωαρίων και συσχετίζεται θετικά με τη δυνατότητα εξέλιξης και την ποιότητα των εμβρύων μετά από την IVF (Assidi et al 2008, Cillo et al 2009, Bermejo-Alvarez et al 2010). Στις 18 ώρες ωρίμανσης, η γκρελίνη οδήγησε σε υψηλότερη έκφραση του *GREM1* συγκριτικά και με τους δύο μάρτυρες, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να συνεχίζει να υπάρχει στις 24 ώρες. Παράλληλα, η μικρής διάρκειας ωρίμανση διατήρησε υψηλή έκφραση του *GREM1* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι η μικρής διάρκειας (18 ώρες) ωρίμανση υπό την παρουσία γκρελίνης, βελτιώνει την ποιότητα των ωαρίων.

Ο διαφοροποιητικός αυξητικός παράγοντας 9 (Growth differentiation factor 9 - GDF9), ένα μέλος της υπερ-οικογένειας του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor β - TGF-β), υπεισέρχεται στη διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο

(Tanghe et al 2002). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι το ωάριο από μόνο του παράγει GDF9, που συμμετέχει στην διάταξη των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (Elvin et al. 1999, Shimada et al 2006). Κατά τη διάρκεια της διάταξης των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου ο GDF9 επάγει την έκκριση της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX2) και κατά συνέπεια την παραγωγή προσταγλανδινών. Η έκφραση του είναι ένας ισχυρός δείκτης ποιότητας των ωαρίων στον άνθρωπο, καθώς σε υψηλής ποιότητας COCs έχει αναφερθεί υπερέκφραση του COX2 μέχρι και κατά 6 φορές μεγαλύτερης της βασικής (MacKenzie et al 2004). Στα COCs των βοοειδών, η ενεργότητα του COX2 αυξάνει μέχρι τις 12 ώρες της *in vitro* ωρίμανσης και στη συνέχεια μειώνεται από τις 18 έως τις 24 ώρες (Calder et al 2001, MacKenzie et al 2004). Στο πείραμά μας ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, η ενεργότητα του COX2 στα κύτταρα αυξήθηκε από τις 18 έως τις 24 ώρες, με την αύξηση να είναι μεγαλύτερη στην ομάδα της 18ωρης ωρίμανσης με γκρελίνη, συγκριτικά με τους μάρτυρες· αντίθετα, στις 24 ώρες η διαφορά αυτή δεν υφίστατο. Στο βαθμό που μπορούμε να γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ενεργότητα του COX2 σε ωάρια που ωρίμασαν *in vitro*. Η γκρελίνη προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της έκφρασης του COX2 στα ωάρια με μέγιστη τιμή έκφρασης στις 18 ώρες, σημαντική μείωση στη συνέχεια στις 24 ώρες, με διατήρηση όμως της διαφοράς από τους μάρτυρες και στις δύο περιπτώσεις. Η σταθερά υψηλή έκφραση του COX2 απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση πριν συνδεθεί άμεσα με την μελλοντική εξέλιξη του εμβρύου.

Η γκρελίνη, πέρα από το ρόλο της στο μεταβολισμό, έχει αναγνωριστεί ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (Xu et al 2008). Τα γονίδια του υπεροξειδίου της δισμουτάσης 2 (SOD2) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 1 (GPX1) είναι δύο γονίδια, που σχετίζονται με την ανταπόκριση στην οξειδωση τόσο των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου όσο και των ωαρίων (Bermejo-Alvarez et al 2010). Ο τρόπος δράσης της γκρελίνης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, όμως από μελέτες που έχουν γίνει στον καρδιακό μυ φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση της γκρελίνης ασκείται μέσω της παρεμπόδισης της μείωσης της αναλογίας του ATP/ADP σε κυτταρικό επίπεδο (Xu et al 2008). Στην ίδια μελέτη, έχει βρεθεί ότι η γκρελίνη αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης του SOD2 και μειώνει την απελευθέρωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης του κυτοχρώματος C (Cyt-C). Ενώ δεν βρέθηκε διαφορά στην έκφραση αυτών των

δύο αντιοξειδωτικών γονιδίων στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, τα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση του *SOD2*, ανεξάρτητα από τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ το *GPX1* παρουσίασε υπερέκφραση στα ωάρια που ωρίμασαν για 18 ώρες με γκρελίνη. Η διαφορά αυτή έπαυε να είναι ανιχνεύσιμη μεταξύ των ωαρίων που ωρίμασαν για 24 ώρες. Συμπερασματικά, τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι τα ωάρια που ωρίμασαν παρουσία γκρελίνης είχαν σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική προστασία σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Τα *GADPH*, *LDHA* και *G6PD* είναι γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό (Sutton-McDowell et al 2010). Ενώ δεν ανιχνεύτηκαν διαφορές στη σχετική ποσότητα των *LDHA* και *GAPDH* ανάμεσα στις δύο ομάδες, που ωρίμασαν για 18 ώρες, στις 24 ώρες, η γκρελίνη προκάλεσε υπερέκφραση και των δύο γονιδίων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το ATP, που απαιτείται για την ωρίμανση του ωαρίου προέρχεται είτε από τη γλυκόλυση που συμβαίνει μέσα σε αυτό ή με μεταφορά του στο ωάριο από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, που το περιβάλλουν (Trimarchi et al 2000). Συγκρίνοντας τη σχετική ποσότητα του *GAPDH* στα κύτταρα και στα ωάρια, φαίνεται ότι η γκρελίνη ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο τη γλυκόλυση στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και στα ωάρια. Στις 24 ώρες, η γκρελίνη προκαλεί αύξηση του ρυθμού γλυκόλυσης στο ωάριο και κατά συνέπεια οι ενεργειακές του απαιτήσεις καλύπτονται ενδογενώς. Αντίθετα, στην ομάδα των μαρτύρων η αυξημένη έκφραση του *GAPDH* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου είναι ίσως ενδεικτική αυξημένης μεταφοράς ATP από τα κύτταρα στο ωάριο. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται περισσότερο με την υπερέκφραση του *SLC2A1* στα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των μαρτύρων γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και την αυξημένη αναερόβια γλυκόλυση (Bermejo-Alvarez et al 2010).

Και στα δύο πειράματα, τα ποσοστά εκκόλαψης των βλαστοκύστεων, που παρήχθησαν από ωάρια που ωρίμασαν σε υπόστρωμα ωρίμανσης εμπλουτισμένο με 800 pg/ml γκρελίνης, ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αυτά της ομάδας του μάρτυρα. Με δεδομένο ότι ο ρυθμός εκκόλαψης των εμβρύων χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας (Ideta et al 2013), το ως άνω αποτέλεσμα δείχνει ότι τα έμβρυα, που αναπτύχθηκαν υπό την παρουσία γκρελίνης, πρέπει να θεωρηθούν ως καλύτερης ποιότητας από τους

αντίστοιχους μάρτυρες. Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στις βλαστοκύστες έδωσε επιπλέον πληροφορίες για την ποιότητα των εμβρύων της ομάδας της γκρελίνης. Η πρώτη ένδειξη έρχεται από τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου *DNMT3A*. Υποέκφραση του γονιδίου αυτού έχει συνδεθεί με υψηλή ικανότητα ανάπτυξης των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Sagirkaya et al 2006). Η δεύτερη ένδειξη προέρχεται από την υπερέκφραση του γονιδίου *SOD2*. Στο δεύτερο πείραμα, οι βλαστοκύστες της ομάδας Ghr18 είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία σε σχέση με τους μάρτυρες, καθώς το γονίδιο του *SOD* υπερεκφράστηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Η τρίτη και ιδιαίτερως σοβαρή ένδειξη για την ποιότητα των εμβρύων προέρχεται από το γεγονός ότι, μετά από 18ωρη ωρίμανση, η έκφραση του *IGF2R* ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα της 24ωρης ωρίμανσης. Το *IGF2R* είναι ένα γονίδιο, που προέρχεται από τη μητέρα και η υπερέκφραση του στις βλαστοκύστες ενοχοποιείται ως ένας από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες, που υπεισέρχονται στην εκδήλωση του συνδρόμου του μεγάλου απογόνου (large offspring syndrome). Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από διαμαρτίες διάπλασης, υψηλό ποσοστό αποβολών, αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα, υπερβολικά μεγάλο βάρος του εμβρύου στον τοκετό και δυστοκιών, είναι δε κοινό σε εγκυμοσύνες που ακολουθούν μεταφορά εμβρύων, τα οποία παράχθηκαν *in vitro* σε κοινά υποστρώματα (Young et al 2001, Lazzari et al 2002). Επιπλέον, η υπερέκφραση του *IGF2R* θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διαταραχές εγκατάστασης και ανάπτυξης του πλακούντα των εμβρύων των βοοειδών (Young et al 2001). Φαίνεται επομένως ότι ο περιορισμός του χρόνου ωρίμανσης ελαχιστοποιεί την πιθανότητα αρνητικών επιγενετικών επιδράσεων στις βλαστοκύστες και πιθανότατα στα έμβρυα μετά την εγκατάστασή τους στη μήτρα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι, σε διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης, η δράση της γκρελίνης είναι αμφίσημη για την απόδοση και την ποιότητα των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι δυνατό να επηρεάσουν την απόδοση και την ποιότητα των εμβρύων, δρώντας μέσω πολλαπλών βιολογικών οδών. Διαπιστώθηκε ότι η γκρελίνη, ως αντιοξειδωτική ουσία, παρέχει αντιοξειδωτική προστασία τόσο στα ωάρια όσο και στα έμβρυα. Όμως, ταυτόχρονα, η δράση

της στο μεταβολισμό, στον περιορισμό επιγενετικών φαινομένων, και στη ρύθμιση έκφρασης αυξητικών παραγόντων είναι εξίσου, ίσως περισσότερο, σημαντική από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Σε κάθε περίπτωση, αποσαφηνίσθηκε ότι η γκρελίνη επηρεάζει τη διαδικασία της *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να έχει σημαντικές εφαρμογές στην επιλογή των δοτριών ωαρίων για εξωσωματική παραγωγή εμβρύων στον άνθρωπο και στα βοοειδή. Οι ενδείξεις για βελτίωση της ποιότητας των εμβρύων, που παράγονται από ωάρια, που ωρίμασαν με την παρουσία γκρελίνης για περιορισμένο χρόνο, υποδεικνύει την ανάγκη διενέργειας περισσότερων πειραματισμών, με σκοπό να διερευνηθεί ο ακριβής ρόλος της γκρελίνης στην ικανότητα εξέλιξης του ωαρίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

Επίδραση της γκρελίνης στην εξωσωματική καλλιέργεια εμβρύων βοοειδών

Υλικά και μέθοδοι

Εξωσωματική παραγωγή εμβρύων

Η μέθοδοι, τα υλικά, οι συνθήκες παραγωγής εμβρύων και ανάλυσης των αποτελεσμάτων είναι αυτές, που περιγράφονται στο Κεφάλαιο II και το Παράρτημα της παρούσας διατριβής. Στο πείραμα 3, στο συνθετικό υγρό ωαγωγού (SOF) προστεθήκαν 16 mg/ml βόειας αλβουμίνης ορού σε αντικατάσταση του ορού εμβρύου μόσχου (υπόστρωμα καθορισμένης σύνθεσης).

Πείραμα 1

Σκοπός του πειραματισμού αυτού ήταν να μελετηθεί η επίδραση της βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης στην ανάπτυξη των πρώιμων εμβρύων μετά από τροποποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων (IVC), με την προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων γκρελίνης. Οι παράμετροι, που εκτιμήθηκαν, ήταν το ποσοστό απόδοσης σε βλαστοκύστες τις ημέρες 7,8 και 9 και τα ποσοστά εκκόλαψης την ημέρα 9.

Χρησιμοποιήθηκαν 1819 COCs σε 4 ομάδες: μάρτυρες C, n=476· Ghr2000: n=511, με προσθήκη 2000 pg/ml γκρελίνης· Ghr800 n=365, με προσθήκη 800 pg/ml γκρελίνης, και Ghr200 n=467, με προσθήκη 200 pg/ml γκρελίνης. Συνολικά, διενεργήθηκαν 10 επαναλήψεις.

Πείραμα 2

Η μικρή ημιπερίοδος ζωής της γκρελίνης, και η παρουσία στον ορό (FCS) του παράγοντα αποακυλίωσης (APT1) αποτέλεσαν βασικές συνιστώσες για το σχεδιασμό του πειράματος αυτού. Έτσι, στο πείραμα αυτό το υπόστρωμα καλλιέργειας αντικαθίστατο καθημερινά σε 2 (ομάδες N) από τις 4 ομάδες. Σε 5 επαναλήψεις, χρησιμοποιήθηκαν 1420 COCs που κατανεμήθηκαν στις εξής ομάδες: Μάρτυρες C, n= 264· Μάρτυρες CN, n=353· Ghr800, n= 258 και Ghr800N, n=545. Με αναφορά στα αποτελέσματα του πειράματος 1, στον παρόντα πειραματισμό χρησιμοποιήθηκε μόνο η συγκέντρωση των 800 pg/ml. Πρέπει να σημειωθεί ότι η καθημερινή αντικατάσταση του υποστρώματος καλλιέργειας δεν έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ελέγχου δράσης ουσιών, που προστίθενται στα υποστρώματα εξωσωματικής.

Ομάδες των 10 βλαστοκύστεων ημέρας 7, καταψύχθηκαν με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο για απομόνωση mRNA. Στη συνέχεια, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγράφων των γονιδίων *GPX1*, *SOD2*, *IGF2R*, *SLC2A1*, *G6PD*, και *DNMT3A* με qRT-PCR. Πέραν της οξειδωσης (*GPX1*, *SOD2*), τα γονίδια αυτά έχουν συσχετισθεί με τον μεταβολισμό την ικανότητα ανάπτυξης και την ποιότητα των εμβρύων βοοειδών (Bermejo-Alvarez 2010 a, b).

Πείραμα 3

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της γκρελίνης στην ικανότητα ανάπτυξης των εμβρύων βοοειδών, που καλλιεργούνται *in vitro* σε υπόστρωμα καθορισμένης σύστασης (defined medium), δηλαδή χωρίς ορό (FCS), ο οποίος αποτελεί πηγή γλυκόζης. Σε 4 επαναλήψεις, χρησιμοποιήθηκαν 1190 COCs που κατανεμήθηκαν σε 4 ομάδες όπως στο πείραμα 2 : Μάρτυρες C n=304, Μάρτυρες CN n=388, Ghr800 n=255, και Ghr800N n=273, και ελέγχθηκαν τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων και εκκόλαψης.

Αποτελέσματα

Πείραμα 1

Μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά αυλάκωσης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων C, Ghr200, και Ghr2000. Αντίθετα, το ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων στην ομάδα Ghr800 ήταν σημαντικά μικρότερο από αυτό της ομάδας C. Τα συνολικά αποτελέσματα του πειραματισμού αυτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7.

Επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων βοοειδών με συμμετοχή διαφορετικών συγκεντρώσεων γκρελίνης (0, 2000, 800 και 200 pg/ml, ομάδες C, Ghr2000, Ghr800, και Ghr200, αντίστοιχα) στα ποσοστά αυλάκωσης, σχηματισμού βλαστοκύστεων και εκκόλαψης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι 10 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα

ομάδα	ζυγωτά	Αυλάκωση (%)	Βλαστοκ ημέρα7. (%)	Βλαστοκ ημέρα 8 (%)	Βλαστοκ ημερα 9 (%)	Εκκόλαψη* * ημέρα 8 (%)	Εκκόλαψη* ημέρα 9 (%)
C	476	362 76.0 \pm 2.8	119 25.0 \pm 1.8 ^a	138 29.0 \pm 1.3 ^a	140 29.4 \pm 1.7 ^a	30 6.4 \pm 0.4 ^a	56 11.8 \pm 1.0
Ghr2000	511	369 72.2 \pm 1.9	101 19.8 \pm 1.7 ^{ac}	121 23.7 \pm 2.0 ^{ac}	122 23.8 \pm 1.9 ^{ac}	27 5.3 \pm 0.2 ^a	46 9.0 \pm 0.3
Ghr800	365	253 69.3 \pm 2.0	57 15.6 \pm 2.5 ^{bc}	73 20.0 \pm 2.7 ^{bc}	79 21.6 \pm 2.9 ^{bc}	30 8.2 \pm 0.6 ^b	47 12.9 \pm 0.5
Ghr200	467	345 73.9 \pm 3.5	107 22.9 \pm 3.6 ^{ac}	114 24.4 \pm 2.4 ^{ac}	121 25.9 \pm 2.5 ^{ac}	28 6.0 \pm 0.4 ^a	49 10.5 \pm 0.6

Σε κάθε στήλη τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($p < 0.05$)

*τα ποσοστά εκκόλαψης υπολογίσθηκαν επί των ζυγωτών

Πείραμα 2

Η καθημερινή αντικατάσταση του υποστρώματος καλλιέργειας εμβρύων δεν επηρέασε το ποσοστό αυλάκωσης, ενώ αντέστρεψε τα αρνητικά αποτελέσματα, που προκλήθηκαν από τη γκρελίνη στην ανάπτυξη των εμβρύων, όταν η τελευταία δεν ανανεωνόταν καθημερινά.

Την ημέρα 7 στην ομάδα Ghr800N, το ποσοστό των βλαστοκύστεων ήταν το υψηλότερο μεταξύ όλων των ομάδων, ενώ την ημέρα 8 περισσότερες βλαστοκύστες παράχθηκαν στην ομάδα Ghr800N σε σχέση με αυτές των ομάδων CN και Ghr800. Την ημέρα 9, οι διαφορές στα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων περιορίστηκαν μεταξύ των δύο ομάδων της γκρελίνης, με μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα Ghr800N. Τα συνολικά αποτελέσματα επί της παραγωγής των εμβρύων δίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8

Απόδοση σε βλαστοκύστες σε ομάδες εμβρύων που καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε τροποποιημένα υποστρώματα με παρουσία 0 ή 800 pg/ml γκρελίνης . Τα υποστρώματα δεν ανανεώνονταν (ομάδες C και Ghr800) ή ανανεώνονταν καθημερινά (ομάδες CN και Ghr800N). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα (SEM).

Ομάδα	Ζυγωτά	Αυλάκωση (%)	Βλαστοκ ημέρα 7 (%)	Βλαστοκ ημέρα 8 (%)	Βλαστοκ ημέρα 9 (%)
C	264	200 75.85 \pm 2.04	64 24.24 \pm 3.12 ^a	75 28.40 \pm 1.81 ^{ac}	76 28.78 \pm 3.22 ^a
Ghr 800	258	189 73.26 \pm 1.61	39 15.12 \pm 3.58 ^b	51 19.77 \pm 4.22 ^b	53 20.54 \pm 3.91 ^{bc}
CN	353	264 74.79 \pm 1.24	85 24.08 \pm 1.17 ^a	87 24.65 \pm 1.04 ^a	91 25.78 \pm 2.11 ^{ab}
Ghr800 N	545	439 80.55 \pm 3.42	182 33.39 \pm 2.12 ^c	184 33.76 \pm 1.41 ^c	184 33.76 \pm 1.41 ^{ad}

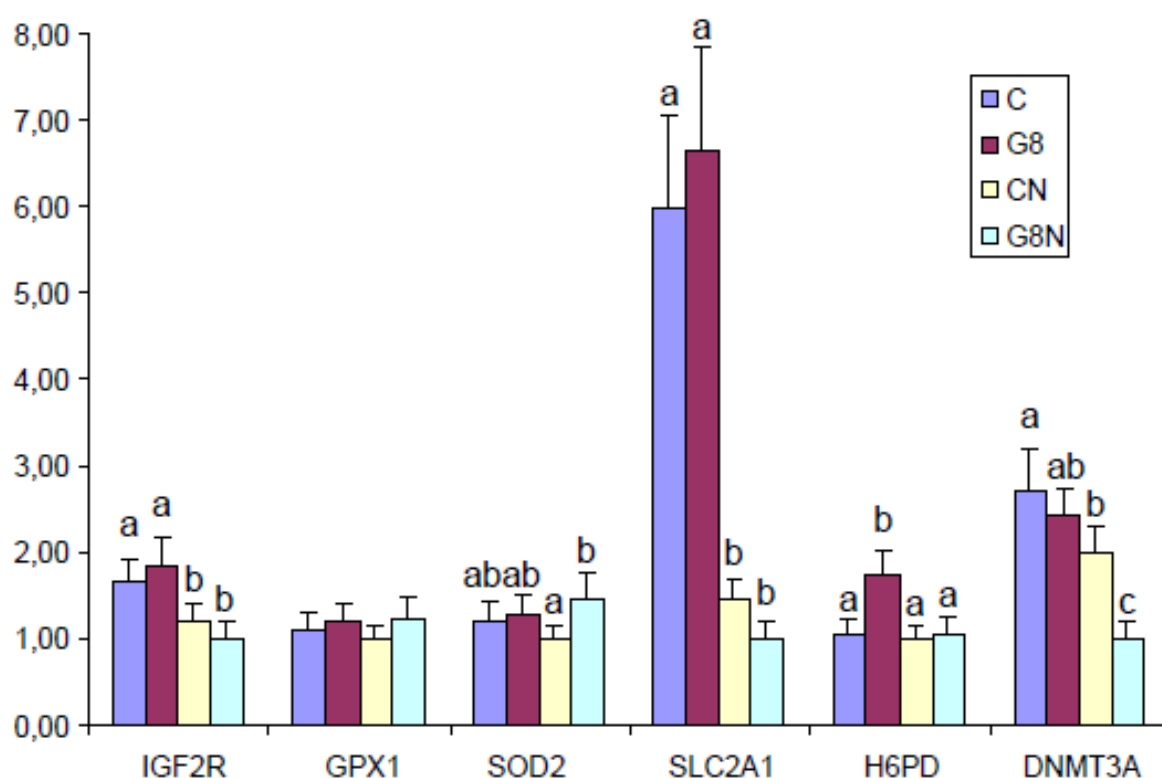
Σε κάθε στήλη τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά $p < 0.05$

Η ανάλυση της έκφρασης 6 γονιδίων (*IGF2R*, *SOD2*, *SLC2A1*, *G6PD*, *GPX1* και *DNMT3A*), που σχετίζονται με την ποιότητα των εμβρύων, έδειξε ότι η καθημερινή ανανέωση του καλλιεργητικού υποστρώματος προκαλεί σημαντική υποέκφραση των γονιδίων *IGF2R*, *GLUT1* και *DNMT3A* στις ομάδες CN και Ghr800N, σε σύγκριση με αυτή των ομάδων C και Ghr800. Η περισσότερο σημαντική μείωση του *DNMT3A* ανιχνεύθηκε στην ομάδα

Ghr800N. Στην ομάδα Ghr800 παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *H6PD*. Τα αναλυτικά αποτελέσματα της έκφρασης των 6 γονιδίων παρουσιάζονται στο Γράφημα 6.

Γράφημα 6

Ποσοτική έκφραση διαφόρων γονιδίων σε βλαστοκύστες ημέρας 7, που καλλιεργήθηκαν σε σταθερό ή καθημερινά ανανεωνόμενο υπόστρωμα, με την απουσία ή παρουσία 800rg/ml βόειας ακυλιωμένης γκρελίνης.



Σε κάθε τετράδα, στήλες με διαφορετικούς δείκτες διαφέρουν στατιστικά ($p < 0.05$)

Πείραμα 3

Η παρουσία γκρελίνης, ανεξαρτήτως του τρόπου με τον οποίο προστίθεται στην καλλιέργεια των εμβρύων, προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού παραγωγής βλαστοκύστεων σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Την ημέρα 7, τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων ήταν σημαντικά μικρότερα από αυτά του πειράματος 2. Συνολικά, τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9

Απόδοση σε βλαστοκύστες σε ομάδες εμβρύων, που καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε υπόστρωμα καθορισμένης σύνθεσης μετά από τροποποίηση του με προσθήκη 0 ή 800 pg/ml γκρελίνης. Τα υποστρώματα δεν ανανεώνονταν (ομάδες C και Ghr800) ή ανανεώνονταν καθημερινά (ομάδες CN και Ghr800N). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα (SEM).

Ομάδα	Ζυγωτά (n)	Αυλάκωση (%)	Βλαστοκ ημέρα 7 (%)	Βλαστοκ ημέρα 8 (%)
C	304	260 (85.3 \pm 2.4)	76 (25.9 \pm 2.2) ^{ac}	94 (30.9 \pm 2.5) ^a
Ghr	388	305 (78.6 \pm 3.8)	35 (8.8 \pm 1.6) ^b	73 (18.8 \pm 1.5) ^b
CN	225	200 (89.0 \pm 1.9)	63 (28.0 \pm 3.1) ^{ad}	75 (33.3 \pm 3.9) ^a
GhrN	273	242 (88.6 \pm 4.0)	54 (19.8 \pm 1.9) ^c	61 (22.3 \pm 2.9) ^b

Σε κάθε στήλη τιμές με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά $p < 0.05$

Συζήτηση

Με τη μελέτη αυτή προκύπτει για πρώτη φορά ότι η προσθήκη γκρελίνης στο υπόστρωμα καλλιέργειας εμβρύων επηρεάζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη των εμβρύων και ότι η επίδραση αυτή είναι ανάλογη της χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης και της χρονικής διάρκειας έκθεσης των εμβρύων σε αυτήν. Και στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γκρελίνης, δηλαδή 200 pg/ml, συγκέντρωση που αντιπροσωπεύει την ποσότητα της γκρελίνης στην κυκλοφορία του αίματος πριν την προγραμματισμένη λήψη τροφής, μία δεκαπλάσια συγκέντρωση, 2000 pg/ml και αυτή των 800 pg/ml, που είναι η μεγαλύτερη συγκέντρωση, που έχει μετρηθεί στις αγελάδες μετά από 48ωρη νηστεία (Wetrz-Lutz et al 2006).

Είναι γνωστό ότι το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο μειώνει τη γονιμότητα σε πολλά είδη θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Ελλιπής διατροφή στον άνθρωπο ή ανικανότητα των ζώων να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες της υψηλής γαλακτοπαραγωγής, οδηγούν σε διαταραγμένη έκκριση γοναδοτροπινών, κυρίως λόγω ανεπαρκούς έκκρισης GnRH από τον υποθάλαμο (Canfield and Butler 1990, Aloï et al 1997, Roche et al 2000, Fernandez-Fernandez et al 2006, Wathes et al 2007, Usdan et al 2008). Παράλληλα, κάτω από τις συνθήκες αυτές, προκαλείται υπερέκκριση και αύξηση της συγκέντρωσης της γκρελίνης. Θα μπορούσε λοιπόν να υποτεθεί ότι σε περιόδους μειωμένης πρόσληψης τροφής ή φυσιολογικά αυξημένης ενεργειακής απώλειας, όπως κατά τη διάρκεια της περιόδου υψηλής γαλακτοπαραγωγής στις αγελάδες, η γκρελίνη αποτελεί έναν

ενδογενή αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού, προστατεύοντας τον από την επιπλέον απώλεια ενέργειας, που απαιτείται για την αναπαραγωγή.

Η φυσιολογική διακύμανση της συγκέντρωσης της γκρελίνης στο ωοθυλακικό υγρό των αγελάδων, δεν έχει ακόμα μετρηθεί. Στον άνθρωπο όμως, η συγκέντρωση της γκρελίνης στο ωοθυλακικό υγρό είναι περίπου 400 pg/ml και συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωσή της στον ορό (290-400 pg/ml, Li et al 2011). Με βάση τα παραπάνω, θεωρήθηκε ότι οι δύο πρώτες συγκεντρώσεις (200 και 800 pg/ml) αντανakλούν τη συγκέντρωση της ορμόνης στο ωοθυλακικό υγρό της αγελάδας κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης τροφής, αντίστοιχα.

Στο πρώτο πείραμα, το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη στο υπόστρωμα καλλιέργειας 200 pg/ml ή 2000 pg/ml γκρελίνης, σε αντίθεση με τα 800 pg/ml, που μείωσαν σημαντικά την ανάπτυξη των εμβρύων. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η δράση της γκρελίνης εμφανίζεται όταν η συγκέντρωσή της είναι πάνω από ένα όριο, χωρίς όμως να εμφανίζεται τυπικά δόσοεξαρτώμενη δράση. Η παρατήρηση αυτή αν και δύσκολο να ερμηνευτεί, έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες. Σε μια μελέτη, που περιγράφει τη δράση της γκρελίνης στον πολλαπλασιασμό και στη σύνθεση προγεστερόνης από τα κύτταρα του πλακούντα στον άνθρωπο, αναφέρεται ότι συγκεντρώσεις 250 ή 500 pg/ml, επάγουν υψηλότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έκκριση προγεστερόνης σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 100 ή 1000 pg/ml (Rak-Mardyla and Gregoraszczyk 2010). Ομοίως, σε πειράματα *in vitro* παραγωγής εμβρύων στους χοίρους, η προσθήκη 5 ng/ml γκρελίνης στο υπόστρωμα καλλιέργειας βελτίωσε τα ποσοστά παραγωγής εμβρύων, κάτι που δεν συνέβη με την

προσθήκη 10πλάσιας ή μικρότερης ποσότητας (Zhang et al 2007). Παρά όμως την αρνητική επίδραση στην παραγωγή εμβρύων στην ομάδα Ghr800 του πρώτου πειράματος, στην ίδια ομάδα εντοπίστηκε το υψηλότερο ποσοστό εκκόλαψης εμβρύων, κάτι που αποτελεί ένδειξη βελτιωμένης ποιότητας των παραγόμενων εμβρύων. Με βάση αυτή την παρατήρηση, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο αυτή τη συγκέντρωση στα επόμενα πειράματα.

Η καθημερινή ανανέωση των υποστρωμάτων καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού σχηματισμού βλαστοκύστεων στην ομάδα της γκρελίνης, ενώ παράλληλα στην ομάδα των μαρτύρων παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του ίδιου ποσοστού. Η τελευταία παρατήρηση θεωρείται ως το αναπόφευκτο αρνητικό αποτέλεσμα των απαιτούμενων καθημερινών χειρισμών των εμβρύων και της καθημερινής έκθεσής τους στο φως.

Στοιχεία από την περιορισμένη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η επίδραση της γκρελίνης στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων είναι εξαρτώμενη από το είδος του ζώου. Για παράδειγμα, στους χοίρους η γκρελίνη ενισχύει την παραγωγή εμβρύων, ενώ αντίθετα τη μειώνει στα ποντίκια (Kawamura et al 2003, Zhang et al 2007). Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, η επίδραση της γκρελίνης φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη αλλά όχι γραμμικά, τόσο στην *in vitro* ωρίμανση ωαρίων όσο και στην καλλιέργεια εμβρύων προβάτων. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι η δόση, που χρησιμοποιήθηκε ήταν εξαιρετικά υψηλή σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές που καταγράφονται στα πρόβατα (Wang et al 2013). Στα πρόβατα, έχει μετρηθεί η έκφραση των γονιδίων της γκρελίνης και του υποδοχέα της (ghrelin mRNA και *GHSR-1a* mRNA) στα

wάρια, που ωρίμασαν *in vitro* και στα έμβρυα, που καλλιιεργήθηκαν / αναπτύχθηκαν *in vitro*. Η ποσοτική τους έκφραση είναι ανάλογη του σταδίου ωρίμανσης των ωαρίων και του σταδίου ανάπτυξης των εμβρύων (Du et al 2010). Στο βαθμό που είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, μόνο μια μελέτη υπάρχει για τα βοοειδή (Dashtizad et al 2010), η οποία όμως δίνει πενιχρές πληροφορίες ως προς τον τύπο της γκρελίνης που χρησιμοποιήθηκε και τις συνθήκες πειραματισμού. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση της γκρελίνης που χρησιμοποιήθηκε κυμαινόταν από 5 έως 1000 ng/ml, οι οποίες αποτελούν εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες σε σχέση με τις φυσιολογικές *in vivo* συγκεντρώσεις της γκρελίνης στις αγελάδες. Σ' αυτή τη μελέτη, μόνο η συγκέντρωση των 50 ng/ml γκρελίνης έχει θετική επίδραση τόσο στο ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων όσο και στον αριθμό των εμβρυϊκών κυττάρων. Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι η γκρελίνη ασκεί την επίδρασή της μέσα από ένα συγκεκριμένο εύρος συγκέντρωσης και σε κάθε περίπτωση η δράση της δεν είναι δοσοεξαρτώμενη.

Η καθημερινή ανανέωση του υποστρώματος καλλιέργειας κατέστειλε την έκφραση του γονιδίου *IGF2R*. Είναι γνωστό ότι το *IGF2R* είναι ένα γονίδιο προερχόμενο από τη μητέρα (maternal imprinted gene) η υπερέκφραση του οποίου έχει συνδεθεί μαζί και με άλλους παράγοντες ως μια από τις αιτίες του συνδρόμου του μεγάλου απόγονου (large offspring syndrome) και της διαταραγμένης εγκατάστασης του εμβρύου στη μήτρα στα μηρυκαστικά (perturbed placentation) (Young et al 2001). Στις δύο ομάδες, που τα υποστρώματα καλλιέργειας δεν άλλαζαν καθημερινά, η υπερέκφραση του *IGF2R* πιθανόν να οφείλεται στη συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών,

προερχόμενων από τον ορό που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα (Young et al 2001, Killian et al 2001).

Παράλληλα, η μεταβολή στην έκφραση και άλλων γονιδίων ενισχύει την υπόθεση ότι η καθημερινή αλλαγή του υποστρώματος καλλιέργειας με γκρελίνη βελτιώνει την ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων. Μια πρώτη ένδειξη είναι η μείωση της έκφρασης του *DNMT3A*, που σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη έχει συνδεθεί με αυξημένο δυναμικό ανάπτυξης των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Sagirkaya et al 2006). Αν και η καθημερινή αλλαγή των υποστρωμάτων μείωσε την έκφραση του γονιδίου τόσο στην ομάδα των μαρτύρων όσο και στην ομάδα της γκρελίνης, η μείωση ήταν ιδιαίτερα υψηλή στη δεύτερη ομάδα.

Το πιο ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι μια συγκεκριμένη συγκέντρωση γκρελίνης, όταν προστίθεται για μία μόνο φορά στο υπόστρωμα καλλιέργειας, καταστέλλει την ανάπτυξη των εμβρύων, ενώ η συνεχής έκθεση των εμβρύων στην ίδια συγκέντρωση ενισχύει την ανάπτυξη τους. Τονίζεται όμως ότι η παρατήρηση αυτή αφορά μόνο στα πειράματα, στα οποία η καλλιέργεια των εμβρύων γινόταν με συμμετοχή ορού (FCS) στο υπόστρωμα. Όταν η καλλιέργεια έγινε σε καθορισμένης σύνθεσης υπόστρωμα, χωρίς FCS, η παραγωγή βλαστοκύστεων με την παρουσία γκρελίνης ήταν πάντα μικρότερη από αυτήν του αντίστοιχου μάρτυρα. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν μέσα από δύο υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση σχετίζεται με την κατανάλωση γλυκόζης από τα έμβρυα σε σχέση με το χρόνο και τη διαθεσιμότητα των αποθεμάτων γλυκόζης. Έχει βρεθεί ότι σε έμβρυα 8 κυττάρων, που προέρχονται από εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων, υποεκφράζονται τα γονίδια που σχετίζονται είτε με τη γλυκόλυση ή με τη

μεταφορά γλυκόζης (Iwata et al 1998). Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ενδεχομένως ένδειξη ανεπάρκειας ενεργειακών αποθεμάτων των IVP εμβρύων ή ένδειξη ανεπαρκούς ικανότητας αξιοποίησης της υπάρχουσας ενέργειας από αυτά. Έτσι, ενώ τα γλυκολυτικά ένζυμα έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου, φαίνεται ότι στα *in vitro* παραγόμενα έμβρυα υπάρχει σχετική ανεπάρκεια των ενζύμων αυτών (Iwata et al 1998). Και στα δύο πειράματα, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο ποσοστό αυλάκωσης των εμβρύων, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί μέσω των μηχανισμών κατανάλωσης ενέργειας των πρώιμων εμβρύων. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι μέχρι 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, τα έμβρυα μεταβολίζουν σχεδόν αποκλειστικά πυροσταφυλικό οξύ- στη συνέχεια το εμβρυϊκό γονιδίωμα ενεργοποιείται και η γλυκόζη γίνεται η κυρίαρχη πηγή ενέργειας για το έμβρυο (Rieger et al 1992). Είναι γνωστό ότι η γκρελίνη αυξάνει την πρόσληψη και τη χρήση γλυκόζης σε διάφορους τύπους κυττάρων μέσω των MAPK και PI3/Akt μονοπατιών (Baltanzi et al 2002, Kim et al 2004). Εάν το ίδιο σενάριο ισχύει και για τα εμβρυϊκά κύτταρα, μπορεί να υποτεθεί ότι με την παρουσία της γκρελίνης ενεργοποιείται κάποια συγκεκριμένη μεταβολική οδός, αλλά η απρόσκοπτη λειτουργικότητα της είναι στενά συνδεδεμένη με τη συνεχή παρουσία ακυλιωμένης γκρελίνης και διαθέσιμης προς χρήση γλυκόζης. Όταν λοιπόν τα έμβρυα εκτίθενται για μια φορά στην γκρελίνη, η συγκεκριμένη οδός ενεργοποιείται, ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης από τα έμβρυα αυξάνεται, οδηγώντας τελικά στην έλλειψη γλυκόζης στο υπόστρωμα καλλιέργειας και αφήνοντας τα έμβρυα χωρίς ενεργειακά αποθέματα. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται από την υπερέκφραση του γονιδίου *G6PD*. Παράλληλα, στα υποστρώματα

καθορισμένης σύστασης, τα οποία δεν περιείχαν την πηγή της γλυκόζης, η γκρελίνη προκάλεσε σημαντική μείωση των ποσοστών ανάπτυξης βλαστοκύστεων, σε σύγκριση με αυτά μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα που περιείχε FCS. Η παρατήρηση αυτή ίσως είναι ενδεικτική του ότι η γκρελίνη καθιστά τα έμβρυα εξαρτώμενα από τη γλυκόζη. Από την άλλη μεριά, είναι γνωστό ότι μόνο η ακυλιωμένη μορφή της γκρελίνης έχει ενεργή βιολογική δράση, αλλά ο ορός (FCS που αποτελεί συστατικό του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε στην καλλιέργεια) περιέχει τον APT1, ο οποίος είναι ο παράγοντας αποακυλίωσης της γκρελίνης, που αποστερεί από τη γκρελίνη πολλές από τις βιολογικές της ιδιότητες (Satou et al 2010). Κατά συνέπεια, σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, ένα μεταβολικό μονοπάτι ενεργοποιείται, αλλά πολύ σύντομα, το ερέθισμα, ενεργός γκρελίνη και το υπόστρωμα, η γλυκόζη, εκλείπουν. Ως αποτέλεσμα όλων αυτών, μόνο τα υψηλής ποιότητας έμβρυα επιβιώνουν, υπόθεση που τεκμηριώνεται και από το υψηλό ποσοστό εκκόλαψης των συγκεκριμένων εμβρύων (ποσοστό εκκόλαψης: C 40%, Ghr800 59.5%). Η υπόθεση ισχυροποιείται από τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος, όταν η καθημερινή ανανέωση της γκρελίνης οδήγησε σε πολύ υψηλά ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων (σχεδόν 40% περισσότερο από τους μάρτυρες, και περισσότερο από 100% σε σχέση με τα έμβρυα, που εκτέθηκαν μόνο μια φορά στη γκρελίνη –πειρ.1). Αντίθετα όμως, στο πείραμα 3, όταν δεν υπήρχε γλυκόζη, τα ποσοστά παραγωγής βλαστοκύστεων με την παρουσία γκρελίνης ήταν σταθερά μειωμένα. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η συνεχής παροχή ενεργούς γκρελίνης συντηρεί τη δράση του ενεργοποιημένου μεταβολικού μονοπατιού, αυξάνοντας τον καταβολισμό γλυκόζης από τα αναπτυσσόμενα έμβρυα.

Έχει βρεθεί ότι η γκρελίνη προάγει τον πολλαπλασιασμό και μειώνει την απόπτωση σε παγκρεατικά κύτταρα ανθρώπου, μειώνοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης του cAMP, της αύξησης της φωσφορυλώσης της ERK 1/2 και ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3/Akt (Granata et al 2007). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι η γκρελίνη αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης SOD στα καρδιακά κύτταρα, δρώντας ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (Xu et al 2008). Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε από το 2^ο πείραμα της παρούσας μελέτης, στο οποίο το γονίδιο SOD υπερ-εκφράστηκε στην ομάδα των εμβρύων, που καλλιεργήθηκαν με γκρελίνη, σε σχέση με τους μάρτυρες. Είναι γνωστό ότι ο υψηλός μεταβολικός ρυθμός προδιαθέτει στην παραγωγή ROS, οι οποίες έχουν καταστροφικά αποτελέσματα για το σχηματισμό και τη μετέπειτα ανάπτυξη των εμβρύων (Donnay et al 2002). Εμπλουτισμός του υποστρώματος IVC με συμβατικά ενδογενή αντιοξειδωτικά καλλιέργειας εμβρύων έχει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ευεργετική επίδραση στο σχηματισμό βλαστοκύστεων (de Mattos et al 2002, Agarwal et al 2005, Correa et al 2008). Η καθημερινή ανανέωση των υποστρωμάτων καλλιέργειας φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες των εμβρυικών κυττάρων. Ισχυρή ένδειξη για την υπόθεση αυτή αποτελεί η μείωση της έκφρασης του SLC2A1 γονιδίου, το οποίο θεωρείται ένας κλασσικός δείκτης κυτταρικού στρες. Με δεδομένο ότι η συσσώρευση των ROS επάγει την αύξηση μεταγραφής του SLC2A1, η μειωμένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου που καταδείχθηκε στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να οφείλεται σε ελεγχόμενες ή μειωμένες οξειδωτικές αντιδράσεις (van Hoek et al 2011). Έτσι, τα αποτελέσματα του

2^{ου} πειράματος μπορούν να αποδοθούν σε μεγάλο βαθμό στις αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες της γκρελίνης.

Από τα πειράματα του Κεφαλαίου αυτού προκύπτει ότι η παρουσία γκρελίνης στα υποστρώματα καλλιέργειας εμβρύων βοοειδών μπορεί να έχει θετική ή αρνητική δράση αναλόγως του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος, της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης των εμβρύων σε αυτήν, υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα διενέργειας περισσότερων και απόλυτα στοχευμένων μελετών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαίωσαν τις αρχικές υποθέσεις ότι α) τα εξωγενή αντιοξειδωτικά σε συνθήκες IVP, που δεν ενισχύουν την ανάπτυξη οξειδωτικών φαινομένων, δεν βελτιώνουν την απόδοση ή την ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων και β) ότι ο πιθανά θετικός ρόλος των ενδογενών αντιοξειδωτικών είναι το συνδυαστικό αποτέλεσμα όλων των βιολογικών δράσεων των ουσιών αυτών.

Ειδικότερα:

1. Διαπιστώθηκε ότι η ενσωμάτωση του γουαΐαζουλενίου στα υποστρώματα IVM και IVC, ανεξάρτητα της συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε, δεν επέδρασε στα ποσοστά παραγωγής εμβρύων και την ποιότητά τους. Φαίνεται λοιπόν, ότι η αντιοξειδωτική θωράκιση, που απαιτείται κατά τη διάρκεια της IVP, πρέπει να παρέχεται στα έμβρυα πρωτίστως από τις συνθήκες καλλιέργειας, οι οποίες θα πρέπει να αποτρέπουν την αθρόα παραγωγή ROS, ενώ η συνεισφορά των προστιθέμενων εξωγενών αποκλειστικά αντιοξειδωτικών ουσιών στα υποστρώματα, είναι μάλλον αμελητέα.
2. Η δράση της γκρελίνης στην ωρίμανση των ωαρίων είναι δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη. Βρέθηκε ότι η γκρελίνη, ως αντιοξειδωτική ουσία, παρέχει αντιοξειδωτική προστασία τόσο στα ωάρια όσο και στα έμβρυα. Όμως, ταυτόχρονα, η αντιαποπρωτική της δράση, η επαγόμενη ρύθμιση του μεταβολισμού των COCs και ο περιορισμός επιγενετικών φαίνεται ότι υπερκεράζουν την αντιοξειδωτική της δράση. Τα ευρήματα αυτά εκτιμάται ότι μπορούν να αξιοποιηθούν στις εφαρμογές της IVP στα βοοειδή και στον άνθρωπο, υποδεικνύοντας ότι οι περίοδοι, που υπάρχει υπεργκρελιναιμία δεν είναι ενδεδειγμένες για συλλογή και εξωσωματική ωρίμανση ωαρίων για IVP. Οι ενδείξεις για βελτίωση της ποιότητας των εμβρύων, που

παράγονται από ωάρια που ωρίμασαν με την παρουσία γκρελίνης για περιορισμένο χρόνο, υποδεικνύει την ανάγκη διενέργειας περισσότερων πειραματισμών με σκοπό να διερευνηθεί ο ακριβής ρόλος της στην ικανότητα εξέλιξης του ωαρίου.

3. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία γκρελίνης στα υποστρώματα καλλιέργειας εμβρύων βοοειδών μπορεί να έχει θετική ή αρνητική δράση ανάλογα του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος, της συγκέντρωσης της καθώς και του χρόνου έκθεσης των πρώιμων εμβρύων σε αυτήν.
4. Η αποκρυπτογράφηση του επακριβούς ρόλου της γκρελίνης στη διαδικασία εξέλιξης του πρώιμου εμβρύου θα μπορούσε να γίνει σε επόμενα πειράματα σε ατομικές καλλιέργειες εμβρύων μετά από καθημερινό προσδιορισμό της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής γαλακτικού οξέος αυτά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή Υποστρωμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS)

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

Η παρασκευή 500ml διαλύματος γινόταν ως ακολούθως:

Βασικό διάλυμα 1

	gr
NaCl	4.000
KCl	0.100
KH ₂ PO ₄	0.100
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0.715

Τα συστατικά διαλύονται σε 250 ml H₂O

Βασικό διάλυμα 2

	gr
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.070
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.100

Τα συστατικά διαλύονται σε 50 ml H₂O

Μετά από καλή ανάμειξη των βασικών διαλυμάτων 1 και 2, ενσωματώνονταν τα παρακάτω υλικά

	gr
D- glucose	0.500
Pyruvate	0.018
Gentamycin	2.5 ml

Το νέο διάλυμα αναμιγνύονταν και προστίθονταν H₂O μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Μετά από έλεγχο της ωσμωτικής πίεσης (280mOsm) προστίθονταν 0.25gr βόειας αλβουμίνης (BSA, A9647) και ελέγχονταν το pH του διαλύματος (7.2-7.4). Το διάλυμα αποστειρώνονταν μηχανικά, μέσω διέλευσής του από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm, και μπορούσε να συντηρηθεί στους 4°C έως και 1 μήνα.

Υπόστρωμα Tyrode's (TALP)

Το υπόστρωμα Tyrode's αποτελεί το βασικό συστατικό διάλυσης των αντιδραστηρίων, που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των υποστρωμάτων επεξεργασίας του σπέρματος.

Tyrode's medium σε όγκο 250 ml

Βασικό διάλυμα 1 σε 150 ml H₂O

	gr
NaCl	1.666
KCl	0.060
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0.010

Βασικό διάλυμα 2 σε 100 ml H₂O

	gr
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.075
MgCl ₂ *6H ₂ O	0.025

Μετά από καλή ανάμειξη των βασικών διαλυμάτων 1 και 2, προστίθεντο 0.0025 gr ερυθρό της φαινόλης (χρωστική ένδειξης pH).

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

Για την προετοιμασία των διαλυμάτων *Sp-TALP* και *Fert-TALP*, αρχικά ετοιμαζόταν ένα κοινό διάλυμα και για τα δύο υποστρώματα, χρησιμοποιώντας 20 ml Tyrode's medium, ως βασικό συστατικό.

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
NaHCO ₃	0,043 g
Πυροσταφυλικό νάτριο	0,0022 g
DL- γαλακτικό νάτριο	61,3 μl
Γενταμικίνη	100 μl

Το παραπάνω διάλυμα χωρίζονταν σε δύο αποστειρωμένα δοχεία (10 ml το καθένα), για την παρασκευή των τελικών υποστρωμάτων *Sp-TALP* και *Fert-TALP*:

Swim up medium (10ml)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα (gr)</u>
BSA (A 7030)	0,060
Hepes	0.024

IVF medium(10ml)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
BSA (A 7030)	0,060 g
Μη απαραίτητα αμινοξέα	
–MEMaa (100x)*	100 μl
Αμινοξέα- BMEaa (50x)*	200 μl
Ηπαρίνη (2 mg/ml)	50 μl
Υποταυρίνη (100 mg/ml)	100 μl

Τα διαλύματα αποστειρώνονταν μηχανικά, μέσω διέλευσής τους από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm και μπορούσαν να συντηρηθούν στους 4° C έως και 15 ημέρες. Μία μέρα πριν την χρησιμοποίησή τους στην *in vitro* γονιμοποίηση τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο CO₂ για εξισορρόπηση του pH και διατήρηση της θερμοκρασίας τους στους 39° C.

Συνθετικό υγρό ωαγωγού (Synthetic oviductal fluid, SOF)

Για την προετοιμασία του SOF προηγούνταν η παρασκευή τεσσάρων βασικών διαλυμάτων

Βασικό διάλυμα Α (όγκος σε 49.7 ml H₂O)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
NaCl	3.145 gr
KCl	0.267 gr
KH ₂ PO ₄	0.081gr
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.091gr
DL- γαλακτικό νάτριο	0.3 ml

Βασικό διάλυμα Β (όγκος σε 50 ml H₂O)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
NaHCO ₃	1.05gr
Ερυθρό της φαινόλης	0.005gr

Βασικό διάλυμα Γ (όγκος σε 10 ml H₂O)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
Πυροσταφυλικό νάτριο	0.080gr

Βασικό διάλυμα Δ (όγκος σε 50 ml H₂O)

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,310gr

Όλα τα βασικά διαλύματα αποστειρώνονταν μηχανικά, μέσω διέλευσής τους από ηθμό διαμέτρου 0.22 μm, και μπορούσαν να συντηρηθούν στους 4°C έως και 1 μήνα (διαλύματα Α, Β, και Δ) . Το διάλυμα Γ συντηρο μόνο για 1 εβδομάδα.

Τελικό διάλυμα SOF κατά Holm et al (1999) για τελικό όγκο 100 ml

<u>Υλικό</u>	<u>Ποσότητα</u>
H ₂ O	78 ml
Κιτρικό νάτριο	0.010 gr
Μυο-ινοσιπόλη	0.050 gr
Βασικό διάλυμα Α	10 ml
Βασικό διάλυμα Γ	1 ml
Βασικό διάλυμα Δ	1 ml
BME	3 ml
MEM	1 ml
L-γλουταμίνη	100 μl
Γενταμικίνη	500 μl
Βασικό διάλυμα Β	10 ml

Μετά από έλεγχο της ωσμωτικής πίεσης (270-280mOsm), προστίθεντο 0.3 gr βόειας αλβουμίνης (BSA, A9647). Το διάλυμα αποστειρωνόταν μηχανικά, μέσω διέλευσής του από ηθμό διαμέτρου 0.22μm και μπορούσε να συντηρηθεί στους 4°C έως και 15 ημέρες. Στις περιπτώσεις που επιλέγεται η ενσωμάτωση ορού εμβρύου μόσχου (FCS), αυτός προστίθεται στο υπόστρωμα της IVC πριν τη χρησιμοποίησή του.

Επιπλέον, η χρήση FCS απαιτεί προηγούμενη αδρανοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με σταδιακή και ήπια απόψυξη (θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες) και εν συνεχεία θέρμανση στους 56°C για 30 min. Με αυτόν τον

τρόπο απενεργοποιούνται α) οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν λύση των κυττάρων, β) αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης, γ) μυκοπλάσματα, που ενδεχομένως εμπεριέχονται στον ορό. Μετά την απενεργοποίησή του ο ορός κατανέμεται σε φιαλίδια σε όγκο 1ml και συντηρείται στους -20°C . Επισημαίνεται ότι με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται η ομοιομορφία των πειραματισμών, καθόσον σε όλες τις φάσεις όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε FCS της ίδιας προέλευσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK 2005 Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 28
- Agarwal A, Saleh AR, Bedaiwy MA 2003 Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79, 829–843
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R 2005a Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 11, 641-650.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK 2005b Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 28
- Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Nanerjee J, Alvarez JG 2006 Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting *Fertil. Steril.* 86, 503-512
- Aitken RJ, Buckingham DW, West K, Brindle J 1996 On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am J Reprod Immunol* 35, 541-551
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1989 *Molecular Biology of the Cell*. Garland publishing Inc London
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA 2003 Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59, 939-949
- Aloi JA, Bergendahl M, Iranmanesh A, Veldhuis JD 1997 Pulsatile intravenous gonadotropin-releasing hormone administration averts fasting-induced hypogonadotropism and hypoandrogenemia in healthy normal weight men. *J. Clin Endocrinol Metab* 82: 1543-1548
- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA 2008 Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine

cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod* 79, 209-222

Baker MA, Aitken RJ 2005 Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origin of genetic disease and infertility. *Reprod Biol. Endocrinol* 3, 67

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, et al. 2002 Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK-1/2 and PI3-kinase /AKT. *J Cell Biol* 159: 1029-37

Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, et al. 2003 "Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 8877-8880

Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A 2010a Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 3394-3399.

Bermejo-Alvarez PL, P Lonergan. D Rizos, A Gutierrez-Adan 2010 Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod BioMedicine Online* 20, 341-349.

Blondin P, Coenen K, Sirard MA 1997 The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18, 454-60.

Bradford BJ, Allen MS 2008 Negative energy balance increases peripheral ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Dom Anim Endoc* 34, 196-203.

Bryant J 2007 Theories of fertility decline and the evidence from development indicators. *Popul Dev Rev* 33, 101-127

Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR 1996 beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod* 55,1179-1184

Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, and Watson AJ 2001 Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2(PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* 65, 135-140

Camino JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E and Diéguez C 2003 Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144, 1594-1602

Canfield RW, Butler WR 1990 Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum cattle. *Dom Anim Endocrinol* 7: 323-30

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE 1992 Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305, 609-613

Catt JW, Henman M 2000 Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 15(Suppl 2),199-206

Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT 2001 Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 51, 57-64

Chanoine JP and Wong AC. 2004 Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology* 145, 3813-3820

Chi MM, Manchester JK, Yang VC, Curato AD, Strickler RC, Lowry OH 1988 Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol of Reprod* 39:295–307

Choi WJ, Banerjee J, Falcone T, Bena J, Agarwal A, Sharma RK 2007 Oxidative stress and tumor necrosis factor- α induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertil Steril* 88,(4 suppl) 1220-1231

Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F 2009 Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134, 645-650

Correa GS, Rumpf R, Mundim TCD, Franco MM, Dode MAN 2008 Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effects in production and

expression of genes relates to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* 104, 132-142.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grovw KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, and Horvath TL 2003 The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649-661

Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P 2005a Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim* 40, 93-97

Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT 2005b Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 29, 209-212

Dashtizad M, Wahid H, Rosnina Y, Daliri M, Hajararian H, Abas Mazni O 2010 Ghrelin improves the development of bovine preimplantation embryos in vitro. *Reprod Biomed Online suppl* 3: S60-61

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A Mondal MS, Suganuma T Matsukura S 2000. 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, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M 2002. Ghrelin is present in pancreatic alpha cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 124-129

de Lamirande E and Gagnon C 1993 A positive role of the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation in human spermatozoa. *Int J Androl* 16, 21-25

de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C 1997 Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-94

de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, and Kruip TA 1989 Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24, 197-204

de Matos DG, Furnus CC, 2000 The importance of having high glutathione (GSH)

level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53, 761-71

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H 1995 Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 42, 432-6.

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M 1996 Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45, 451-7

de Mattos DG, Herrera C, Cortvindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS 2002 Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of in vitro embryo production. *Molecul Reprod Develop* 62, 203-09.

Deaver SE, Hoyer PB, Dial SM, Field ME, Collier RS, Rhoads ML 2013 Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. *J Dairy Sci* 96, 150-157

Dimitriadis I, Rekkas EA, Vainas E, Amiridis GS, and Rekkas CA 2007 Effects of guaiazulene on in vitro embryo production. *Reprod Fert Dev* 19, 262

Dimitriadis I 2006 Modification of the in vitro bovine embryo production media using guaiazulene and melatonin. PhD Thesis, University of Thessaly, Veterinary Faculty

Donnay I, Feugang JM, Bernard S, Marchandise J, Pampfer S, Moens A, Dessy F 2002 Impact of adding 5.5mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocysts stage. *Zygote* 20, 189-99

Dovolou E, Chadio S, Messinis IE, Rekkas C, Deligiannis C, Kalogiannis D, and Amiridis GS 2013 Human ghrelin decreases pituitary response to GnRH in superovulated ewes. *Theriogenology* 80, 262-8

Du C, Li H, Cao G, Xilingawoa, 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. *Reprod Dom Anim* 45, 92-98

du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A 2008 Impact of oxidative stress on IVF Exp Rev Obstet Gynecol 3, 539-554

Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Rame C, Froment P 2010 Ghrelin in Female and Male Reproduction . Int. J. Pept. ID 158102, 8 pages

El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M (2007) In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. J Gastroenterol Hepatol. 22, 1791-1799

Eligini S, Arenaz I, Barbieri SS, Faleri ML, Crisci M, Tremoli E, Colli S 2009 Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. Free Radic Biol Med 46, 1428-1436

El Moutassim S, Guerrin P, Menezo YJR 1999 Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during final stages of maturation Molec Hum Reprod 5, 720-725

El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D 2006 Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. Physiol Genomics 28 84-96

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM 1999 Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. Mol Endocrinol 13:1035-1048

Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navvaro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, et al. 2006 Novel signals for the interaction of energy balance and reproduction. Mol Cell Endocrinol 254-255: 127-32

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L 2004 Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. Neurosci. Lett. 362, 103-107

Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, Bhattacharya S, Casilla JA, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A 2012 Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. Human Reprod 27,9, 2571-2584

Feugang JM, De Roover R, Moens A, Leonard S, Dessy F, and Donnay I 2004 Addition of β -mercaptoethanol or Trolox at the morula-blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* 61, 71-90

Fischer B, Bavister BD 1993 Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 673-679.

Fissore RA, He CL, Vande Woude GF 1996 Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55, 1261-1270

Forbes S, Li XF, 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. *Neurosci. Lett.* 460, 143-147

Forman H J and Fisher AB 1981 Antioxidant defences. In: Gilbert DL (ed) *Oxygen and living processes*. Springer, New York Heidelberg Berlin , 235-249

Fruehauf JP, Meyskens FL Jr, 2007 Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13, 789-794

Fukuda A, Nodar Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T 1987 Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J in vitro fertil and Embryo Transf* 4, 40-45

Furuta M, Funabashi T, Rimura F 2001 Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Com* 288, 780–785

Galli C 2003 Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-615

Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA 2007 Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, 697-704

Gauna C, Uitterlinden P, Kramer P, et al. 2007 Intravenous glucose administration in fasting rats has differential effects on acylated and unacylated ghrelin in the portal

and systemic circulation: a comparison between portal and peripheral concentrations in anesthetized rats. *Endocrinology* 148, 5278-5287

Gazzerio E, Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Stadmeier L, Durant D, Economides AN, Canalis E 2007 Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 282, 31549-31557

Gibb CA, Poronok P, Day ML et al Control of cytosolic pH in 2-cell embryos role of H⁺/ lactate cotransport and Na/H exchange. *Am J Physiol* 273, C 404-419

Gordon I 1994 Laboratory production of cattle embryos. CAB international, Wallingford, Oxon UK, 1st ed.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M 1993 Increased generation of ROS in embryos cultured in vitro. *Free radic Biol Med* 15, 69-75

Granata R, Settani F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, et al. 2007 Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic β - 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: 512-29

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, and Howard AD 1997 Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res* 48: 23-29

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y 2001 Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings *Hum Reprod Update* 7, 175-189

Gutteridge LMC 1995 Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41, 819-828

Gutierrez-Adan A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP, and Lonergan P 2004 Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 68, 441-448

Gwatkin RB, Haidri AA 1974 Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. *J Reprod Fertil* 37:127-129

Haidri AA, Miller IM, Gwatkin RB 1971 Culture of mouse oocytes in vitro ,using a system without oil or protein. *J Reprod Fertil* 26:409-411

Halliwell B and Gutteridge JMC 1989 The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In Halliwell Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 2nd eds Oxford: Clarendon Press, 22-85

Halliwell B, Aruoma OI 1991 DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9-19

Halliwell B, Chirico S 1993 Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57, 715S-725S

Halliwell B, Gutteridge JM 1990a Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85

Halliwell B, Gutteridge JM 1990b The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, et al 2000a Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus –oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 57, 353-360

Hashimoto S, Minami N, Yamada et al 2000b Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 56,520-526

Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, and Murakami N 2002 Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 173, 239-245

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, and Callesen H 1999 High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without

serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.

Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, and Schwartz TW 2005 "Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling", *Mol Endocrin* 19, 2400 – 2411

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K 2000 Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 909-913

Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Kamijima T, Nishimiya Y, Tsuda S 2013 A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 C. *Scientific Reports*. 3, 1173/DOI: 10.1038/srep01173

Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke IJ 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

Iwata H, Akamatsu S, Minami N and Yamada M 1998 Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 50, 365-375

Janny L and Menezo YJR 1996 Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation *Mol Reprod Dev* 45, 1 31–37

Johnson MH, Nasr-Esfahani MH 1994 Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays* 16, 31-38.

Jurimae J, Jurimae T, Purge P 2007 Plasma ghrelin is altered after maximal exercise in elite male rowers. *Exp Biol Med* 232, 904-909.

Juriscova A, Varmuza S, Casper RF 1996 Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2, 93-98

Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. 2003 Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 144, 2623-2633

Kheradmand A, Roshangar L, Taati M, Sirotkin AV 2009 Morphometrical and intracellular changes in rat ovaries following chronic administration of ghrelin. *Tissue and Cell*, 41: 311-17

Killian JK, Nolan CM, Wylie AA, Li T, Vu TH, Hoffman AR, Jirtle RL 2001 Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the quaternary. *Hum Mol Genet* 10, 1721-1728

Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, et al. 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molec Endocrinol* 18, 2291-2301

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

Kluge M, Uhr M, Bleninger P, Yassouridis A, Steiger A 2009 Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 70, 920-923

Kluge M, Schmidt D, Uhr M, Steiger A 2013 Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression. *J Psychiat Res* 47,1236-1239

Knijn H 2013 European Statistical data of bovine embryo transfer activity 2012. AETE newsletter 40, ed. D Rizos, pp40-43 December 2013

Kojima M, Kangawa K 2005 Ghrelin : Structure and Function. *Physiol Rev* 85,495-522.

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

Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, and Grossman AB 2001 The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 881-887

Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, and Grossman AB 2001 Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14, 101-104.

Kourounakis AP, Rekka EA, Kourounakis PN 1997 Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 49, 938-942

Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C 2002 Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. *Biol of Reprod* 67, 767-775

Li J, Foote RH 1993 Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J Reprod Fertil* 98, 163-167

Li L, Ferin M, Sauer MV, Lobo RA 2011 Serum and follicular fluid ghrelin levels negatively reflect human oocyte quality and in vitro embryo development. *Fertil Steril* 96, 116- 20

Livingston T, Eberhardt D, Edwards JL, Godkin J 2004 Retinol improves bovine embryonic development in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 83

Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP 2003a Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 66, 297-305

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP, 2003b Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod Biomed Online* 7, 657-663

Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, and Boland MP 2003 Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 66,297-305

Mastrianni Jr L and Jones R 1965 Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 9, 99-102

McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P and Matzuk MM 2004 Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19, 2869-2874

Meister A, Tate SS 1976 Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45, 559-604

Memili E, Dominko T, First NL 1998 Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51, 36-41

Ménézo Y, Khatchadourian C 1990 Involvement of glucose 6 phosphate isomerase activity (EC 5.3.1.9) in the mouse 2 cell block in vitro, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, Série III* 310, 297-301

Menezes YJ, Herubel F 2002 Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod Biomed Online* 4, 170-175

Menezes YJ, Veiga A 1997 Cryopreservation of blastocyst. In vitro fertilization and assisted reproduction. *Proceedings of the Xth World congress on in vitro fertilization and assisted reproduction, Vancouver*, pp 49-53

Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulas P, Messinis IE 2009 Effect of ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 24, 976-981

Messini CI, Dafopoulos K, Malandri M, Georgoulas P, Anifandis A, Messinis IE 2014 Inhibitory Effect of Submaximal Doses of Ghrelin on Gonadotropin Secretion in Women. *Horm Metab Res* 46, 36-40

Miao YL, Liu XY, Qiao TW, Miao DQ, Luo MJ, and Tan JH 2005 Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* 73, 1025-1031

Miao YL, Kikuchi K, Sun Q, Schatten H 2009 Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reprod. Update* 15, 573-585

Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, Lea RG 2005 Immunohistochemical evidence for an endocrine / paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Rep Biol Endocrin* 3, 60

Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J 1995 Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64, 382–391

Nakayama T, Noda Y, Goto Y et al. 1994 Effects of visible light and others environmental factors on the production of oxygen radicals by hamsters embryos. *Theriogenology* 41, 499-510

Nasr-Esfahani MH, Aitken RJ and Johnson MH 1990b The effect iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 5, 997-1003

Niemann H, Wrenzycki C 2000 Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53, 21-34

Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Nialot JP, Mermillod P, and Cherpigny G 2002 Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol Reprod Dev* 61, 93-101

Obay BD, Tasdemir E, Tümer C, Bilgin HM, Atmaca M. 2008 Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptide* 29, 448–45

Okano M, Bell DW, Haber DA, and Li E 1999 DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257

Ostrup E, Hyttel P, Ostrup O 2011 Embryo-maternal communication: Signalling before and during placentation in cattle and pig. *Reprod. Fertil. Dev.* 23:964–975

Oyamada T, Fukui Y 2004 Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod Dev* 50, 107-117

Padilla SL and Garcia JE 1989 Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome *Fertil Steril* 52, 270-273

Palmer A, Gavin AC and Nebreda AR 1998 A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal* 17, 5037–5047

Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKEE KK, Hreniuk DL, Gao YD, Schleim KD, Yang L, Morriello GJ, Nargund R, Patchett AA, Howard AD, and Smith RG 2000 Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. *Mol Endocrinol* 14: 160-169

Pangas SA, Jorgez CJ, Matzuk MM 2004 Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *J Biol Chem* 279, 32281-32286

Paria BC, Dey SK 1990 Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 4756-4760

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eystone WH, First NL 1986 Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600

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

Paulo RC, Brundage R, Cosma M, Mielke KL, Bowers CY, and Veldhuis JD 2008 Estrogen elevates the peak overnight production rate of acylated ghrelin. *J Clin Endocrin Metab* 93, 4440-4447

Pinyopummintr T, Bavister B 1995 Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44, 471-477

Popelkova M, Sirotkin AV, Bezakova A, Makarevic AV, Pivko J, Kacmarik J and Kovac G 2006 Effect of IGF-I, leptin, ghrelin and MAPK-ERK on nuclear maturation of bovine oocytes. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50, 179-181

Rak-Mardyla A, Gregoraszczyk EL 2010 Effect of ghrelin on proliferation, apoptosis and secretion of progesterone and hCG in the placental JEG-3 cell line. *Reprod Biol* 10, 159-65

Rekka E, Chrysselis M, Siskou I, Kourounakis A 2002 Synthesis of new azulene derivatives and study of their effect on lipid peroxidation and lipoxygenase activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50, 904-907

Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R 2011 Ghrelin and reproductive disorders. *Mol Cell Endocrinol* 340, 70-79

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ 1992 Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4, 547-557

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-Adan A 2008 Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 4, 44-50

Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A 2002a Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66, 589-595

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P 2002b Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61, 234-248

Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, and Sirard MA 2002 Quantification of cyclin B1 and p34 in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod* 67, 1456-1464

Roche JR, Sheahan AJ, Chagas LM, Blache D, Berry DP, Kay JK 2008 Long-term infusions of ghrelin and obestatin in early lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 91, 4728-40

- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E 2006 Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131, 895-904
- Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori Y, Sugimoto H 2010 Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology* 151, 4765-4775
- Sellens MH, Stein, Sherman MI 1981 Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions. *J Reprod Fertil* 61, 307- 315.
- Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, and Teno N 2004 Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Com*, 325, 1487-1494
- Shimada M, Inmaculada HG, Ignacio GR, and Richards JS 2006 Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molec Endocrinol* 20,1352-1365
- Sirotkin AV, Rafay J, Kotwica J 2009 Leptin controls rabbit ovarian function in vivo and in vitro: Possible interrelationships with ghrelin. *Theriogenology* 72, 765-772
- Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, Feighner S, Tan C, McKee KK, Pong SS, Griffin P, and Howard A 2001 Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* 14: 9-14
- Sunkara KS, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A 2011 Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 10;26(7):1768-1774
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG 2010 The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139, 685-695
- Swan Sh, Elkin Ep, Fenster L 2000 The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Envor Health Persp* 108, 961-966

Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A 1993 Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 49, 228-232.

Takahashi Y, Kanagawa H, 1998 Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro. *J Vet Med Sci* 60, 365-367

Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A 2003 Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* 60, 135 – 149

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A 2002 Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61, 414-424

Taylor C 2001 Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharmacol* 10, 189-198

Tena-Sempere M 2007 Roles of Ghrelin and Leptin in the Control Of Reproductive Function. *Neuroendocrinology* 86, 229-241

Tompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ 1996a Oxygene uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fert* 106, 299-306

Tompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Kennedy CJ, Pullar D, Leese HJ 1996b Oxygen consumption by Day 7 bovine blastocysts: determination of ATP production. *Anim Reprod Sci* 43,241-247

Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, and Sirard MA 2005 Expression of cyclin B1 messengers RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the ovine oocyte. *Biology Reprod* 72, 1037-1044

Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJS, Keefe DL 2000 Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62, 1866-1874

Tropea A, Tiberi F, Minici F, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Miceli F, Catino S, Mancuso S, Sanguinetti M, Lanzone A and Apa R 2007 Ghrelin affects release of luteolytic and luteotropic factors in human luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3239-3245

Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T, 1992 Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 31, 28-33

Usdan LS, Khaodhlar L, Apovian CM 2008 The endocrinopathies of anorexia nervosa. *Endocr Pract* 14, 1055-1063

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J 2010 Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod BioMed Online* 20, 453-469

Van den Abbeel E, Van Steirteghem A 1987 Cryopreservation of in vitro cultured mouse preimplantation embryos. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*, 45, 460-463

van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ et al. 2011 Elevated non esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte aturation compromise early embryo physiology. *PLOS one* 6: e23183

Van Langendonck A, Morales H, Massip A., and Dessy F 1998 Effect of hydrogen peroxide on in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 49, 221

Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A, 2002 Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57, 1453-1465

Van Soom A., Mahmoudzadeh AR, Christophe A, Ysebaert MT, and de Kruif A 2001 Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. *Reprod Dom Anim* 36, 169-176

Van Soom, A, Wydooghe, E, Heras S, and Vandaele L 2011 Alternative models for the study of embryo-maternal cross-talk and signaling molecules from fertilization to Implantation. *Reprod. Fertility and Development* 23,iii-v

Veldhuis JD and Bowers CY 2010 Integrating GHS into the Ghrelin System. *Intern J Peptides* ID879503, 40 pages

- Velez-Pardo C, Morales AT, Del Rio MJ, Olivera-Angel M 2007 Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* 67,1285-1296
- Vignerón C, Dalbès-Tran R, Guyader-Joly C, Perreau C, Humblot P, Mermillod P 2002 Expression of cyclin B1 and cdk1 messengers during in vivo maturation and in vitro culture of cattle oocytes. 18th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Rolduc.
- Vignerón C, Nuttinck F, Perreau C, Reinaud P, Charpigny G, and Mermillod P 2003 Effect of roscovitine a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine cumulus cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. *Mol Reprod Devel* 65,114-121
- Vulliemoz NR, 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
- Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK 2002 Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril* 78,1272-1277
- 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
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, and Lonergan P 2002 Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57, 2105-2117
- Warzych E, C. Wrenzycki C, Lechniak P D 2007 Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development* 74:280-289

- Wathes DC, Fenwic M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R 2007 Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* suppl. 1, S232-241
- Watson AJ 2007 Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci* 85, 13 suppl, E1-3.
- Wetrz-Lutz AE, Knight TJ, Pritchard RH, Daniel HJ, Clapper JA, Smart AJ, Trenkle AJ, Beitz DC 2006 Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *J Anim Sci* 84, 3285-3330
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, and Sundler F 2002 The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107: 63-69
- Wilson C 2004 Fertility below replacement level. *Science* 304, 207-209).
- Wrenzycki C, Hermann D, Carnwath JW and Niemann H 1998 Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM dupplemented with BSA. *J Reprod Fertil* 112, 387-398.
- Wrenzycki C, Hermann D, Niemann H 2007 Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability *Theriogenology* 68S, 77-83
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, and Yang X 1997 Dynamics of maturation promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 56, 253-259
- Xu Z, Lin S, Wu W, Tan H, Wang Z, Cheng C, Lu L, Zhang X 2008 Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF-kB pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology* 247, 133-138
- Yamashita Y, Okamoto M, Kawashima I, Okazaki T, Nishimura R, Gunji Y, Hishinuma M, and Shimada M 2011 Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod* 85, 1073-1082
- Yanagisawa T, Kosakai K, Tomiyama T, Yasunami M, Takase K 1990 Studies on anti-ulcer agents. II. Synthesis and anti-ulcer activities of 6-isopropylazulene-1-sodium sulfonate derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38, 3355-3358

- Yang HW, Hwang KJ, Kwo HC 1998 Detection of ROS and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13, 998-1002
- Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. 2002 Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol*.13, 2748-2752
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD 2001 Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics* 27, 153-154
- Younis AI, Brackett BG, and Fayrer-Hosken RA 1989 Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res* 23, 189-201
- Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ 2003 Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro *Theriogenology* 59, 1585-1596
- Zhang K, Wei HX, Zhang YH, Wang SH, Li Y, Dai YP, Ning LI 2007 Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *J Reprod Develop* 53, 647-653
- Zhao D 2007 Protein kinase Cdelta-mediated CREB activation regulates ghrelin-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colonic epithelial cells. *J Cell Biochem* 102,1245-1255
- Ρέκκα EA 2001 Φαρμακοχημεία ελεύθερων ριζών. Πανεπιστημιακές εκδόσεις ΑΠΘ. Θεσσαλονίκη