



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η απόκριση σε βλάβες του DNA σε ανθρώπινα ωοκύτταρα

Αγαπητού Κρυστάλλω

Βιολόγος Αναπαραγωγής

Senior Κλινικός Εμβρυολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν. 5343/32, Παρ.2, Άρθρο 202)

Αρχική Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Επιτροπής: 24/03/2016

Αρχικός Ορισμός Θέματος (24/03/2016): “Μελέτη της συμπεριφοράς και της ανάπτυξης ανθρώπινων ωοκυττάρων και προ-εμφυτευτικών εμβρύων σε εξω-μήτριο περιβάλλον”

Πρώτη Τροποποίηση Θέματος (15/12/2017): “Μελέτη της συμπεριφοράς και της ανάπτυξης ανθρώπινων ανώριμων ωοκυττάρων (GV) σε εξωμήτριο περιβάλλον”

Τροποποίηση Τριμελούς Επιτροπής: 15/06/2020

Δεύτερη Τροποποίηση Θέματος (15/06/2020): “Η απόκριση σε βλάβες του DNA σε ανθρώπινα ωοκύτταρα”

Τελική Σύνθεση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής (15/06/2020):

1. **Πέτρος Μαραγκός (Πρόεδρος Επιτροπής, Επιβλέπων)**, Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. **Σιμοπούλου Μάρα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Εμβρυολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Τράγκα Θεώνη**, Ομότιμη Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (2/06/2022):

1. **Πέτρος Μαραγκός (Πρόεδρος Επιτροπής, Επιβλέπων)**, Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. **Σιμοπούλου Μάρα (Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Εμβρυολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Τράγκα Θεώνη (Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)**, Ομότιμη Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. **Γεωργίου Ιωάννης**, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Κλινικής Εμβρυολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. **Βλάχος Νικόλαος**, Καθηγητής Γυναικολογίας, Μαιευτικής & Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
6. **Χατζημελετίου Αικατερίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εμβρυολογίας-Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
7. **Ασημακόπουλος Βύρωνας**, Καθηγητής Φυσιολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ, ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ
κ. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣ ΑΓΑΠΗΤΟΥ

Την Τετάρτη 15 Μαρτίου 2023, και ώρα 12:00 μ.μ., στην Αίθουσα 4 του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της δημόσιας παρουσίασης, εξέτασης, και αξιολόγησης της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας Διδάκτορος κας Κρυστάλλως Αγαπητού, με θέμα «*Η απόκριση σε βλάβες του DNA σε ανθρώπινα ωοκύτταρα*»

Παρόντα ήταν τα ακόλουθα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Πέτρος Μαραγκός (Επιβλέπων), Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
2. Σιμπούλου Μάρα, Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
3. Τράγκα Θεώνη, Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
4. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Κλινικής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Χατζημελετίου Κατερίνα, Αν. Καθηγήτρια Εμβρυολογίας – Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
6. Ασημακόπουλος Βύρων, Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

Απουσίαζε ο κος Βλάχος Νικολάος, Καθηγητής Γυναικολογίας, Μαιευτικής & Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μετά το τέλος της παρουσίασης τα μέλη της Επιτροπής υπέβαλαν ερωτήσεις στην υποψήφια, στις οποίες εκείνη απάντησε **εξαιρετικά ικανοποιητικά**.

Μετά την αποχώρηση της υποψήφιας, η Εξεταστική Επιτροπή συνεδρίασε και διαπίστωσε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διδακτορικής διατριβής, την ουσιαστική της συμβολή στην επιστήμη, ότι η παρουσίαση και η ανάπτυξη του θέματος της διδακτορικής διατριβής ήταν **εξαιρετική**, καθώς και την επάρκεια της υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της.

Κατόπιν αυτών, η Επιτροπή ομόφωνα αποφάσισε να απονεμηθεί στην κ. Κρυστάλλω Αγαπητού το Διδακτορικό Δίπλωμα με βαθμό << Άριστα >> .

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1) Πέτρος Μαραγκός (Επιβλέπων), Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

PETROS MARAGKOS PETROS MARAGKOS
17.03.2023 10:59

2) Σιμοπούλου Μάρα, Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

MARIA SIMOPOULOU
Mar 17 2023 5:00 PM
MARIA SIMOPOULOU

3) Τράγκα Θεώνη, Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θ Τράγκα

4) Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Κλινικής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεωργίου

5) Χατζημελετίου Κατερίνα, Αν. Καθηγήτρια Εμβρυολογίας – Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Χατζημελετίου

6) Ασημακόπουλος Βύρων, Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

VYRON ASIMAKOPOULOS VYRON ASIMAKOPOULOS
23.03.2023 18:58

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Εμβρυολογικό Εργαστήριο της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής “Institute of Life”, το οποίο εδρεύει στην Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική “ΙΑΣΩ Αθηνών”.

Η Διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Πέτρου Μαραγκού, κατά τα Ακαδημαϊκά Έτη 2016-2022. Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Μαραγκό, ο οποίος πίστεψε σε μένα και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την εν λόγω διδακτορική διατριβή, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ’ όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας και για την ουσιαστική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, στην Δρ. Θεώνη Τράγκα, Ομότιμη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την τιμή προς το πρόσωπό μου να συμμετέχει στην επιτροπή και ιδιαίτερα στην Δρ. Μάρα Σιμοπούλου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της πάνω στην ανθρώπινη φυσιολογία και εμβρυολογία, αλλά κυρίως για την ηθική στήριξή της και για την πίστη της στο πρόσωπό μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Ακαδημαϊκούς Καθηγητές κ.κ Ιωάννη Γεωργίου, Νικόλαο Βλάχο, Αικατερίνη Χατζημελετίου και Βύρων Ασημακόπουλο που αποδέχτηκαν ένθερμα την συμμετοχή τους στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της Διατριβής μου, καθώς και για τις πολύτιμες κατευθύνσεις που απλόχερα μου έδωσαν προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η εκπόνηση της διατριβής.

Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να πραγματοποιήσω στην κ. Κωνσταντίνα Νιάκα, Υποψήφια Διδάκτωρ και τον κ. Αλέξανδρο Παΐλα, Προπτυχιακό Φοιτητή του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθειά

τους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στα Εργαστήρια του Τμήματος και ειδικά κατά τη διάρκεια των δύσκολων χρόνων της πανδημίας του ιού SARS-CoV-2. Χωρίς αυτούς η πραγματοποίηση των αναλύσεων θα ήταν αδύνατη, καθώς οι μετακινήσεις μεταξύ των πόλεων ήταν εξαιρετικά δύσκολες και τα πανεπιστημιακά ιδρύματα απροσπέλαστα.

Εξαιρέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σωκράτη Γρηγοριάδη, Ειδικευόμενο Κλινικό Εμβρυολόγο και Υποψήφιο Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το “ευχαριστώ” είναι λίγο για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή του καθ' όλη την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Νομικό και Μαίρη Νικολακοπούλου και τον Επιστημονικό Διευθυντή της ΜΙΥΑ “Institute of Life-ΙΑΣΩ”, Αν. Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κο Θέμη Μαντζαβίνο, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την έναρξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς και στους συναδέλφους μου Κλινικούς Εμβρυολόγους του Εμβρυολογικού Εργαστηρίου “Institute of Life-ΙΑΣΩ”, που με στήριξαν και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ιδιαίτερα τον κ. Έρωτα Νικητό, Διευθυντή του Εμβρυολογικού Εργαστηρίου και την κ. Βάνια Καλλέργη, Senior Κλινικό Εμβρυολόγο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ομάδα των Γυναικολόγων της ΜΙΥΑ “Institute of Life-ΙΑΣΩ”, που υποστήριξαν ηθικά και υλικά την εκπόνηση της διατριβής, καθώς και στο υπόλοιπο προσωπικό για τη συνολική τους βοήθεια και στήριξη όλο αυτό το διάστημα.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τα παιδιά μου και τον σύντροφό μου, που με στήριξαν και ανέχτηκαν την “απουσία” μου όλα αυτά τα χρόνια που παράλληλα με την επαγγελματική μου απασχόληση, στον τόσο απαιτητικό χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, προσπαθούσα να ολοκληρώσω το τόσο σημαντικό ερευνητικό έργο που ανέλαβα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
ABSTRACT	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
1.1 Κυτταρικός κύκλος	26
1.1.1 Φάσεις Κυτταρικού Κύκλου στο Τυπικό Ευκαρυωτικό Κύτταρο.....	27
1.1.2 Σημεία και Συστήματα Ελέγχου του Κυτταρικού Κύκλου.....	34
1.1.3 Κυτταρική Διαίρεση: Μίτωση και Μείωση.....	51
1.2 Βλάβες στο DNA και Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης	63
1.2.1 Κατηγορίες βλαβών στο DNA.....	64
1.2.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλάβης στο DNA.....	83
1.2.3 Δίκλιωνα ρήγματα στην αλυσίδα του DNA (DSBs): Μηχανισμοί πρόκλησης.....	83
1.2.4 Δίκλιωνα ρήγματα στην αλυσίδα του DNA (DSBs): Μηχανισμοί επιδιόρθωσης.....	85
1.2.5 Επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA (double strand brakes) μέσω της οδού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR).....	87
1.2.6 Επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA (double strand brakes) μέσω της οδού της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (non-homologous end joining, NHEJ).....	90
1.3 Ωοκύτταρα, Γεννητικός Κύκλος και Βασικά Στοιχεία Φυσιολογίας του Θήλεος Αναπαραγωγικού Συστήματος	92
1.3.1 Ωογένεση.....	92
1.3.2 Ρύθμιση Καταμήνιου Κύκλου.....	98
1.3.3 Βασικές Αρχές Φυσιολογίας του Θήλεος Αναπαραγωγικού Συστήματος.....	102
1.4 Υπογονιμότητα και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή	106
1.4.1 Αίτια Υπογονιμότητας.....	108
1.4.2 Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.....	115
1.4.3 Πρωτόκολλα Διέγερσης των Ωοθηκών.....	120
1.4.4 Συστήματα καλλιέργειας εμβρύων και γαμετών.....	127
1.5 Πρόκληση βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων: Αίτια και Αποτελέσματα	131
1.5.1 Μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων.....	131
1.5.2 Επίδραση των βλαβών του DNA στην φυσιολογία και ανάπτυξη των ωοκυττάρων.....	142
1.6 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	151
2.1 Ερευνητικός Σχεδιασμός και Πληθυσμός της Μελέτης	152
2.1.1 Έγκριση Ερευνητικού Πρωτοκόλλου.....	152
2.1.2 Στρατολόγηση Συμμετεχόντων στη Μελέτη.....	154
2.1.3 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	154

2.2 Πρωτόκολλο Ελεγχόμενης Διέγερσης των Ωοθηκών.....	156
2.3 Ωοληψία	157
2.4 Απογύμνωση ωοκυττάρων (denudation) και αξιολόγηση της μορφολογίας και του βαθμού ωρίμανσης.....	160
2.5 Επαγωγή Δίκλωνων Θραύσεων στο DNA των GV Ωοκυττάρων	163
2.6 Μονιμοποίηση ωοκυττάρων.....	164
2.7 Ανίχνευση DSBs μέσω πρωτοκόλλου έμμεσου ανοσοφθορισμού της ιστόνης γ-H2AX... ..	166
2.7.1 Βασικές Αρχές Ανοσοφθορισμού.....	166
2.7.2 Πρωτόκολλο δευτερογενούς (έμμεσου) ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της ιστόνης γ-H2AX.....	177
2.8 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των DSBs στα ωοκύτταρα μέσω συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας.....	179
2.8.1 Βασικές αρχές συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας.....	179
2.8.2 Πρωτόκολλο ανάλυσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας των DSBs σε ανθρώπινα ωοκύτταρα	183
2.9 Καλλιέργεια GV ωοκυττάρων σε κλιβάνους time-lapse και <i>in vitro</i> ωρίμανση	183
2.9.1 Συστήματα time-lapse στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή: Βασικές Αρχές Λειτουργίας.....	184
2.9.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας και <i>in vitro</i> ωρίμανσης GV ανθρώπινων ωοκυττάρων με χρήση του συστήματος time-lapse Primo Vision	187
2.10 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων	191
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	193
3.1 Χαρακτηριστικά Μελέτης και Πληθυσμού	194
3.2 Μηχανισμός Ελέγχου Πρόφασης 1 ^{ης} Μειωτικής Διαίρεσης.....	195
3.4 Αντίκτυπος της Βλάβης του DNA στη Μορφολογία των Ωοκυττάρων	206
3.5 Διερεύνηση της Επίδρασης της Ηλικίας στην Ευαισθησία των Μηχανισμών Ελέγχου Βλάβης στο DNA κατά τη Μείωση Ανθρώπινων Ωοκυττάρων.....	210
3.6 Μελέτη της Επιδιορθωτικής Ικανότητας των Ωοκυττάρων.....	215
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:.....	219
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	219
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	239

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα κύτταρα του οργανισμού υφίσταται συνεχώς την επίδραση ενδογενών και εξωγενών γενοτοξικών παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και γονιδωματική αστάθεια. Όταν οι βλάβες στο DNA αφορούν τα κύτταρα της γαμετικής σειράς, τότε αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα, μη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς και να επηρεάσει αρνητικά τα μαιευτικά και περιγεννητικά αποτελέσματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απόκριση των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA, δεδομένου πως τα κύτταρα αυτά σχηματίζονται κατά την εμβρυϊκή ζωή και παραμένουν στο στάδιο της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης έως και την εφηβεία. Κατά τη διάρκεια αυτής της μεγάλης περιόδου τα ωοκύτταρα εκτίθενται σε βλάβες του DNA, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και το δυναμικό τους. Για τον λόγο αυτό η μελέτη της απόκρισης των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA είναι σημαντική. Αν και το θέμα αυτό απασχολεί την επιστημονική κοινότητα εδώ και τουλάχιστον τρεις δεκαετίες, τα υπάρχοντα δεδομένα προέρχονται κυρίως από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, καθιστώντας τις μελέτες σε ανθρώπινα ωοκύτταρα αναγκαίες.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της απόκρισης ανθρώπινων ωοκυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV) σε βλάβες του DNA και συγκεκριμένα σε βλάβες της κατηγορίας των δίκλωνων θραυσμάτων του DNA (double strand breaks, DSBs). Απώτερος σκοπός ήταν η διερεύνηση της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου για βλάβες του DNA κατά τα διάφορα στάδια της μείωσης, η διερεύνηση του εάν και τα πόσον τα ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA μπορούν να ολοκληρώσουν την μείωση έχοντας βλάβες, η διερεύνηση του δυναμικού επιδιόρθωσης της βλάβης κατά τη μείωση και η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της βλάβης στα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά των ωοκυττάρων στο πλαίσιο της *in vitro* ωρίμανσής τους.

Υλικά & Μέθοδοι: Η παρούσα προοπτική μελέτη παρέμβασης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με τη Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής “Institute of Life” που εδρεύει στο Μαιευτήριο “ΙΑΣΩ”. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Αρ. Απόφασης 443/31.7.2018). Στη μελέτη

συμμετείχαν 24 δότριες ωαρίων ηλικίας έως 35 ετών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε κύκλο δωρεάς ωαρίων και για τους σκοπούς της έρευνας δώρισαν 158 GV ωοκύτταρα μετά από προφορική και έγγραφη συναίνεσή τους. Πιο αναλυτικά, όλες οι συμμετέχουσες στη μελέτη έλαβαν ως πρωτόκολλο διέγερσης το συμβατικό βραχύ πρωτόκολλο του ανταγωνιστή της GnRH (short GnRH antagonist protocol). Μετά την ωοληψία πραγματοποιήθηκε μηχανική και ενζυμική (hyaluronidase, FertiPro) απογύμνωση του συμπλέγματος των κοκκιωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (COCs) και τα ωοκύτταρα ελέγχθηκαν για το βαθμό της πυρηνικής τους ωριμότητας. Τα ωοκύτταρα σταδίου GV χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στην πειραματική ομάδα και στην ομάδα ελέγχου. Στην πειραματική ομάδα τα GV ωοκύτταρα επώαστηκαν για μία ώρα σε καλλιεργητικό υλικό εμπλουτισμένο με ετοποσίδη (Etop) με σκοπό την πρόκληση DSBs. Τα GV ωοκύτταρα της ομάδας ελέγχου (Control) δεν εκτέθηκαν σε ετοποσίδη. Στη συνέχεια, μερικά από τα GV ωοκύτταρα και των δύο ομάδων μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση παραφολμαδεΐδης (Etop PF και Control PF, αντίστοιχα) για να αξιολογηθεί η επίδραση της ετοποσίδης στην πρόκληση DSBs. Τα υπόλοιπα GV ωοκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο επιτραπέζιο κλίβανο (benchtop) Astec Pengium (Astec) σε συνθήκες καλλιέργειας 6.5% CO₂, 5% O₂ και θερμοκρασία 37.5 °C για 24 ώρες. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της ετοποσίδης στην *in vitro* ωρίμανση των GV ωοκυττάρων πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μορφοκινητικών δεδομένων με τη χρήση του ψηφιακού ανεστραμμένου μικροσκοπίου τεχνολογίας time-lapse (TL) “Primo Vision” (TK Biotech, Vitrolife) (Etop TL). Εφαρμόζοντας τα ίδια πρωτόκολλα ανάλυσης αξιολογήθηκαν τα μορφοκινητικά δεδομένα της *in vitro* ωρίμανσης των GV ωοκυττάρων της ομάδας ελέγχου τα οποία δεν εκτέθηκαν σε ετοποσίδη (Control TL). Μετά το πέρας της καλλιέργειας τα ωοκύτταρα μονιμοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η δυναμική επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA. Τα πειράματα ανάλυσης των DSBs πραγματοποιήθηκαν μέσω της μελέτης του ανοσοφθορισμού της ιστόνης γ-H2AX, η οποία αποτελεί ειδικό βιοδείκτη της παρουσίας DSBs, με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica TCS SP5). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism (έκδοση 8.4.3) και της Γλώσσας Προγραμματισμού R για Στατιστικούς Σκοπούς.

Αποτελέσματα: Προκειμένου να μελετηθεί η ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου για βλάβες του DNA κατά τη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και κατά τη φάση MI, 31 GV ωοκύτταρα εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης (Etop) που

προκαλούν διαφορετικά επίπεδα γενοτοξικής βλάβης και στη συνέχεια αφέθηκαν να ωριμάσουν για 24 ώρες σε κλίβανο με ενσωματωμένο σύστημα time-lapse (TL). Πιο αναλυτικά, οκτώ (8) GV ωοκύτταρα εκτέθηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 µg/ml (Etop 100 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 20 µg/ml (Etop 20 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 10 µg/ml (Etop 10 TL), που προκαλούν εκτεταμένα, μέτρια και ήπια επίπεδα βλάβης, αντίστοιχα, ενώ εννέα (9) δεν εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και λειτούργησαν ως ομάδα ελέγχου (Control TL). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων από το σύστημα time-lapse κατέδειξαν πως η ωρίμανση των ωοκυττάρων της ομάδας Etop 100 TL διακόπηκε στο στάδιο GV στο σύνολο (100%) των ωοκυττάρων της ομάδας αυτής. Σε αντίθεση με τα ωοκύτταρα της ομάδας Etop 100 TL, στα ωοκύτταρα των ομάδων Etop 20 TL και Etop 10 TL παρατηρήθηκε διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle breakdown, GVBD) σε ποσοστό 71.43% και σχηματισμός και αποβολή 1^{ου} πολικού σωματίου (polar body extrusion, PBE) σε ποσοστά 71.43% και 57.14%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά αυτά ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα ποσοστά που καταγράφηκαν στην ομάδα ελέγχου (Control TL), όπου το ποσοστό διάσπασης βλαστικού κυστιδίου (GVBD rate) ήταν 88.89% και το ποσοστό σχηματισμού και αποβολής 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion rate) ήταν επίσης 88.89%. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς ελέγχου για βλάβες του DNA, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι και ενεργοποιούνται εμποδίζοντας την περαιτέρω ωρίμανση των ωοκυττάρων σε εκτεταμένα επίπεδα βλάβης, χωρίς όμως να είναι ευαίσθητοι σε επίπεδα μέτριας ή/και ήπιας βλάβης, επιτρέποντας έτσι την ωρίμανση ωοκυττάρων που φέρουν βλάβες στο DNA. Με σκοπό την επιβεβαίωση της έλλειψης ευαισθησίας των μηχανισμών ελέγχου σε μέτρια επίπεδα βλάβης του DNA, επαναλήφθηκε η παραπάνω πειραματική διαδικασία σε 102 GV ωοκύτταρα, 45 εκ των οποίων εκτέθηκαν σε 20 µg/ml ετοποσίδης (Etop TL) και στη συνέχεια αφέθηκαν να ωριμάσουν για 24 ώρες σε κλίβανο με ενσωματωμένο σύστημα time-lapse (TL) και σε 57 GV ωοκύτταρα τα οποία δεν εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και λειτούργησαν ως ομάδα ελέγχου (Control TL). Της ανάλυσης είχαν προηγηθεί πειράματα ανοσοφθορισμού της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ-H2AX και συνεστιακής μικροσκοπίας για την επιβεβαίωση της γενοτοξικής επίδρασης της ετοποσίδης σε συγκέντρωση 20 µg/ml. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ της πειραματικής ομάδας (Etop TL) και της ομάδας ελέγχου (Control TL) αναφορικά με τα ποσοστά διάσπασης βλαστικού κυστιδίου (GVBD rate 62.22% vs 63.16%, *p-value* = 0.543) και σχηματισμού και αποβολής 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1

extrusion rate 85.71% vs 88.89%, p -value = 0.495). Επιπρόσθετα, και οι χρόνοι επίτευξης της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD time 5.86 ± 3.19 ώρες vs 5.89 ± 3.71 ώρες, p -value = 0.792) και του σχηματισμού και αποβολής του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion 18.32 ± 2.70 ώρες vs 17.96 ± 3.66 ώρες, p -value = 0.914), οι οποίοι αντικατοπτρίζουν τον χρόνο μετάβασης από το στάδιο GV στο στάδιο MII, δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση περί έλλειψης ευαισθησίας των μηχανισμών ελέγχου σε μέτρια επίπεδα γενοτοξικής βλάβης. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η πιθανή επίδραση της ετοποσίδης και της γενοτοξικής βλάβης που αυτή προκαλεί στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ωοκυττάρων. Στην πειραματική ομάδα (Etop TL) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ωοκυττάρων που είχαν μη φυσιολογική μορφολογία και πιο ειδικά κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (55.56%, 25/45) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control TL) (29.82%, 17/57) (p -value = 0.015), καταδεικνύοντας πως ίσως οι βλάβες στο DNA σχετίζονται με μη φυσιολογικά μορφολογικά πρότυπα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση υποομάδων με βάση την ηλικία των δοτριών, προκειμένου να διερευνηθεί το εάν και τα πόσον η ηλικία μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου βλαβών του DNA κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων. Στην μία υποομάδα συμπεριελήφθησαν GV ωοκύτταρα που συλλέχθηκαν από δότριες ηλικίας ≤ 30 ετών και στην άλλη υποομάδα συμπεριελήφθησαν GV ωοκύτταρα που συλλέχθηκαν από δότριες ηλικίας > 30 ετών. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων αναφορικά με τα δεδομένα της μορφοκινητικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων. Τέλος διερευνήθηκε η ικανότητα επιδιόρθωσης των DSBs που παρουσιάζουν τα ανθρώπινα GV ωοκύτταρα. Τα δεδομένα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν πως τα ωοκύτταρα σταδίου GV που εκτέθηκαν σε ετοποσίδη διαθέτουν μερική επιδιορθωτική ικανότητα των DSBs, καθώς ο εκπεμπόμενος ανοσοφθορισμός της γ -H2AX παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος μετά την καλλιέργεια σε σύγκριση με τον ανοσοφθορισμό αμέσως μετά την έκθεση σε ετοποσίδη και στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με τον εκπεμπόμενο ανοσοφθορισμό από τα GV ωοκύτταρα της ομάδας ελέγχου.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμφωνούν με την πλειονότητα των βιβλιογραφικών δεδομένων που αφορούν κυρίως μελέτες σε ζωικά μοντέλα και δείχνουν πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα σταδίου GV που φέρουν βλάβες στο

DNA τους μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ωρίμανσή τους έως και το στάδιο MII. Αυτό οφείλεται στην χαμηλή ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου για βλάβες του DNA κατά τη μείωση, οι οποίοι προκαλούν αναστολή της ωρίμανσης των ωοκυττάρων όταν οι βλάβες είναι εκτεταμένες, χωρίς να ισχύει το ίδιο για βλάβες περιορισμένης έκτασης, οι οποίες όμως εν δυνάμει μπορούν να προκαλέσουν γονιδιωματική αστάθεια, επηρεάζοντας δυσμενώς το δυναμικό ανάπτυξης των ωοκυττάρων, καθώς και την μετέπειτα εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αναφορικά με την επιδιορθωτική ικανότητα των ωοκυττάρων, αυτή είναι περιορισμένη και συντελείται κυρίως μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR). Η επιδιόρθωση της βλάβης δεν είναι συνθήκη ούτε αναγκαία, ούτε ικανή για την συνέχιση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, κάτι που σημαίνει πως πλήρως ώριμα ωάρια σταδίου MII μπορούν να φέρουν σημαντικές βλάβες στο DNA. Επίσης, φαίνεται πως τα ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA είναι πιο πιθανό να παρουσιάζουν μη φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ακόμα και εάν επιτύχουν ωρίμανση έως το στάδιο MII. Ωστόσο η παρατήρηση αυτή πρέπει να διερευνηθεί προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η απόκριση των ωοκυττάρων του ανθρώπου σε βλάβες στο DNA, τόσο σε μοριακό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο.

ABSTRACT

Introduction: Several endogenous and exogenous environmental factors affect cell physiology and homeostasis, causing DNA damage and genome instability. If DNA damages occur in the germline cells, they can potentially lead to infertility, abnormal embryo development and adverse obstetrical, perinatal, and neonatal outcomes. Mammalian oocyte response to DNA damage is of great interest, considering that the female germ cells are produced prior to birth and remain arrested at the prophase stage of meiosis I over a long period of time till puberty. During this extensive state of arrest oocytes may be exposed to several DNA damaging factors, affecting oocyte quality and competence. Therefore, it is of great importance to understand how these cells respond to DNA damage. Despite the significant research in the field started more than three decades ago, information is mostly provided by animal studies and limited data are available in humans.

Aim: The aim of the present study was to investigate DNA damage response mechanisms in fully grown germinal vesicle (GV) stage human oocytes, focusing on double strand breaks (DSBs). To elaborate on that, this study investigated the sensitivity of the DNA damage response mechanisms during meiosis on different levels of genotoxicity, the oocyte ability to resume meiosis even with DNA damages, the oocyte capacity on repairing DNA damage as well as the effect of DNA damage on oocyte morphokinetic characteristics during *in vitro* maturation.

Materials & Methods: The present prospective interventional study was conducted on the Laboratory of Cellular and Developmental Biology of the Department of Biological Applications and Technology of the University of Ioannina, in collaboration with the Assisted Reproduction Unit of the “Institute of Life, IASO”. Study’s protocol was approved by the Greek National Authority of Assisted Reproduction (Approval Number 443/31.7.2018). The population of the study constituted of 24 women till 35 years old, subjected to donor oocyte cycles. Participants received extensive consultation and provided their GV oocytes for the study’s proposes following informed consent. The total number of the donated GV oocytes was 158. Briefly, all participants received the standard short GnRH antagonist protocol. Following oocyte retrieval, the cumulus oocyte complexes (COCs) were mechanically and enzymatically (hyaluronidase, FertiPro) denuded, and the

nuclear maturation status was assessed. The isolated GV oocytes were allocated in two groups, the experimental group, and the control group, respectively. The experimental group consisted of GV oocytes which were cultured for one hour in media supplemented with the genotoxic factor etoposide (Etop). Etoposide is a well-known chemical factor, which can induce the formation of DSBs. The control group consisted of GV oocytes which were exposed to the standard culture conditions without etoposide supplementation. Then, some of the GV oocytes of both groups were fixated with paraformaldehyde (PF) (Etop PF and Control PF, respectively), aiming to evaluate etoposide's effect on inducing DSBs. The rest of the GV oocytes were cultured for 24 hours in benchtop incubators (Astec Pengium, Astec) employing the following culture conditions 6.5% CO₂, 5% O₂ and temperature 37.5 °C. In order to investigate the effect of etoposide pre-treatment on oocyte *in vitro* maturation, data obtained from time-lapse (TL) system (Primo Vision, TK Biotech, Vitrolife) were analyzed (Etop TL). Employing the same experimental process, control GV oocytes, without previous exposition on etoposide, were culture and *in vitro* maturation was also monitored via time-lapse (Control TL). Following culture completion, the oocytes from both groups were fixated, as previously described, in order to assess the competent of the human oocytes to restore DNA damages. Evaluation of DNA damage response was performed employing immunofluorescence experiments, targeting the phosphorylated histone γ -H2AX. Histone γ -H2AX is a well-known sensitive biomarker for accurately detecting DSBs. The histone γ -H2AX immunofluorescent levels were assessed by using confocal microscopy (Leica TCS SP5). Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism and the R Language for Statistical Proposes.

Results: Aiming to investigate the sensitivity of the DNA damage response mechanisms during the prophase of the 1st meiotic division as well as during metaphase I (MI) stage, 31 GV oocytes were exposed to different concentrations of etoposide (Etop), which can induce different levels of genotoxic damage and then were cultured in order to *in vitro* mature for 24 hours, employing incubators equipped with time-lapse systems (TL). More specifically, eight (8) GV oocytes were exposed on 100 μ g/ml of etoposide (Etop 100 TL), seven (7) on 20 μ g/ml (Etop 20 TL), and seven (7) on 10 μ g/ml (Etop 20 TL), triggering severe, mild, and minimal levels of genotoxicity, respectively. Nine (9) GV oocytes were cultured without previous exposure to etoposide and served as the control group (Control TL). Data obtained from time-lapse were analyzed and analysis revealed that the *in vitro*

maturation of the oocytes in the Etop 100 TL group was arrested in the GV stage, as the 100% of these oocytes remained in the GV stage. In contrast, the germinal vesicle breakdown rate (GVBD rate) with regards to the Etop 20 TL and Etop 10 TL groups was recorder to be 71.43% and the 1st polar body extrusion rate (PB1 extrusion rate) was recorder to be 71.43% and 57.14%, respectively. Similar GVBD and PB1 extrusion rates were recorder for the control group, reaching 88.89%, respectively. This data demonstrates that the DNA damage response mechanisms during meiosis of human oocytes are sensitive for extensive genotoxic damages and activate upon severe damage resulting on arresting extensively damaged oocytes on the GV stage. In contrast, mild or minimal damages do not activate the DNA damage response mechanisms, which are insensitive to restricted damages and thus oocytes presenting with these levels of DNA damage are able to successfully mature. Aiming to further elaborate and verify these conclusions regarding the lack of sensitivity of the DNA damage response mechanisms on detecting mild DNA damages, experiments on larger oocyte population were performed. Briefly, 102 GV human oocytes were recruited in this stage of the study. Forty-five (45) of them were exposed to 20 µg/ml of etoposide (Etop) and then were cultured to *in vitro* mature for 24 hours in incubators equipped with time-lapse systems (TL), serving as the experimental group (Etop TL). The rest 57 GV oocytes were cultured under the same conditions to *in vitro* mature without previous exposure to etoposide, constituting the control group (Control TL). It is crucial to highlight that prior to these experiments, the ability of 20 µg/ml etoposide on inducing mild damages in the form of DSBs was assessed employing immunofluorescence experiments, targeting the phosphorylated histone γ -H2AX. Statistical analysis did not reveal any significant difference between the Etop TL and Control TL groups with regards to both GVBD (62.22% vs 63.16%, *p-value* = 0.543) and PB1 extrusion rates (85.71% vs 88.89%, *p-value* = 0.495). In addition, no statistically significant difference was observed between the two groups regarding the time required for both GVBD (5.86 ± 3.19 hours vs 5.89 ± 3.71 hours, *p-value* = 0.792) and PB1 extrusion (18.32 ± 2.70 hours vs 17.96 ± 3.66 hours, *p-value* = 0.914), indicating that DNA damage did not affect the transition time from the GV stage to the metaphase II (MII) stage. These data are in the same line with the data originated from the previously described titration experiments, supporting the hypothesis that DNA damage response mechanisms of human oocytes are insensitive to minimal and/or mild levels of genotoxic damage. The effect of DNA damage to oocyte morphology was also assessed. Interestingly, a statistically

significant increased rate of oocytes with abnormal morphological features, and especially with granule ooplasm, was observed in the Etop TL group compared with the Control TL group (55.56% vs 29.82%, *p-value* = 0.015). This increased rate of morphologically abnormal oocytes in the Etop TL group was recorded for both oocytes remained arrested in the GV stage and oocytes successfully reached MII stage. These findings indicate that DNA damage in human oocytes may be associated with abnormal morphological features. A subgroup analysis according to the oocyte donors' age was performed, in order to investigate the possible effect of maternal age on DDCs sensitivity during oocyte maturation. The first subgroup consisted of GV oocytes retrieved from donors with age \leq 30 years old. The second subgroup consisted of GV oocytes retrieved from donors with age $>$ 30 years old. No statistically significant difference was observed between and within subgroups with regards to all morphokinetic data analyzed. Finally, the ability of the human oocytes to repair DNA damage, focusing on DSBs, was investigated. Following the 24 hours *in vitro* culture, a significant reduction of γ -H2AX immunofluorescence levels was observed in GV-arrested oocytes previously exposed to etoposide. However, these levels remained statistically significant increase in comparison to the respective GV-arrested oocyte of the control group, which were never exposed to etoposide. These findings indicate that human oocytes can partially restore DNA damage during meiosis.

Conclusions: The findings of the present study are in the same line with previously published data, mainly originating from animal studies, and indicate that human GV oocytes can successfully complete maturation from the GV to the MII stage, even if they are carrying DNA damage. This is attributed to the low sensitivity of DNA damage response mechanisms of the human oocytes during meiosis, which on one hand can effectively arrest oocyte maturation in the presence of severe and extensive DNA damage, but on the other hand cannot prevent maturation when DNA damage is mild or minimal due to low sensitivity. However, even the mild DNA damage can cause genome instability, jeopardizing oocyte quality and competence as well as embryo developmental potential. Regarding the ability of human oocytes to repair DNA damage, it seems that it is restricted, and it is taking place mainly via homologous recombination (HR). However, it should be noted that DNA repair is not mandatory for the successful completion of oocyte maturation, as indicated by the fact that MII oocytes, previously damaged at the GV stage, are still carrying DNA lesions. Moreover, this study highlights for first time in literature

that human oocytes characterized by abnormal morphological features, and especially by granular cytoplasm, are more likely to carry DNA damage, even if reach MII stage. However, robust data are needed to verify these conclusions. Future studies employing high-throughput techniques, including OMICs and artificial intelligence, are needed in order to deeply understand human oocyte response to DNA damage in both cellular and molecular levels.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κυτταρικός κύκλος

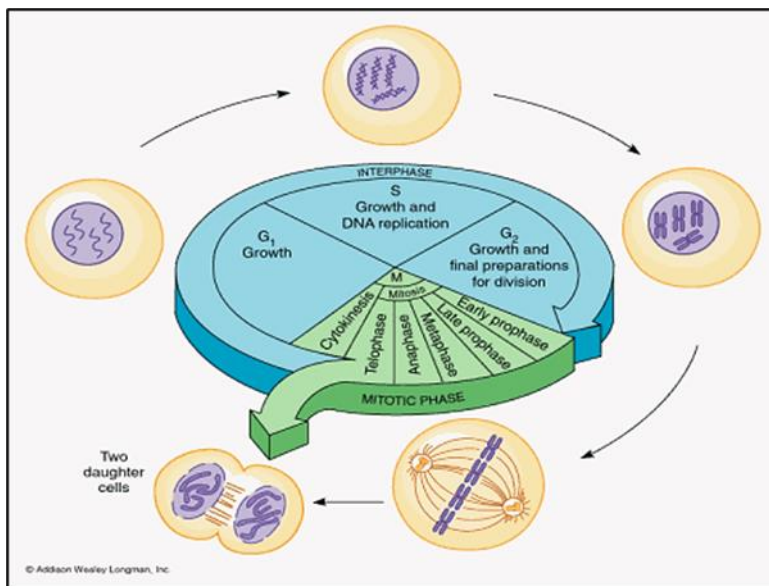
Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής. Έτσι, ως κύτταρο νοείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης, που αποτελείται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το κύτταρο διαθέτει μορφολογική, φυσική και χημική οργάνωση και την ικανότητα της αφομοίωσης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Είναι η μονάδα της ζωής η οποία είναι ανεξάρτητη ως προς την αυτορρύθμιση και την προσαρμοστικότητά της σε σχέση με το περιβάλλον, όπου ταυτόχρονα αλληλοεπιδρά έντονα με αυτό, με σκοπό την διατήρησή της (Alberts et al., 2002).

Τα κύτταρα εμφανίζουν έντονες διαφορές τόσο μορφολογικά, όσο και στις λειτουργίες που επιτελούν. Η βασική κατηγοριοποίηση των κυττάρων γίνεται με βάση την ύπαρξη ή όχι οργανιδίων στο εσωτερικό τους. Τα κύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν πυρήνα ονομάζονται προκαρυωτικά, ενώ αυτά τα οποία διαθέτουν ονομάζονται ευκαρυωτικά. Ως ευκαρυωτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που διαθέτουν έναν οργανωμένο πυρήνα, ο οποίος φέρει το γενετικό υλικό (δίκλωνο μόριο δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος, deoxyribonucleic acid, DNA) και ένα πολύπλοκο σύστημα ενδοκυτταροπλασματικών οργανιδίων και μεμβρανών (Alberts et al., 2002).

Η διαιώνιση και η εξέλιξη των ειδών και κατά επέκταση η διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, από την εμφάνισή της έως και σήμερα, βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό και να διαιρούνται, δίνοντας γένεση σε πανομοιότυπα κύτταρα. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα από την στιγμή που, μέσω κυτταρικής διαίρεσης, θα σχηματιστεί ένα αυτόνομο κύτταρο έως και την στιγμή που το κύτταρο αυτό θα διαιρεθεί για να δώσει τους δικούς του “απογόνους”, χαρακτηρίζονται ως κύκλος ζωής του κυττάρου ή “κυτταρικός κύκλος”. Για την μεγάλη πλειονότητα των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών η κυτταρική διαίρεση αποτελεί μέσω αναπαραγωγής και διατήρησης του είδους. Για τους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η κυτταρική διαίρεση αποτελεί συνθήκη αναγκαία και ικανή για την διατήρηση του οργανισμού στην ζωή, για την ανανέωση και την ανάπλαση των ιστών και των οργάνων, αλλά και για την αναπαραγωγική διαδικασία, η οποία βέβαια σε αυτήν την περίπτωση είναι αμφιγονικής φύσης (Alberts et al., 2002; Harashima et al., 2013).

1.1.1 Φάσεις Κυτταρικού Κύκλου στο Τυπικό Ευκαρυωτικό Κύτταρο

Ως κυτταρικός κύκλος ορίζεται ένα σύνολο γεγονότων κατά την διάρκεια των οποίων τα κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος, αντιγράφουν το γενετικό τους υλικό και στην συνέχεια διαχωρίζονται σε δύο νέα κύτταρα, τα οποία φέρουν πανομοιότυπο γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους, όσο και με το πατρικό κύτταρο. Ο τυπικός κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελείται από δύο βασικές φάσεις: την μεσόφαση (mesophase) και την φάση της κυτταρικής διαίρεσης ή μίτωσης (M-phase) (Harashima et al., 2013). Η μεσόφαση τυπικά διακρίνεται σε τρεις επιμέρους φάσεις: την φάση gap 1 (G1), την φάση του διπλασιασμού του γενετικού υλικού (synthesis, S) και την φάση gap 2 (G2) (Εικόνα 1).

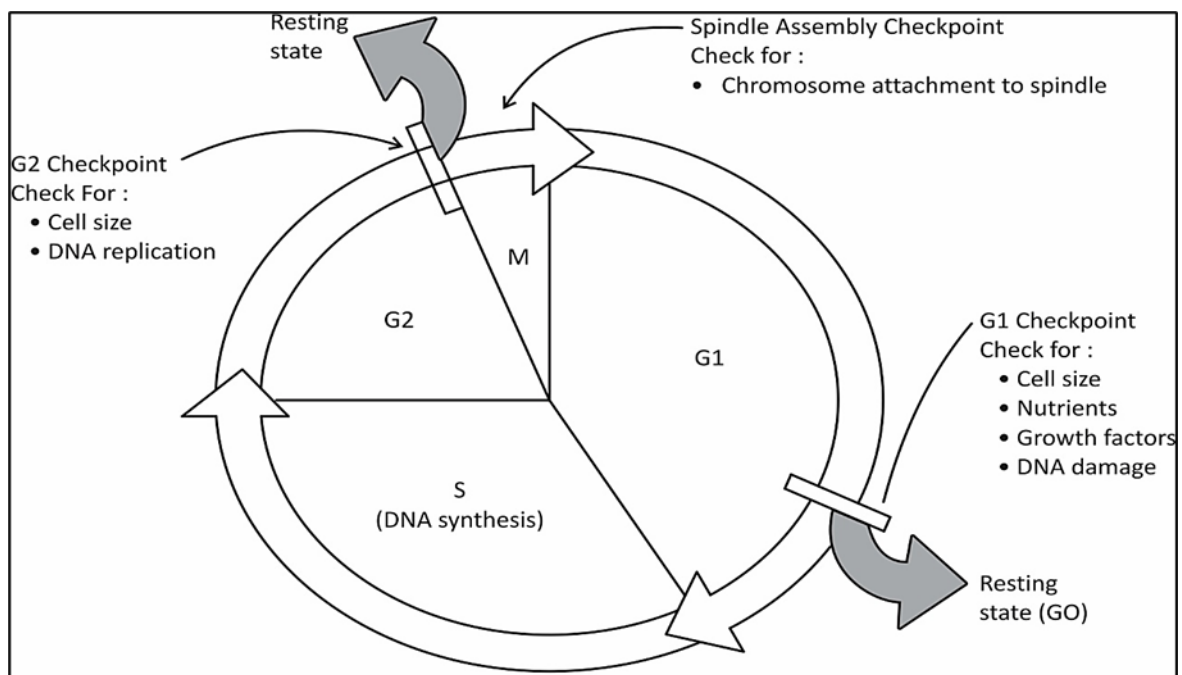


Εικόνα 1. Ο τυπικός κυτταρικός κύκλος ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Οι φάσεις G1, S και G2 καλούνται από κοινού μεσόφαση (interphase) και μετά ακολουθεί η μίτωση (mitotic phase), δηλαδή η κυτταρική διαίρεση.

Φάση Gap 1

Στην πρώτη φάση, η οποία καλείται φάση gap 1 (G1), το κύτταρο αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος και παρατηρείται έντονη μεταγραφική, μεταφραστική και πρωτεϊνοσυνθετική δραστηριότητα. Ο κυτταρικός μεταβολισμός αυξάνεται εντόνως και το κύτταρο εξοπλίζεται με όλα τα δομικά και λειτουργικά συστατικά που απαιτούνται για να εισέλθει στην επόμενη φάση του κύκλου ζωής του. Η φάση G1 συνιστά την μεγαλύτερη φάση του κυτταρικού κύκλου και η διάρκειά της ποικίλει τόσο μεταξύ των ευκαρυωτικών κυττάρων διαφορετικών οργανισμών, όσο και μεταξύ κυττάρων του ίδιου οργανισμού. Αναφορικά με τον άνθρωπο, η διάρκεια της G1 φάσης των διαιρούμενων κυττάρων είναι κατά μέσο

όρο 18 ώρες (Εικόνα 1) (Foster et al., 2010; Harashima et al., 2013; Lodish, 2000). Η φάση G1 αποτελεί ορόσημο για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, καθώς σε αυτήν καθορίζεται αν το κύτταρο θα εισέλθει στην φάση S και θα ολοκληρώσει την διαίρεσή του ή αν θα εξέλθει από τον κυτταρικό κύκλο για να εισέλθει στην φάση G0. Η μετάβαση από την φάση G1 στην φάση G0 ή αντίστοιχα στην φάση S καθορίζεται από το σημείο περιορισμού του κυτταρικού κύκλου (Restriction point, R). Στην περίπτωση όπου το περιβάλλον του κυττάρου υποστηρίζει την κυτταρική διαίρεση, το κύτταρο διέρχεται του σημείου R και εισέρχεται στην φάση S. Στην περίπτωση όπου η κυτταρική διαίρεση δεν υποστηρίζεται, ενεργοποιείται το σημείο R και το κύτταρο εισέρχεται στην φάση G0. Η φάση G0 χαρακτηρίζεται ως φάση “ηρεμίας” κατά την οποία το κύτταρο αλληλοεπιδρά φυσιολογικά με το περιβάλλον του, παρουσιάζει μεταβολική δραστηριότητα και επιτελεί τους βιολογικούς του ρόλους, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει δραστηριότητα διπλασιασμού (Εικόνα 2) (Alberts et al., 2002; Limas and Cook, 2019; Matson and Cook, 2017).



Εικόνα 2. Η φάση G1 αποτελεί ορόσημο για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, καθώς σε αυτήν καθορίζεται αν το κύτταρο θα εισέλθει στην φάση S και θα ολοκληρώσει την διαίρεσή του ή αν θα εξέλθει από τον κυτταρικό κύκλο για να εισέλθει στην φάση G0. Η φάση G0 χαρακτηρίζεται ως φάση “ηρεμίας” κατά την οποία το κύτταρο αλληλοεπιδρά φυσιολογικά με το περιβάλλον του, παρουσιάζει μεταβολική δραστηριότητα και επιτελεί τους βιολογικούς του ρόλους, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει δραστηριότητα διπλασιασμού. Ο έλεγχος για την είσοδο στην φάση G0 πραγματοποιείται μέσω του σημείου ελέγχου της φάσης G1 (G1 Checkpoint) ή αλλιώς μέσω του σημείου περιορισμού (Restriction point-R). Η ανεπαρκής κυτταρική αύξηση κατά την G1, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η απουσία μιτογόνων και αυξητικών παραγόντων από το περιβάλλον του κυττάρου και η ύπαρξη βλαβών στο DNA αποτελούν τους κλασικούς λόγους εισόδου ενός κυττάρου στην φάση G0. Με την άρση των συνθηκών αυτών το κύτταρο δίνεται να διέλθει του σημείου R, να εισέλθει εκ νέου στην φάση G1 και από εκεί να συνεχίσει προς κυτταρική διαίρεση (τροποποιημένη εικόνα από: <https://www.letstalkacademy.com>).

Ένα κύτταρο μπορεί να εισέλθει στην φάση G0 για πολλούς λόγους που σχετίζονται τόσο με το περιβάλλον ανάπτυξής του και την ύπαρξη πιθανών βλαβών στο DNA, όσο και με τον βιολογικό ρόλο που αυτό επιτελεί. Πιο αναλυτικά, εάν το περιβάλλον του κυττάρου είναι αδύνατον να υποστηρίξει την αύξηση, την ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση (π.χ λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών), τότε το κύτταρο εισέρχεται στην φάση G0, ακόμα και αν η “μοίρα” του είναι να πραγματοποιήσει κυτταρική διαίρεση. Στην περίπτωση αυτή, μόλις οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν ευνοϊκές, τότε το κύτταρο μπορεί να μεταβεί εκ νέου από την φάση G0 στην φάση G1 και στην συνέχεια στην φάση S και έτσι να συνεχιστεί ο κυτταρικός κύκλος με την τελική διαίρεση του κυττάρου. Παρόμοια γεγονότα λαμβάνουν χώρα και στην περίπτωση ανίχνευσης βλαβών στο DNA. Στην περίπτωση αυτή το κύτταρο εισέρχεται στην φάση G0, έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη. Μόλις αυτό καταστεί εφικτό, το κύτταρο μπορεί να μεταβεί εκ νέου από την φάση G0 στην φάση G1 και στην συνέχεια στην φάση S και έτσι να συνεχιστεί ο κυτταρικός κύκλος με την τελική διαίρεση του κυττάρου. Σε αντίθετη περίπτωση το κύτταρο συνήθως οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) (Εικόνα 2) (Alberts et al., 2002; Limas and Cook, 2019; Matson and Cook, 2017).

Ένα κύτταρο μπορεί ωστόσο να εισέλθει στην φάση G0, όταν η “μοίρα” του είναι καθορισμένη ώστε αυτό να μην προχωρήσει σε κυτταρική διαίρεση, ακόμα και αν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό. Στην περίπτωση αυτή, το κύτταρο λαμβάνει ενδοκρινικά, παρακρινικά και αυτοκρινικά σήματα τα οποία ενεργοποιούν το σημείο περιορισμού R και έτσι το κύτταρο εισέρχεται και παραμένει στην φάση G0. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται έντονα στα ευκαρυωτικά κύτταρα των ανώτερων πολυκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών, τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί ώστε να επιτελούν συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, όπως είναι τα μυϊκά και νευρικά κύτταρα του ανθρώπου. Ωστόσο, και στην περίπτωση αυτή, εάν το κύτταρο λάβει μιτογόνα ερεθίσματα από αυξητικούς παράγοντες (growth factors) δύναται να εισέλθει ξανά στον κυτταρικό κύκλο και εν τέλει να οδηγηθεί σε διαίρεση (Εικόνα 2) (Alberts et al., 2002; Limas and Cook, 2019; Matson and Cook, 2017).

Φάση Σύνθεσης (synthesis, S)

Μόλις ολοκληρωθεί η G1 φάση και εφόσον η “μοίρα” του κυττάρου (cell fate) έχει καθοριστεί προς κυτταρική διαίρεση, το κύτταρο εισέρχεται στην δεύτερη φάση του κύκλου, που καλείται φάση σύνθεσης (synthesis, S) (Εικόνα 1). Στην φάση S του κυτταρικού κύκλου

πραγματοποιείται η αντιγραφή του γενετικού υλικού, δηλαδή του δίκλωνου γραμμικού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (deoxyribonucleic, DNA). Δεδομένου του γεγονότος πως μέσω του διπλασιασμού, δηλαδή της αντιγραφής του DNA, η γενετική πληροφορία θα περάσει στην επόμενη γενιά κυττάρων, η φάση S του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται υπό τον αυστηρό έλεγχο πολύπλοκων μοριακών συστημάτων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (check points). Μέσω των συστημάτων αυτών, τα οποία παρουσιάζουν, λόγω της σημαντικότητάς τους, υψηλή συντήρηση μεταξύ των διαφορετικών ευκαρυωτικών οργανισμών, διασφαλίζεται πως το κύτταρο θα εισέλθει στην S φάση μόνο όταν διαθέτει τα απαραίτητα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά για την αντιγραφή του DNA και την δόμηση της χρωματίνης και πως θα εξέλθει από αυτήν μόνο όταν έχει διασφαλιστεί η πιστή αντιγραφή του DNA και η ακεραιότητα του γενετικού υλικού (Bertoli et al., 2013; Leonard and Méchali, 2013).

Φάση Gap 2

Στον τυπικό κύκλο ζωής των ευκαρυωτικών κυττάρων, αμέσως μετά την S φάση και αφού “πιστοποιηθεί” η ακεραιότητα του γενετικού υλικού, το κύτταρο εισέρχεται στην τρίτη φάση του κυτταρικού κύκλου, η οποία καλείται φάση gap 2 (G2) (Εικόνα 1). Η φάση G2 αποτελεί την τελευταία φάση της μεσόφασης (interphase), όπως έχει χαρακτηριστεί η φάση του κυτταρικού κύκλου που περιλαμβάνει τις φάσεις G1, S και G2. Κατά την G2 φάση το κύτταρο παρουσιάζει έντονο μεταβολισμό, έντονη βιοσυνθετική δραστηριότητα και αυξάνεται ταχέως. Όλες οι ανωτέρω περιγραφόμενες προσαρμογές λαμβάνουν χώρα ώστε το κύτταρο να προετοιμαστεί κατάλληλα για να εισέλθει στην τελευταία βάση του κυτταρικού κύκλου, στην φάση της μίτωσης, δηλαδή της κυτταρικής διαίρεσης (Alberts et al., 2002; Crosby, 2007).

Η φάση G2 ολοκληρώνεται με την έναρξη της πρόφασης, της πρώτης φάσης της μίτωσης, όπου και αρχίζει να παρατηρείται πύκνωση της δομής της χρωματίνης και σχηματισμός των χρωμοσωμάτων. Έχει διάρκεια αρκετά μικρότερη από την φάση G1 και παρά το γεγονός πως έχει διερευνηθεί εκτενώς, υπάρχουν ακόμα σημαντικά κενά στην βιβλιογραφία αναφορικά με τον ακριβή της ρόλο και τους μηχανισμούς που την ρυθμίζουν (Alberts et al., 2002; Burgoyne et al., 2007; Crosby, 2007; Liskay, 1977; Moseley et al., 2009).

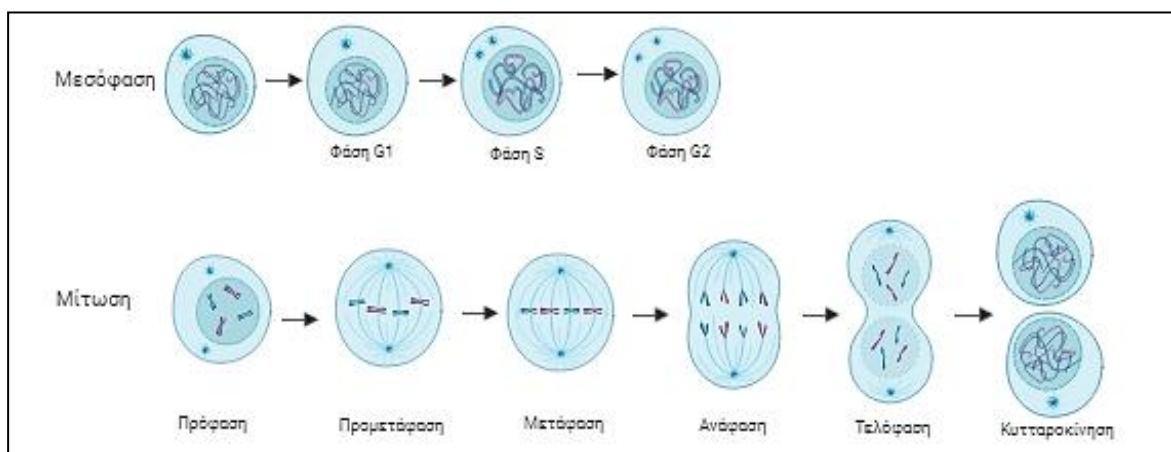
Αν και η G2 φάση αποτελεί τυπικό μέρος του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων των μονοκύτταρων, αλλά και των πολυκύτταρων οργανισμών, παρουσιάζονται ορισμένες ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις. Έχει καταδειχθεί ότι ορισμένα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως είναι τα κύτταρα στην πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και τα καρκινικά κύτταρα, μεταβαίνουν αυτόματα από την S φάση στην μίτωση, χωρίς να παρεμβάλλεται η G2 φάση. Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω διαγράφεται η σημαντικότητα της διερεύνησης των μηχανισμών ρύθμισης, αλλά και του ρόλου της G2 φάσης, στον κύκλο της ζωής των ευκαρυωτικών κυττάρων. Αναφορικά με τον ρόλο της έχει καταδειχθεί πως αποτελεί ρυθμιστή του μεγέθους του κυττάρου, εξασφαλίζοντας πως θα είναι δυνατός ο διαχωρισμός του πατρικού κυττάρου σε δύο αδελφά κύτταρα τα οποία θα φέρουν τις ίδιες ιδιότητες τόσο μεταξύ τους, όσο και με το πατρικό κύτταρο. Επιπρόσθετα, φαίνεται πως αποτελεί το τελικό σημείο “κλειδί” για την ανίχνευση πιθανών βλαβών στο DNA, πριν την έναρξη της μίτωσης (Alberts et al., 2002; Burgoyne et al., 2007; Crosby, 2007; Liskay, 1977; Moseley et al., 2009).

Μίτωση (mitosis) ή Φάση M (M-phase)

Ο κυτταρικός κύκλος των διαιρούμενων ευκαρυωτικών κυττάρων ολοκληρώνεται με την κυτταρική διαίρεση ή αλλιώς μίτωση (mitosis), η οποία συνιστά και την τέταρτη και τελευταία φάση του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1). Παρά το γεγονός πως η μίτωση είναι μια ενιαία κυτταρική διεργασία, για λόγους κατανόησης και προκειμένου η έρευνα στο πεδίο να είναι εφικτή, διακρίνεται σε πέντε επιμέρους φάσεις: την πρόφαση (prophase), την προμετάφαση (prometaphase), την ανάφαση (anaphase), την τελόφαση (telophase) και την κυτταροκίνηση (cytokinesis), η οποία αφορά το διαχωρισμό του κυτταροπλάσματος (Blow and Tanaka, 2005; Zhou et al., 2002) (Εικόνα 3).

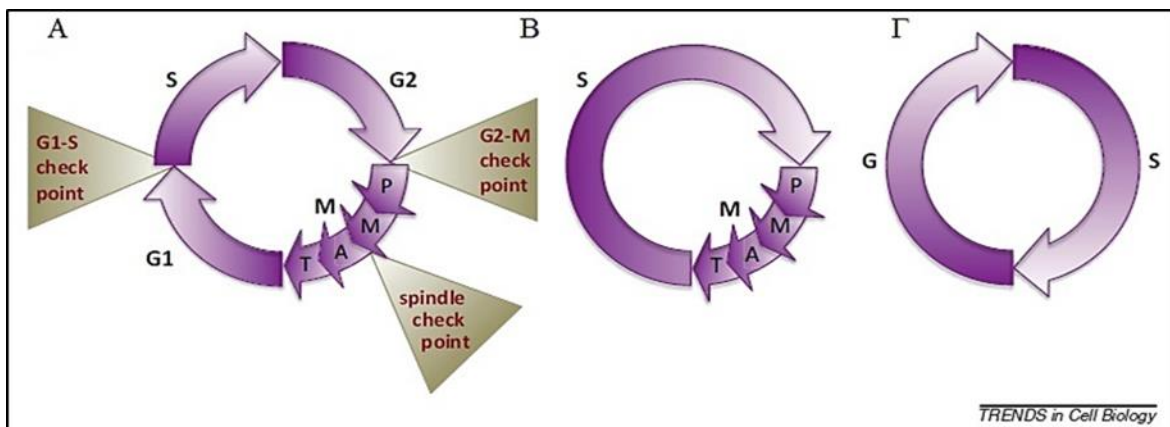
Αν και η μίτωση περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο της διατριβής, αξίζει στο σημείο αυτό να πραγματοποιηθεί μία συνοπτική παρουσίαση. Πρωταρχικός στόχος της μίτωσης και της κυτταροκίνησης είναι από ένα πατρικό κύτταρο να προκύψουν δύο γενετικά, λειτουργικά και μορφολογικά όμοια αδελφά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιείται ισομοιρασμός του κυτταροπλάσματος και του γενετικού υλικού μέσω ενός πολύπλοκου και αυστηρά ελεγχόμενου μηχανισμού (Blow and Tanaka, 2005; Zhou et al., 2002).

Με την έναρξη της μίτωσης, άρχεται η πύκνωση της χρωματίνης και η αρχική διαμόρφωση των χρωμοσωμάτων. Στην συνέχεια και καθώς η πύκνωση της χρωματίνης γίνεται πιο έντονη, διαρρηγνύεται η μεμβράνη του πυρήνα και σταδιακά αποδιοργανώνεται όλος ο πυρήνας. Ταυτόχρονα αρχίζει η διοργάνωση της μιτωτικής ατράκτου (mitotic spindle), η οποία αποτελείται από τα δύο κεντροσωμάτια, τα οποία συνιστούν τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων και τους μικροσωληνίσκους που εκπορεύονται από τα κεντροσωμάτια. Τα κεντροσωμάτια οργανώνονται από δομές μικροσωληνίσκων που ονομάζονται κεντριόλια και βρίσκονται ακροβολισμένα στους δύο πόλους του κυττάρου. Οι μικροσωληνίσκοι προσδένονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων (πρωτεϊνικές δομές που βρίσκονται στο κεντρομερές), τα οποία και έχουν διαταχθεί στο ισημερινό πεδίο του κυττάρου. Οι μικροσωληνίσκοι συνδέονται στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων και έλκουν τις χρωματίδες προς τους πόλους του κυττάρου. Μέσω του μηχανισμού αυτού οι αδελφές χρωματίδες, που προηγουμένως συνέθεταν το χρωμόσωμα, βρίσκονται τώρα διαχωρισμένες στους πόλους του κυττάρου, ώστε κάθε νέο κύτταρο που θα προκύψει να έχει μία αδερφή χρωματίδα, δηλαδή ένα αντίγραφο του γενετικού υλικού του πατρικού κυττάρου. Μόλις ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων σχηματίζεται νέα πυρηνική μεμβράνη στους δύο πόλους του κυττάρου. Στο τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο η μίτωση ολοκληρώνεται με των διαχωρισμό των αδελφών κυττάρων μέσω της κυτταροκίνησης, κατά την οποία πραγματοποιείται αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και διαχωρισμός των αδελφών κυττάρων (Blow and Tanaka, 2005; Zhou et al., 2002) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Οι φάσεις της Μεσόφασης και της Μίτωσης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως τα ανωτέρω περιγραφόμενα σχετικά με τις φάσεις και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναφέρονται στο γενικότερο πρότυπο που έχει καθοριστεί για το τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο. Ωστόσο, μεταξύ των κυτάρων διαφορετικών οργανισμών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων του ίδιου οργανισμού, παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις, τόσο αναφορικά με τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, όσο και αναφορικά με το πρόγραμμα ζωής του κυττάρου *per se* και οι αλλαγές αυτές παρατηρούνται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και εξυπηρετούν συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες (Harashima et al., 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να διέρχονται από την μία ή και από τις δύο φάσεις gap και να ολοκληρώνουν τον κυτταρικό τους κύκλο σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 18 ωρών (Edgar and Lehner, 1996). Ένα άλλο αξιοσημείωτο φαινόμενο τροποποιημένου κυτταρικού κύκλου αποτελεί αυτό της ενδομίτωσης ή του ενδοκύκλου (endoreplication or endocycle), το οποίο και παρατηρείται σε πολλούς ευκαρυωτικούς, φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, αλλά και στον άνθρωπο (Breuer et al., 2010; Fox and Duronio, 2013; Gandarillas et al., 2018; Shu et al., 2018; Veylder et al., 2011). Κατά την ενδοαντιγραφή λαμβάνουν χώρα πολλαπλοί κύκλοι αντιγραφής του DNA χωρίς ωστόσο το κύτταρο να υφίσταται μίτωση και κυτταροκίνηση. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν πολυπλοειδή ή πολυπύρρηνα κύτταρα (Εικόνα 4). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, φαίνεται πως ο κυτταρικός κύκλος παρουσιάζει τεράστια ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων του ίδιου οργανισμού.



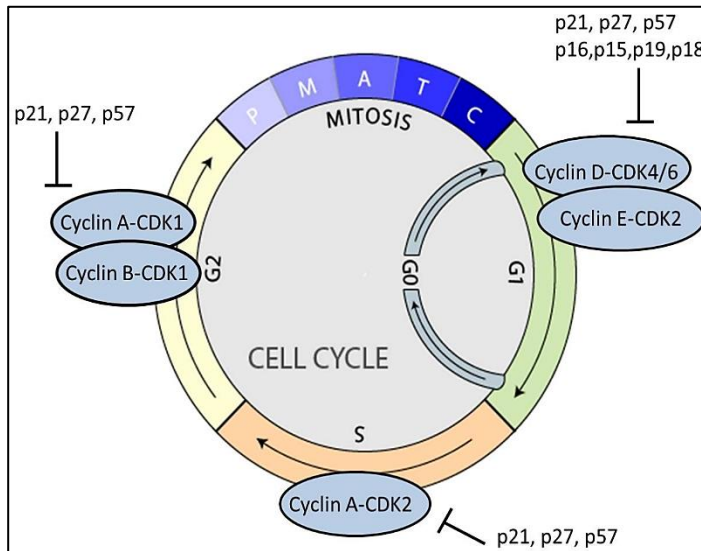
Εικόνα 4. Μιτωτικός κυτταρικός κύκλος και διαφορετικά πρότυπα. Α. Τυπικός κυτταρικός κύκλος ευκαρυωτικού κυττάρου. **Β.** Κυτταρικός κύκλος εμβρυϊκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται ταχέως και μπορούν να διέρχονται από την μία ή και τις δύο φάσεις gap. **Γ.** Το φαινόμενο της ενδομίτωσης (endoreplication or endocycle). Κατά την ενδοαντιγραφή λαμβάνουν χώρα πολλαπλοί κύκλοι αντιγραφής χωρίς ωστόσο το κύτταρο να υφίσταται μίτωση και κυτταροκίνηση.

1.1.2 Σημεία και Συστήματα Ελέγχου του Κυτταρικού Κύκλου

Μελετώντας των κύκλο ζωής των κυττάρων και ειδικά των ευκαρυωτικών, γίνεται εύκολα αντιληπτό πως ο όρος “κυτταρικός κύκλος” χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα συνονθύλευμα περίπλοκων γεγονότων τα οποία λαμβάνουν χώρα από την στιγμή του σχηματισμού έως και της διαίρεσης ενός κυττάρου. Στόχος είναι από ένα πατρικό κύτταρο να προκύψουν δύο θυγατρικά κύτταρα, τα οποία θα φέρουν πανομοιότυπη δομή και οργάνωση τόσο μεταξύ τους, όσο και με το πατρικό κύτταρο. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα πραγματοποιούνται με αξιοσημείωτο συγχρονισμό και οργάνωση. Για να εξασφαλιστεί αυτό, το κύτταρο διαθέτει ένα περίπλοκο σύστημα ελέγχου της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Η ύπαρξη του συστήματος αυτού εξασφαλίζει αφενός μεν το συντονισμό των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αφετέρου δε πως η γενετική πληροφορία θα περάσει αναλλοίωτη από τη μία γενεά κυττάρων στην άλλη. Αν και τα συστήματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών αλλά και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων του ίδιου οργανισμού, φαίνεται πως παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των οργανισμών, γεγονός που καταδεικνύει απερίφραστα πως η παρουσία τους είναι εξαιρετικά σημαντική και άκρως συνυφασμένη με την ύπαρξη και την εξέλιξη της ζωής στον πλανήτη (Barnum and O’Connell, 2014).

Τα συστήματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην δραστηριότητα μίας μεγάλης οικογένειας εξειδικευμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-depended kinases, CDKs) (Barnum and O’Connell, 2014). Οι CDKs, είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και όπως άλλωστε υποδηλώνεται από την ονομασία τους, είναι ένζυμα τα οποία φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες, που αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές (master regulators) της σύνθεσης του DNA και της μιτωτικής διαδικασίας (Barnum and O’Connell, 2014). Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται με κατανάλωση κυτταρικής ενέργειας υπό την μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP). Οι καταλυτικές υπομονάδες των ενζύμων αυτών βρίσκονται σε πλεόνασμα εντός του κυττάρου, παραμένουν όμως ανενεργές, έως ότου συνδεθούν με την κατάλληλη ρυθμιστική υπομονάδα κυκλίνης. Οι διαθέσιμες υπομονάδες κυκλίνης αλλάζουν τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και η επάρκειά τους ρυθμίζεται μέσω πρωτεϊνοσύνθεσης και μέσω πρωτεόλυσης από το σύστημα λιγάσης-ουβικουιτίνης (ubiquitin-dependent

proteolysis). Ανάλογα με την υπομονάδα κυκλίνης με την οποία θα συνδεθούν οι CDKs σχηματίζονται διαφορετικά σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, τα οποία και ασκούν ποικίλους μοριακούς ρυθμιστικούς ρόλους, επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου σχηματίζονται διαφορετικά σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών τα οποία και ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Barnum and O'Connell, 2014) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών αποτελούν τους κεντρικούς ρυθμιστές ελέγχου της πρόοδου του κυτταρικού κύκλου.

Αν και τα συστήματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζονται κυρίως στην δραστηριότητα των συμπλόκων CDKs, θα μπορούσαμε ποιοτικά να διακρίνουμε πέντε διακριτά σημεία ελέγχου της πρόοδου του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα σημεία αυτά είναι τα εξής: 1) Σημεία ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου, 2) Σημεία ελέγχου ανίχνευσης βλάβης στο DNA, 3) Σημεία ελέγχου της αντιγραφής του DNA, 4) Σημείο ελέγχου της μετάβασης από την S στην M φάση και 5) Σημείο ελέγχου της ακεραιότητας της Μιτωτικής Ατράκτου. Η έρευνα για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι συνεχής και έχει δημοσιευθεί ένας μεγάλος αριθμός εργασιών στις οποίες παρουσιάζονται με λεπτομέρεια οι μηχανισμοί αυτοί (Barnum and O'Connell, 2014; Errico and Costanzo, 2012; Giono and Manfredi, 2006; Goodarzi and Jeggo, 2013; Grallert and Boye, 2008; Lambert and Carr, 2013, 2005; Lara-Gonzalez et al., 2012). Στο σημείο αυτό παρουσιάζονται περιληπτικά οι μηχανισμοί, ώστε να αποτυπωθεί η πολυπλοκότητα των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Σημεία ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου

Πριν την κυτταρική διαίρεση θα πρέπει να διασφαλιστεί τόσο ότι το κύτταρο έχει διπλασιάσει σωστά το γενετικό του υλικό, ώστε αυτό να μεταβιβαστεί αναλλοίωτο στην επόμενη γενιά κυττάρων, όσο και ότι το κύτταρο διαθέτει σε επάρκεια τα απαραίτητα βιοχημικά συστατικά, τα οποία και αποτελούν τους λειτουργικούς και δομικούς λίθους διατήρησης της έμβιας ύλης, ώστε να τα μεταβιβάσει και αυτά στην επόμενη γενιά κυττάρων. Για τους πολυκύτταρους δε οργανισμούς, ο έλεγχος του μεγέθους των κυττάρων αποτελεί συνθήκη αναγκαία ώστε να διασφαλιστεί η σωστή κατανομή των θρεπτικών συστατικών και των σηματοδοτικών μορίων, αλλά και η δομή και η σωστή λειτουργία των ιστών και των οργάνων. Ουσιαστικά τα σημεία ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου έχουν προταθεί ως μέρος του βασικού μηχανισμού ελέγχου που συντονίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με το μέγεθος του κυττάρου. Μελέτες έχουν καταδείξει πως τα σημεία ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου ενεργοποιούνται κατά τις φάσεις G1 και G2. Η ανάγκη διερεύνησης της ύπαρξης αυτών των σημείων ελέγχου προήλθε από την παρατήρηση πως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου παρουσίαζε διαφορές μεταξύ αδελφών κυττάρων που στην έναρξη της G1 φάσης είχαν διαφορετικό μέγεθος. Πιο αναλυτικά, στα αδελφά κύτταρα τα οποία ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος παρατηρήθηκε γρήγορη διέλευση από τις G1 και G2 φάσεις, σε αντίθεση με τα μικρότερα σε μέγεθος αδελφά κύτταρα στα οποία η διέλευση από τις G1 και G2 φάσεις ήταν πιο αργή και πραγματοποιούταν μόνο όταν τα κύτταρα αποκτούσαν ένα κρίσιμο μέγεθος (Killander and Zetterberg, 1965a, 1965b). Και στην περίπτωση των σημείων ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη ετερογένεια αναφορικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ρύθμιση των σημείων αυτών, τόσο μεταξύ των διαφορετικών ευκαρυωτικών κυττάρων, όσο και μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του ίδιου οργανισμού.

Τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα μαρτυρούν πως στους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης των σημείων ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου εμπλέκονται πρωτεΐνες και μεταγραφικοί παράγοντες που διαδραματίζουν ρυθμιστικούς ρόλους κατά την διάρκεια της G1 φάσης και κατά την μετάβαση από την G2 στην M. Πιο αναλυτικά και αναφορικά με την G1 φάση, έχει αποδειχθεί πως η κυκλίνη Cln3, η οποία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Start, αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή του μεγέθους του κυττάρου (Cross, 1988; Moreno et al., 1990; Nash et al., 1988; Nurse, 1975). Κατά την μετάβαση από την G2 στην

Μ σημαντικό ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες Cdc25 και Wee1, οι οποίες επιτρέπουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου επί επάρκειας θρεπτικών συστατικών και εν τέλει όταν το κύτταρο έχει το κατάλληλο μέγεθος. Την βιολογική τους δράση φαίνεται πως την ασκούν μέσω ελέγχου του σχηματισμού του συμπλόκου Cdc2-κυκλίνης B (Cross, 1988; Moreno et al., 1990; Nash et al., 1988; Nurse, 1975).

Γενικεύοντας, έχει προταθεί πως ο έλεγχος επιτυγχάνεται μέσω του δυναμικού ελέγχου της μετάφρασης των πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά, έχει καταδειχθεί πως η μάζα των ριβοσωμάτων και άρα η μεταφραστική δυναμική των κυττάρων σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των κυττάρων. Θεωρείται πως όταν οι δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών και τα λειτουργικά συστατικά του μεταφραστικού μηχανισμού βρίσκονται σε αφθονία, συντίθενται σε πλεόνασμα μια ομάδα πρωτεϊνών, που καλούνται “μεταφραστές μεγέθους” (translational sizers), οι οποίοι ως μεταγραφικοί παράγοντες επιτρέπουν την ομαλή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Jorgensen et al., 2002). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Cln3 και Cdc25 φαίνεται πως αποτελούν δύο από τους βασικούς “μεταφραστές μεγέθους” των κυττάρων. Η ανωτέρω περιγραφόμενη υπόθεση αποτελεί επιπρόσθετα και μία εξήγηση του φαινομένου κατά το οποίο παρατηρείται διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου επί ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών, δεδομένου πως στον μοριακό μηχανισμό ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου συμμετέχει ομάδα μορίων που εμπλέκονται και στα σημεία ελέγχου της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Επί ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών το κύτταρο στερείται της δυνατότητας να συνθέσει τις απαραίτητες πρωτεΐνες που η έκφραση των οποίων είναι αναγκαία για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ως αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται και το κύτταρο σταδιακά θα απωλέσει την μάζα του (Jorgensen et al., 2002). Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως έχουν προταθεί και άλλοι μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου, όπως ο έλεγχος μέσω καθορισμού της γεωμετρίας του κυττάρου, όπου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν κεντρικοί ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου όπως η Cdk1 πρωτεΐνη, η οποία αναστέλλεται από την κινάση Wee1 και ενεργοποιείται από την φωσφατάση Cdc25 (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009).

Συνοψίζοντας, τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου είναι άμεσα εξαρτώμενη από το μέγεθος του ευκαρυωτικού κυττάρου και με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται πως το κύτταρο θα οδηγηθεί σε κυτταρική διαίρεση μόνο υπό επάρκειας δομικών και λειτουργικών συστατικών. Όταν το μέγεθος του

κυττάρου δεν αντιστοιχεί στην κατάλληλη φάση ανάπτυξης, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου αναστέλλεται. Στους μοριακούς μηχανισμούς ελέγχου του μεγέθους του κυττάρου συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες και μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται και στην ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που αποδεικνύει την αλληλένδετη σχέση μεταξύ προόδου του κυτταρικού κύκλου και κυτταρικού μεγέθους. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν το σύστημα αυτό είναι πολύπλοκοι και σε μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστοι. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τον καθορισμό του ρυθμιστικού ρόλου του μεγέθους ενός κυττάρου για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

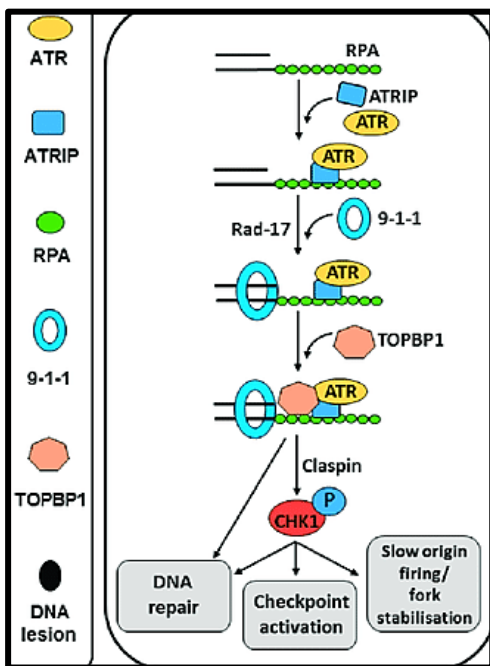
Σημεία ελέγχου ανίχνευσης βλάβης στο DNA

Η διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, η εξέλιξη των ειδών και η λειτουργία των πολυκύτταρων οργανισμών βασίζεται στην αρχή πως η γενετική πληροφορία πρέπει να περάσει αναλλοίωτη από την μία γενεά κυττάρων στην άλλη. Είναι λοιπόν εμφανές πως κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου πρέπει να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της γενετικής πληροφορίας και αυτό επιτυγχάνεται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που από κοινού καλούνται “σημεία ελέγχου ανίχνευσης βλάβης στο DNA”. Κατά τη διάρκεια της μετάφασης όταν προκληθούν βλάβες στην δομή ή την σύσταση του DNA ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται (cell cycle arrest) προκειμένου να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος για να επιδιορθωθούν οι βλάβες. Το γενικότερο πρότυπο που ακολουθεί η μεγάλη πλειονότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων χαρακτηρίζεται από την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA έως ότου η βλάβη επιδιορθωθεί όπου και παρατηρείται άρση της διακοπής και φυσιολογική εξέλιξη της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση όπου η επιδιόρθωση καθίσταται αδύνατη το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση και με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται ότι δεν θα υπάρξει επόμενη γενιά κυττάρων που θα φέρει την καταστροφική βλάβη. Η γενετική βάση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, εντοπίζεται ακριβώς σε αυτό το σημείο. Σε περίπτωση όπου η γενετική βλάβη δεν επιδιορθωθεί και για διάφορους λόγους ο κυτταρικός κύκλος δεν διακοπεί, τότε οι νέες γενιές κυττάρων θα φέρουν εκ της αρχής της ζωής τους την βλάβη με αποτέλεσμα τα κύτταρα να έχουν μη φυσιολογικές έως και παθολογικές ιδιότητες (Barnum and O’Connell, 2014).

Βλάβες στο DNA μπορεί να προκληθούν από ποικίλες πηγές συμπεριλαμβανομένων των τοξικών παραγόντων του μεταβολισμού του κυττάρου (π.χ ελεύθερες-δραστικές ρίζες οξυγόνου), της επίδρασης της υπεριώδους και ιονίζουσας

ακτινοβολίας, της επίδρασης τοξικών παραγόντων του περιβάλλοντος, της επίδρασης αντικαρκινικών θεραπειών και πολλών άλλων. Επιπρόσθετα, οι βλάβες μπορεί να είναι αποτέλεσμα της φυσικής γήρανσης των κυττάρων, όπως συμβαίνει με την μείωση του μήκους των τελομερών και την επακόλουθη εξάλειψη του προστατευτικού τους ρόλου ή με την υπερέκφραση ογκογόνων πρωτεϊνών όταν συμβεί κάποια μεταλλαγή στα γονίδια που τις εκφράζουν, ενώ και οι βλάβες στο πλαίσιο της αντιγραφής του DNA είναι συνηθισμένες.

Ανεξάρτητα από την πηγή πρόκλησης της βλάβης, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, που παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση και την επιδιόρθωση των βλαβών και κατά επέκταση για την διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Πιο αναλυτικά, όταν παρουσιάζεται βλάβη στο DNA, ενεργοποιούνται τα “στοιχεία” απόκρισης στην βλάβη του γενωμικού DNA (lesion-specific responses for DNA repair), τα οποία ενεργοποιούν κοινά μόρια που εμπλέκονται στα σημεία ελέγχου της προόδου του κυτταρικού κύκλου, τα οποία με την σειρά τους απενεργοποιούν τα σύμπλοκα των CDKs και έτσι η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου διακόπτεται έως ότου η βλάβη επιδιορθωθεί. Σε γενικές γραμμές, τα σημεία ελέγχου ανίχνευσης βλάβης στο DNA διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Σε αυτά που ελέγχονται από ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και τον μεταγραφικό παράγοντα p53 και σε αυτά που ελέγχονται από την εξειδικευμένη κινάση ελέγχου των βλαβών στο DNA Chk1 (Εικόνα 6) (Barnum and O’Connell, 2014).



Εικόνα 6. Το μονοπάτι ελέγχου βλάβης στο DNA που ελέγχεται από την κινάση Chk1. Τροποποιημένο από (Rundle et al., 2017).

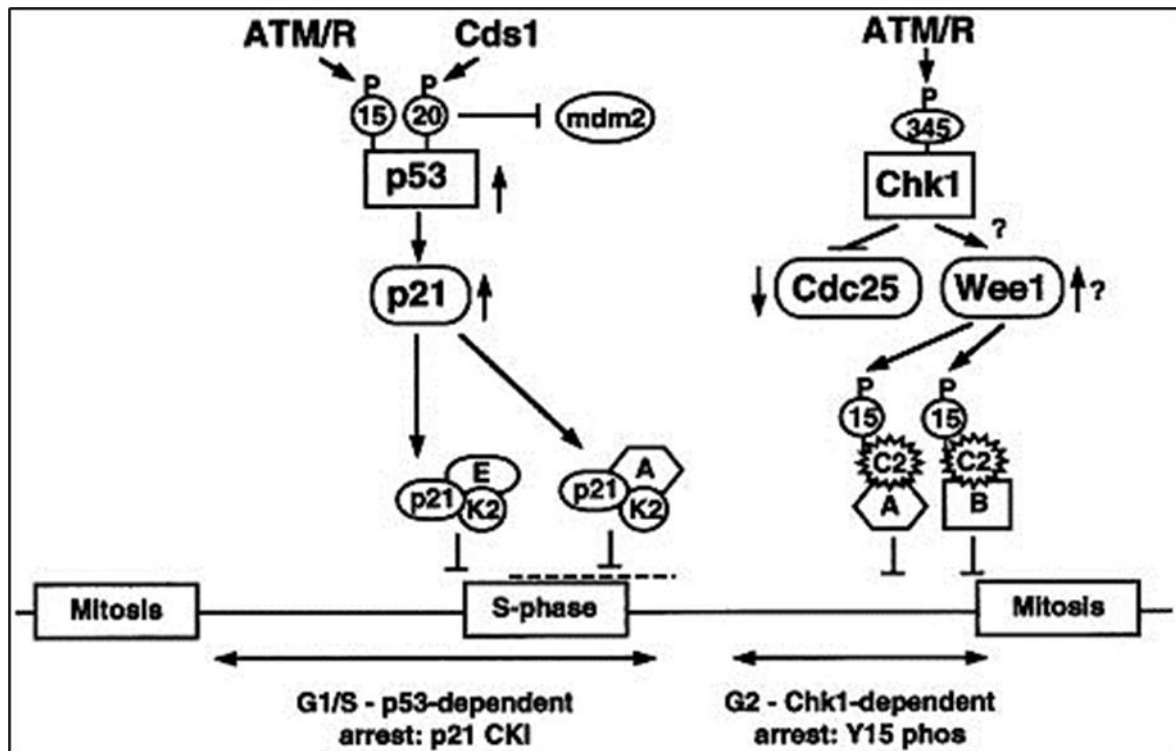
Αναφορικά με το μονοπάτι ελέγχου που ρυθμίζεται από την κινάση Chk1, φαίνεται πως παρουσιάζει υψηλή συντήρηση από την ζύμη έως και τον άνθρωπο και για αυτό τον λόγο έχει διερευνηθεί εκτενώς, τόσο σε επίπεδο γενετικής βάσης, όσο και μέσω της διερεύνησης του μηχανισμού σε μεταλλαγμένα μοντέλα ζύμης (al-Khodairy et al., 1994; al-Khodairy and Carr, 1992; Enoch et al., 1992). Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα θηλαστικά το μονοπάτι της κινάσης Chk1 φαίνεται πως είναι εμπλουτισμένο με κάποια επιπρόσθετα στοιχεία, αλλά εν πολλοίς οι μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου του μονοπατιού παραμένουν συντηρημένοι (Goldberg et al., 2003; Kumagai and Dunphy, 2000; Stewart et al., 2003; Wang et al., 2002). Σε γενικές γραμμές, το μονοπάτι της κινάσης Chk1 ενεργοποιείται ως απόκριση σε κάθε είδους γνωστή βλάβη του DNA, όμως τα δεδομένα δείχνουν πως το μονοπάτι αποκρίνεται σε βλάβες που λαμβάνουν χώρα κυρίως κατά την S και την G2 φάση και λιγότερο κατά την G1 (al-Khodairy et al., 1994; Latif et al., 2004).

Ανεξάρτητα από το είδος της βλάβης, φαίνεται πως το μονοπάτι της κινάσης Chk1 ενεργοποιείται με την εμφάνιση μονόκλωνου DNA, όταν αυτό περιβάλλεται από την πρωτεΐνη αντιγραφής A (Replication Protein A-RPA) (Εικόνα 6). Στο σύμπλοκο μονόκλωνου DNA-RPA προσδένονται σύμπλοκα πρωτεϊνών ελέγχου βλαβών στο DNA, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται η κινάση ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related), στα ανθρώπινα κύτταρα, η οποία και αποτελεί στόχο των πρωτεϊνών ATRIP και του συμπλόκου PCNA το οποίο καλείται και σύμπλοκο 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) (Εικόνα 6). Το τελευταίο σύμπλοκο επιστρατεύεται από το σύμπλοκο του παράγοντα C της αντιγραφής (Replication Factor C, RFC), στα σημεία που εντοπίζονται βλάβες στο DNA. Επί ανίχνευσης βλάβης στο DNA, ενεργοποιείται η κινάση ATR, η οποία επιστρατεύει στα σημεία της βλάβης, μέσω φωσφορυλίωσης, τις πρωτεΐνες διαμεσολαβητές που φέρουν BRCT επικράτεια (BRCT-domain mediator proteins). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί και άλλες πρωτεΐνες μεσολαβητές εκτός αυτών που φέρουν BRCT επικράτεια. Ανεξάρτητα από το είδος τους όλες οι πρωτεΐνες μεσολαβητές εξυπηρετούν τον ίδιο σκοπό: την επιστράτευση του κεντρικού παράγοντα Chk1, ο οποίος ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση ATR (Εικόνα 6). Μετά από την ενεργοποίησή του ο παράγοντας Chk1 αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο που σχηματίστηκε στο σημείο της βλάβης και ασκεί κατασταλτική δράση επί του μιτωτικού συμπλόκου CDK Cdc2, όπου και τον μετατρέπει στην ανενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή του Y15. Επιπρόσθετα, ο

παράγοντας Chk1 φωσφορυλιώνει από κοινού τις κινάσες Wee1 και την φωσφατάση Cdc25, οι οποίες ρυθμίζουν την φωσφορυλίωση του Y15. Η φωσφορυλίωση προκαλεί σταθεροποίηση της πρωτεΐνης Wee1 και αποσταθεροποίηση της Cdc25. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί κάτι που αναφέρθηκε ανωτέρω. Η Cdk1 πρωτεΐνη, κεντρικός επαγωγέας της μίτωσης, αναστέλλεται από την κινάση Wee1 και ενεργοποιείται από την φωσφατάση Cdc25 (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009).

Ως εκ τούτου, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι ο παράγοντας Chk1 αναστέλλει έμμεσα τον κεντρικό επαγωγέα της μίτωσης Cdk1, μέσω ενεργοποίησης του καταστολέα του Wee1 και μέσω απενεργοποίησης του επαγωγέα του Cdc25. Συνοψίζοντας, επί παρουσίας βλάβης στο DNA, ο παράγοντας ανίχνευσης βλάβης στο DNA Chk1 προκαλεί διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στην μίτωση μέσω έμμεσης απενεργοποίησης του κεντρικού συμπλόκου της κυκλίνης-κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης Cdk1 (Εικόνα 6). Η επιδιόρθωση της βλάβης οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου της κινάσης ATR και αποσφορυλίωση (απενεργοποίηση) των μορίων του παράγοντα Chk1 από τις φωσφατάσες τύπου 1, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του Cdc25 και την καταστολή του Wee1 και ως εκ τούτου την ενεργοποίηση της Cdk1 και την συνέχιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στην μίτωση (den Elzen et al., 2004; den Elzen and O'Connell, 2004; Lu et al., 2005). Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν την σημαντικότητα του μονοπατιού του παράγοντα Chk1 για την ανίχνευση βλαβών στο DNA και κατά επέκταση για την εξασφάλιση της ομαλής λειτουργίας των κυττάρων, καθώς βλάβες στο μονοπάτι έχουν άμεσα συσχετιστεί με την εμφάνιση ποικίλων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Rundle et al., 2017).

Αν και το μονοπάτι του παράγοντα Chk1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA τόσο στους κατώτερους μονοκύτταρους, όσο και στους ανώτερους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το μονοπάτι που ελέγχεται από ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και τον μεταγραφικό παράγοντα p53 φαίνεται πως διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο για τους τελευταίους. Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν πως στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο μεταγραφικός παράγοντας p53 αποτελεί το πιο κρίσιμο στοιχείο για την ανίχνευση βλαβών στο DNA, ειδικά όσον αφορά την G1 φάση (Barnum and O'Connell, 2014; Giono and Manfredi, 2006) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Συνοπτικό μοντέλο περιγραφής των βασικών μονοπατιών ελέγχου βλαβών στο DNA στα ανθρώπινα κύτταρα. Κατά την G1 και S φάση, ο παράγοντας p53, μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα p21, αποτελεί τον κεντρικό παράγοντα ελέγχου των βλαβών στο DNA του κυττάρου και το κεντρικό μόριο που επάγει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) σε περιπτώσεις που ανιχνευθεί βλάβη στο DNA. Ο παράγοντας p53 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στις θέσεις σερίνης 15 και 20 από τα σύμπλοκα ATM/R και από τον παράγοντα Cds1, τα οποία επιστρατεύονται στα σημεία της βλάβης. Η φωσφορυλίωση του p53 έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα και την ταυτόχρονη προστασία του από τον παράγοντα Mdm2 ο οποίος και τον καταστέλλει. Ο ενεργοποιημένος, από τον p53, παράγοντας p21 προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 μέσω πρόσδεσης και αναστολής των συμπλόκων CyclinE/Cdk2 (E/K2) and CyclinA/Cdk2 (A/K2). Μάλιστα, η ανασταλτική δράση επί του συμπλόκου CyclinA/Cdk2 μπορεί να διατηρηθεί σε περιπτώσεις εμμένουσας βλάβης στο DNA και έως την όψιμη G2 φάση. Σε περίπτωση όπου η βλάβη στο DNA λάβει χώρα ή/και ανιχνευθεί κατά την G2 φάση, η ενεργοποίηση του παράγοντα p53 από τα σύμπλοκα ATM/R και από τον παράγοντα Cds1 δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί και έτσι η αναχίτηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου μέσω του p53 καθίσταται αδύνατη. Στην G2 φάση και σε περίπτωσης βλάβης στο DNA, τα σύμπλοκα ATM/R ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης, πιθανότατα στην θέση σερίνη 345, τον παράγοντα Chk1, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τον καταστολέα του κυτταρικού κύκλου Wee1 και καταστέλλει τον ενεργοποιητή του κυτταρικού κύκλου Cdc25. Ως αποτέλεσμα, τα σύμπλοκα CyclinA/Cdk2 (A/C2) και CyclinB/Cdk2 (B/C2), τα οποία όταν είναι ενεργά προάγουν την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου από την G2 στην M, απενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση στην θέση Y15, με τελικό αποτέλεσμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2.

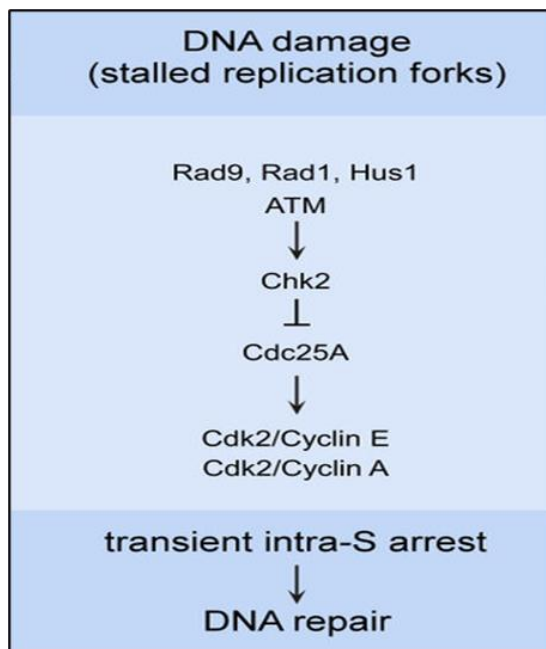
Λόγω της μοριακής του δομής, ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι δυνατόν να υποστεί πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με χαρακτηριστικό παράδειγμα την φωσφορυλίωση της σερίνης-15 στο αμινοτελικό του άκρο (N-terminal phosphorylation), η οποία και καταλύεται από το σύμπλοκο ATR, από το συγγενές με το ATR σύμπλοκο ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και από την καταλυτική υπομονάδα της εξαρτώμενης από το DNA κινάσης DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit). Παρόμοια με το ATR, τα σύμπλοκα ATM και DNA-PKcs

επιστράτευονται στα σημεία όπου υπάρχει δίκλωνη ρήξη της διπλής έλικας του DNA (double-strand DNA breaks, DSBs) μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων επιστράτευσης που προϋπάρχουν στα σημεία της βλάβης και πιο αναλυτικά το ATM μέσω του συμπλόκου MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) και το DNA-PKcs από το σύμπλοκο Ku70–Ku80. Η επιστράτευση όλων των ανωτέρω περιγραφόμενων συμπλόκων στα σημεία βλάβης του DNA έχει μία κοινή αποστολή, την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα p53, την σταθεροποίηση της δομής του και την προστασία του από την εξειδικευμένη E3 λιγάση της ουβικουιτίνης Mdm2, η οποία και καταστρέφει έμμεσα τα μόρια p53. Τα φωσφορυλιωμένα και πλέον προστατευόμενα μόρια του παράγοντα p53 σχηματίζουν στην συνέχεια τετραμερή και ως μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση μια πλειάδας γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου του αναστολέα της κυκλίνης-κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitor-CKI) p21. Μέσω του μηχανισμού αυτού, τα σύμπλοκα CDKs που ευνοούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S καταστέλλονται παρουσία βλάβης στο DNA και έτσι δίνεται ο απαραίτητος χρόνος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης στο να διορθώσουν την βλάβη πριν το κύτταρο εισέλθει στην φάση αντιγραφής του DNA (φάση S). Επιπρόσθετα, ο παράγοντας p53 φαίνεται πως διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο καθώς, επί παρουσίας βλάβης στο DNA, επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που επιτρέπουν την επ' αόριστον παραμονή του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση σε περίπτωση όπου η βλάβη του DNA εμμένει και δεν μπορεί να διορθωθεί (Carvajal et al., 2012; Carvajal and Manfredi, 2013; St Clair et al., 2004). Στους ανώτερους δε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αποτελεί κεντρικό παράγοντα του μηχανισμού αλλαγής της κυτταρικής μοίρας προς απόπτωση για τα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί εκτεταμένες βλάβες στο DNA, οι οποίες δεν δύναται να επιδιορθωθούν (Carvajal and Manfredi, 2013).

Όπως και στην περίπτωση του παράγοντα Chk1, έτσι και για τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53, έχουν υπάρξει πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές που συσχετίζουν τις βλάβες στο μονοπάτι του με την εμφάνιση ποικίλων ασθενειών και κυρίως τύπων καρκίνου στον άνθρωπο, κάτι που κάνει προφανή τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην εξασφάλιση της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού (Joerger and Fersht, 2016; Koniaras et al., 2001; Mantovani et al., 2019; Maugeri-Saccà et al., 2013; Stathis and Oza, 2010).

Σημεία ελέγχου της αντιγραφής του DNA

Η S φάση χαρακτηρίζεται ως η πιο ευαίσθητη φάση του κύκλου για την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA καθώς, από την μία οι βλάβες του DNA πρέπει άμεσα να επιδιορθωθούν, όπως στις G1 και G2 φάσεις, για να μην πραγματοποιηθεί αντιγραφή και μεταβίβαση της λανθασμένης γενετικής πληροφορίας στην επόμενη γενιά κυττάρων και από την άλλη οι βλάβες στο DNA παρεμποδίζουν αυτές καθαυτές την αντιγραφή του DNA διότι αποτελούν φυσικό εμπόδιο της DNA πολυμεράσης και του ενζυμικού συμπλόκου που πραγματοποιεί την αντιγραφή του DNA (replisome) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σημεία ελέγχου της αντιγραφής του DNA στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Τροποποιημένο από: "The Role of the Mitotic Spindle Checkpoint in Chemotherapy-Induced Apoptosis by Celia Vogel"

Είναι γνωστό πως στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών η αντιγραφή του DNA πυροδοτείται σε πολλαπλά σημεία, τα οποία είναι καθορισμένα και τα οποία καλούνται θέσεις έναρξης της αντιγραφής (origins of replication). Οι θέσεις αυτές είναι επιγενετικά καθορισμένες από ένα σύνολο πρωτεϊνών, των οποίων ο ρόλος είναι να διασφαλίζουν πως η αντιγραφή του DNA θα ξεκινήσει μόνο από αυτές τις θέσεις και πως θα πραγματοποιηθεί μόνο ένας κύκλος αντιγραφής του DNA ανά κυτταρικό κύκλο. Η έναρξη της αντιγραφής, στα ειδικά σημεία έναρξης, πυροδοτείται κυρίως από την φωσφορυλίωση δύο κεντρικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, των Cdt1 και Cdc6. Η φωσφορυλίωση των Cdt1 και Cdc6 καταλύεται από κοινού από τα σύμπλοκα CDKs και από την Dbf4-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (Dbf4-dependent protein kinase, DDK)

Cdc7. Η φωσφορυλίωση των Cdt1 και Cdc6 αποτελεί το γεγονός που πυροδοτεί την επιστράτευση του συμπλόκου αντιγραφής του DNA και ταυτόχρονα αποτελεί και σήμα για την αποδόμηση των Cdt1 και Cdc6 ώστε να μην καθίσταται δυνατή η έναρξη της αντιγραφής στο σημείο αυτό για δεύτερη φορά μέσα στον ίδιο κυτταρικό κύκλο.

Όταν η DNA πολυμεράση και οι συνοδές της πρωτεΐνες, που από κοινού απαρτίζουν το σύμπλοκο της αντιγραφής (replisome), συναντήσουν φυσικό εμπόδιο κατά την τροχιά τους επί του δίκλωνου DNA, τότε η αντιγραφή του DNA διακόπτεται στο σημείο αυτό. Ωστόσο, το σύμπλοκο της αντιγραφής παραμένει σταθερά προσκολλημένο πάνω στην αντιγραφόμενη χρωματίνη και με αυτό καθίσταται άμεσα δυνατή η συνέχιση της αντιγραφής του DNA όταν απομακρυνθεί το φυσικό εμπόδιο, δηλαδή η βλάβη στην δίκλωνη έλικα του DNA. Στις συνηθέστερες βλάβες του DNA συγκαταλέγονται η παρουσία τροποποιημένων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs), θέσεις στις οποίες το ζευγάρι των βάσεων δεν έχει πραγματοποιηθεί με βάση το μοντέλο της διπλής έλικας, μη απομακρυσμένα σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA ή θέσεις στις οποίες έχει λάβει χώρα ημιτελής επιδιόρθωση προηγούμενων βλαβών. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό πως ο ρόλος των σημείων ελέγχου της αντιγραφής του DNA στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (intra-S-phase checkpoint) είναι διττός και έγκειται πρώτον στην γρήγορη ανίχνευση των σημείων που έχει πραγματοποιηθεί κόλλημα στο μηχανισμό της αντιγραφής του DNA, λόγω μη φυσιολογικής τρισδιάστατης δομής στην διπλή έλικα του DNA και δεύτερον στην σταθεροποίηση (stabilization) του συμπλόκου της αντιγραφής (replisome) στο σημείο της βλάβης ώστε να είναι δυνατή η άμεση εκκίνηση της αντιγραφής αμέσως μόλις επιδιορθωθεί η βλάβη (Εικόνα 8).

Πολυάριθμες μελέτες στην ζύμη και σε κύτταρα του ανθρώπου δείχνουν πως πρωταγωνιστικό ρόλο στον μοριακό μηχανισμό δράσης των σημείων ελέγχου της αντιγραφής του DNA στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (intra-S-phase checkpoint) διαδραματίζουν οι κινάσες Cds1 και Chk2, στην ζύμη και στον άνθρωπο, αντίστοιχα. Παρά την κοινή τους ονομασία, η κινάση Chk2 δεν παρουσιάζει καμία βιοχημική ή λειτουργική ομολογία με την κινάση Chk1, όπου ο ρόλος της δεύτερης επί της ανίχνευσης και επιδιόρθωσης βλαβών κυρίως στην G2 φάση παρουσιάστηκε παραπάνω. Στην περίπτωση ύπαρξης βλάβης στην δομή του δίκλωνου DNA, το σύμπλοκο αντιγραφής του DNA (replisome) συναντά φυσικό εμπόδιο και η αντιγραφή διακόπτεται. Με την διακοπή

της αντιγραφής η πρωτεΐνη Mrc1 (mediator of the replication checkpoint), η οποία αποτελεί στοιχείο του συμπλόκου της αντιγραφής του DNA, φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο ATR, το οποίο έχει ήδη επιστρατευτεί στο σημείο της βλάβης. Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Mrc1 αποτελεί σημείο πρόσδεσης για τις βασικές κινάσες-ρυθμιστές των σημείων ελέγχου της αντιγραφής του DNA στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, Cds1/Chk2. Μόλις οι κινάσες Cds1/Chk2 προσδεθούν επί της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Mrc1, δηλαδή επί του ακινητοποιημένου συμπλόκου της αντιγραφής του DNA, υφίσταται ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης από το σύμπλοκο ATR και στην συνέχεια ενεργοποιούνται πλήρως μέσω αυτό-φωσφορυλίωσης. Οι ενεργοποιημένες κινάσες Cds1/Chk2 σταθεροποιούν με την σειρά τους το σύμπλοκο αντιγραφής του DNA μέσω φωσφορυλίωσης πολυάριθμων υπομονάδων του συμπλόκου και πιο ειδικά μέσω φωσφορυλίωσης της ελικάσης MCM. Επιπρόσθετα, οι ενεργοποιημένες κινάσες Cds1/Chk2 καταστέλλουν μέσω φωσφορυλίωσης την δράση του παράγοντα Cdc25A. Ο παράγοντας Cdc25A αποτελεί τον κύριο επαγωγέα των συμπλόκων Cdk2/Cyclin E και Cdk2/Cyclin A, τα οποία αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της μετάβασης από την S φάση στην φάση G2. Καθίσταται λοιπόν εύκολα αντιληπτό πως στην περίπτωση βλάβης στο DNA κατά την S φάση, οι ενεργοποιημένες κινάσες Cds1/Chk2 σταθεροποιούν το σύμπλοκο της αντιγραφής του DNA, έως ότου αποκαταθεί η βλάβη με σκοπό να συνεχιστεί άμεσα η αντιγραφή αμέσως μετά την επιδιόρθωση και καταστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την S στην G2 φάση με σκοπό να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη (Εικόνα 8).

Σημείο ελέγχου της μετάβασης από την S στην M φάση

Όταν ανιχνευθεί κάποια βλάβη στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου και πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, μέσω του μηχανισμού που περιεγράφηκε προηγουμένως, το σύμπλοκο της αντιγραφής (replisome) σταθεροποιείται στο σημείο της βλάβης, έως ότου αυτή αποκατασταθεί και στην συνέχεια η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται απρόσκοπτα. Εναλλακτικά, έχουν αναπτυχθεί μοριακοί κυτταρικοί μηχανισμοί αποκατάστασης βλαβών στο DNA οι οποίοι μπορούν να δράσουν στο επίπεδο μετά την αντιγραφή του DNA (post-replication repair pathways). Η αποκατάσταση βλαβών στο επίπεδο μετά την αντιγραφή πραγματοποιείται συνήθως με επιστράτευση των μηχανισμών του ομόλογου ή μη-ομόλογου ανασυνδυασμού του DNA (Lee and Myung, 2008). Σε κάθε περίπτωση, βασικός ρόλος των διαθέσιμων σημείων ελέγχου, που

επιτηρούν την μετάβαση από την S στην M φάση, είναι να εξασφαλίσουν πως δεν θα εκκινήσει η φάση της μίτωσης έως ότου να έχει πραγματοποιηθεί, τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά, πιστή αντιγραφή του DNA. Ο ρόλος αυτός διαγράφεται ξεκάθαρα εάν λάβουμε υπόψιν ότι οι βλάβες των σημείων ελέγχου που επιτηρούν την μετάβαση από την S στην M φάση οδηγούν στην εμφάνιση ανευπλοειδίας ή/και πολυπλοειδίας στα κύτταρα-απογόνους. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως η είσοδος στην φάση της μίτωσης παρεμποδίζεται όταν ο παράγοντας Cdc2 φωσφορυλιώνεται στην θέση Y15. Οι παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν την φωσφορυλίωση του παράγοντα Cdc2 στην θέση Y15 αποτελούν και τα βασικά στοιχεία του μονοπατιού των σημείων ελέγχου της μετάβασης από την S στην M φάση (al-Khodairy et al., 1994; Enoch et al., 1992; Lindsay et al., 1998; Rhind et al., 1997).

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση όπου εμφανισθεί κάποια βλάβη στην δομή του DNA ενεργοποιείται άμεσα το μονοπάτι του παράγοντα Chk1, όπως παρουσιάζεται παραπάνω. Ωστόσο, εάν η βλάβη δεν προκαλεί αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή του DNA, όπως συμβαίνει όταν γίνεται ατελής απομάκρυνση dNTPs, το μονοπάτι του Chk1 δεν ενεργοποιείται και έτσι το κύτταρο αδυνατεί να εισέλθει στην φάση της μίτωσης (Lindsay et al., 1998). Μελέτες υποστηρίζουν πως και ο παράγοντας Cds1 αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της προόδου του κυτταρικού κύκλου από την S στην M φάση (Furnari et al., 1999; Zeng et al., 1998). Ωστόσο, στα κύτταρα στα οποία απουσιάζει ο παράγοντας Cds1 παρατηρείται αποσταθεροποίηση του συμπλόκου της αντιγραφής στα σημεία της βλάβης (fork collapse), φαινόμενο το οποίο αναγνωρίζεται ως βλάβη στο DNA και το οποίο ενεργοποιεί το μονοπάτι του Chk1.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν πως ο έλεγχος για την ομαλή μετάβαση από την S στην M φάση λαμβάνει χώρα από τα πρώιμα στάδια του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή από την πρώιμη G1 φάση. Πιο αναλυτικά και ειδικά όσον αφορά τα κύτταρα των θηλαστικών, φαίνεται πως αυτά διαθέτουν μηχανισμούς ανίχνευσης βλαβών στα στοιχεία που επιτηρούν την μετάβαση από την S στην M φάση. Φαίνεται δηλαδή πως στην G1 φάση ενεργοποιείται ένας μοριακός μηχανισμός ο οποίος ελέγχει την επάρκεια όλων εκείνων των μορίων που εμπλέκονται στην επιτήρηση της ομαλής μετάβασης από την S στην M φάση. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται σε πειράματα στα οποία μέσω γενετικής μηχανικής πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση σημαντικών μορίων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως των κινασών Wee1 και Mik1 ή των πρωτεϊνών που εξασφαλίζουν πως θα πραγματοποιηθεί μόνο ένας κύκλος αντιγραφής του DNA από κάθε

θέση αντιγραφής του DNA σε έναν κυτταρικό κύκλο. Τα πειράματα έδειξαν πως τα μεταλλαγμένα αυτά κύτταρα εισέρχονταν σε μία “θανατογόνο” μίτωση απευθείας από την G1 φάση, χωρίς την διαμεσολάβηση των φάσεων S και G2, με αποτέλεσμα τον εξαιρετικά υψηλό κατακερματισμό της γενετικής πληροφορίας και την απόπτωση. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο φαινόμενο του “μιτωτικού” θανάτου παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι, ωστόσο γίνεται ξεκάθαρο πως όταν ένα κύτταρο δεν διαθέτει όλα εκείνα τα απαραίτητα συστατικά, που θα εξασφαλίσουν την φυσιολογική διαίωνιση της γενετικής πληροφορίας, τότε αυτό οδηγείται σε αυτόματο κυτταρικό θάνατο (Barnum and O’Connell, 2014; Lundgren et al., 1991).

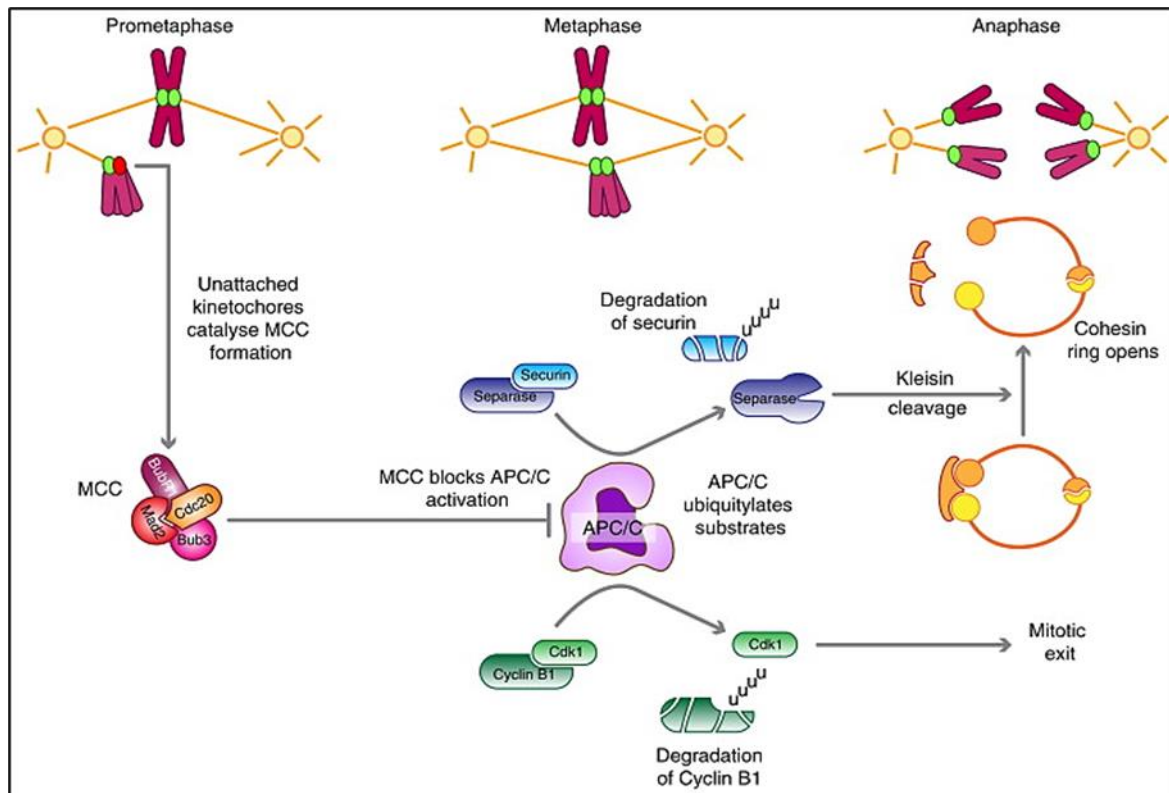
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, φαίνεται πως υπάρχει μία περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών που αναγνωρίζουν και επιδιορθώνουν βλάβες στο DNA κατά την S και G2 φάση. Τα μονοπάτια αυτά φαίνεται πως από κοινού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο να διασφαλιστεί πως το κύτταρο θα εισέλθει στην M φάση αν και μόνον αν η γενετική πληροφορία έχει διπλασιαστεί ακέραια, τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά. Η δυναμική αυτή αλληλεπίδραση είναι αντικείμενο έρευνας της μοριακής βιολογίας και της γενετικής, καθώς αποτελεί την βάση πρόκλησης ποικίλων ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων.

Σημείο ελέγχου της ακεραιότητας της Μιτωτικής Ατράκτου

Ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων κατά την ανάφαση της μίτωσης πραγματοποιείται μέσω ελκτικών μηχανικών δυνάμεων από την μιτωτική άτρακτο. Η μιτωτική άτρακτος αποτελείται από μικροσωληνίσκους και από μία πλειάδα κινούμενων πρωτεϊνών (motor proteins). Οι μικροσωληνίσκοι εκπορεύονται από τα δύο κεντροσωμάτια, τα οποία συνιστούν τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων. Τα κεντροσωμάτια οργάνωνται από δομές μικροσωληνίσκων που ονομάζονται κεντριόλια και βρίσκονται ακροβολισμένα στους δύο πόλους του κυττάρου. Οι μικροσωληνίσκοι προσδένονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, οι οποίοι συνιστούν πρωτεϊνικές δομές που βρίσκονται στο κεντρομερές. Τόσο η διάταξη των χρωμοσωμάτων επί του άξονα της μεταφασικής πλάκας (metaphase plate), όσο και η πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων, πρέπει να πραγματοποιηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε μία εκ των αδελφών χρωματίδων να κατευθυνθεί προς τον έναν εκ των δύο πόλων της μιτωτικής ατράκτου (Lara-Gonzalez et al., 2012; McLean et al., 2011; Wittmann et al., 2001).

Όταν όλοι οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων έχουν κατάλληλα προσδεθεί με μικροσωληνίσκους, η ανάφαση εξελίσσεται με τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού στον οποίο πρωταγωνιστικό ρόλο διαδραματίζει ένα μεγαλομοριακό μόριο E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης το οποίο είναι γνωστό ως σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης ή κυκλώσωμα (anaphase-promoting complex or cyclosome, APC/C). Το σύμπλοκο APC/C στοχεύει πολλαπλές πρωτεΐνες με σκοπό την εκκίνηση του διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων. Τον σημαντικότερο στόχο του συμπλόκου APC/C αποτελούν οι μιτωτικές κυκλίνες (mitotic CDKs), οι οποίες υπό την επίδραση του APC/C απολύουν την ιδιότητα κινάσης που διαθέτουν και οδηγούνται σε αποδόμηση. Η αποδόμηση των μιτωτικών CDKs έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση και ενεργοποίηση μιας πλειάδας ενζύμων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και το ένζυμο σεπεράση (separase), όπου το τελευταίο καταλύει την αντίδραση διάσπασης των συμπλόκων κοχυσίνης (cohesin), τα οποία και συγκρατούν ενωμένες τις αδελφές χρωματίδες στο κεντρομερές των χρωμοσωμάτων. Η δραστηριότητα του συμπλόκου APC ελέγχεται από δύο βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη Cdc20 και την πρωτεΐνη Cdh1. Η πρώτη εξ αυτών διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο κατά τις φάσεις της μετάφασης και της ανάφασης. Η δεύτερη εξ αυτών φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σημείο δράσης της σεπεράσης. Μόλις πραγματοποιηθεί η διάσπαση των συμπλόκων κοχυσίνης οι αδελφές χρωματίδες απελευθερώνονται η μία από την άλλη και μέσω του μηχανισμού κίνησης της μιτωτικής ατράκτου διαχωρίζονται, κινούμενες προς τους δύο πόλους του κυττάρου, όπου και θα σχηματίσουν τους πυρήνες των δύο νεοσχηματιζόμενων αδελφών κυττάρων (Lara-Gonzalez et al., 2012; McLean et al., 2011; Wittmann et al., 2001) (Εικόνα 9).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω υπογραμμίζεται ο ρόλος του μηχανισμού ελέγχου της ακεραιότητας της μιτωτικής ατράκτου. Ο μηχανισμός εξασφαλίζει πως οι παράγοντες Cdc20 και Cdh1 θα ενεργοποιήσουν το σύμπλοκο APC/C, το οποίο συνιστά τον κεντρικό προαγωγέα της ανάφασης και του διαχωρισμού των χρωματίδων, αν και μόνον αν όλοι οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων έχουν καταληφθεί από μικροσωληνίσκους που εκπορεύονται από αντιδιαμετρικούς πόλους της ατράκτου. Στην περίπτωση όπου υπάρχουν ελεύθεροι κινητοχώροι ή κινητοχώροι στους οποίους έχουν προσδεθεί μικροσωληνίσκοι που εκπορεύονται από τον ίδιο πόλο (μεροτελική πρόσδεση), ενεργοποιείται το σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C.



Εικόνα 9. Ο μοριακός μηχανισμός του σημείου ελέγχου της ακεραιότητας της μιτωτικής ατράκτου. Τροποποιημένο από Lara-Gonzalez et al., 2012.

Πιο αναλυτικά, όταν η πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων δεν έχει πραγματοποιηθεί με βάση το σωστό πρότυπο, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη ελέγχου της ακεραιότητας της μιτωτικής ατράκτου Mad2 (Mitotic Arrest Deficient-2), η οποία καταστέλλει τον ενεργοποιητικό παράγοντα Cdc20 στο σημείο που έχει εντοπιστεί η βλάβη. Επιπρόσθετα, η Mad2 αποτρέπει τον σχηματισμό του συμπλόκου APC/C στα σημεία της βλάβης. Σχηματίζει δε σύμπλοκα πρωτεϊνών ελέγχου της ακεραιότητας της μιτωτικής ατράκτου στα σημεία της βλάβης, εξασφαλίζοντας πως θα πραγματοποιηθεί επιδιόρθωση της βλάβης. Ο ενεργοποιητικός παράγοντας Cdc20 ελέγχεται και από άλλες πρωτεΐνες ελέγχου, εκτός της Mad2, στις οποίες συγκαταλέγεται η κινάση Bub1R (budding uninhibited by benomyl). Συννορίζοντας, παρουσία βλάβης στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου ενεργοποιούνται οι παράγοντες ελέγχου της ακεραιότητας της μιτωτικής ατράκτου Mad2 και Bub1R, αποτρέποντας την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C από την πρωτεΐνη Cdc20, με τελικό αποτέλεσμα την αναχαίτιση της προόδου της ανάφασης και άρα του επικείμενου διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων, έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη (Barnum and O'Connell, 2014; Lara-Gonzalez et al., 2012) (Εικόνα 9).

1.1.3 Κυτταρική Διαίρεση: Μίτωση και Μείωση

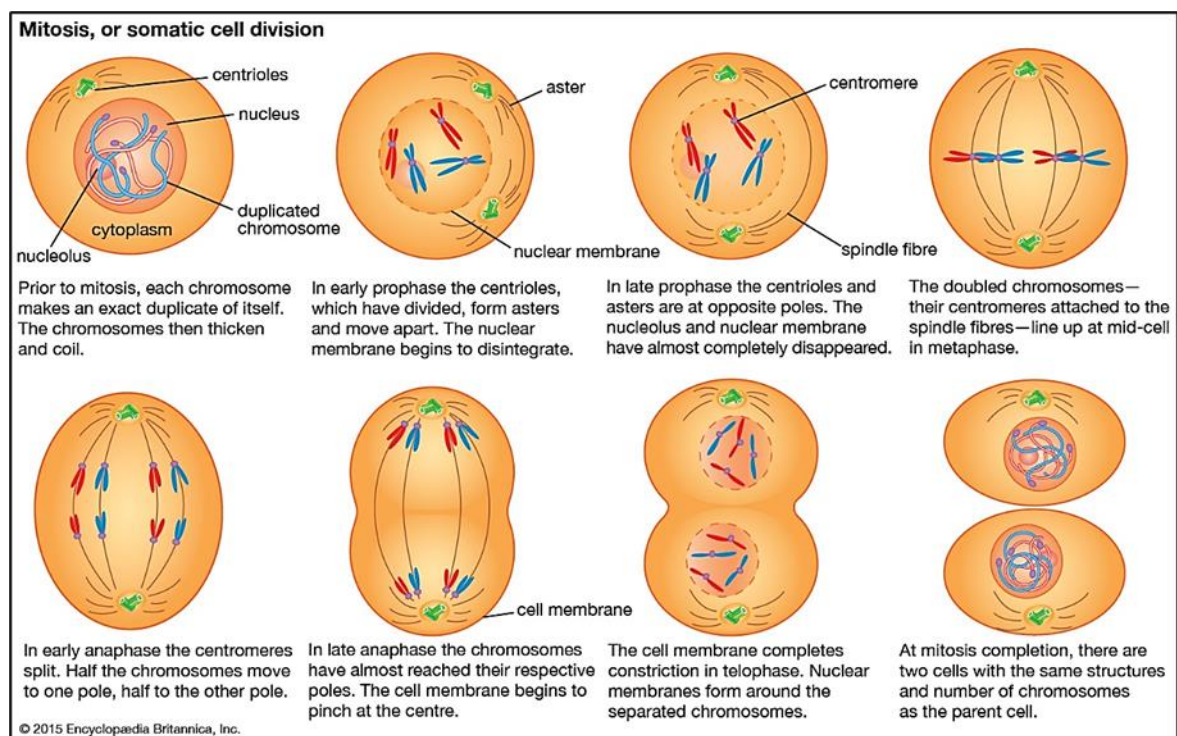
Οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χαρακτηρίζονται ως ένα οργανωμένο σύστημα ιστών, οργάνων και συστημάτων οργάνων, των οποίων ο δομικός λίθος είναι τα σωματικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τους μονοκύτταρους οργανισμούς, οι οποίοι ως επί των πλείστων αναπαράγονται μονογονικά, η αναπαραγωγή των πολυκύτταρων οργανισμών, ειδικά των ανώτερων ευκαρυωτών και ειδικότερα των θηλαστικών βασίζεται στην αμφιγονία, δηλαδή στην σύντηξη δύο εξειδικευμένων κυττάρων (γαμετών) προερχόμενων από άτομα διαφορετικού φύλου, μέσω της διαδικασίας της γονιμοποίησης. Τα σωματικά κύτταρα και οι γαμέτες των ανώτερων, αμφιγονικά αναπαραγόμενων ευκαρυωτικών οργανισμών παρουσιάζουν μεταξύ τους μία βασική διαφορά. Τα μεν πρώτα σωματικά κύτταρα είναι διπλοειδή ($2n$), δηλαδή φέρουν δύο αντίγραφα του γονιδιώματος. Τα δε δεύτερα, δηλαδή οι γαμέτες, είναι απλοειδή, δηλαδή φέρουν μόνο ένα αντίγραφο του γονιδιώματος (n). Το αίτιο της βασικής αυτής διαφοράς γίνεται εύκολα κατανοητό εάν αναλογιστεί κανείς πως οι γαμέτες, με την διαδικασία της γονιμοποίησης, συνεισφέρουν από κοινού ένα αντίγραφο του γονιδιώματος (n), ώστε να σχηματιστεί το διπλοειδές ζυγωτό ($2n$), το οποίο είναι το πρώτο κύτταρο του νέου οργανισμού. Σε περίπτωση όπου οι γαμέτες ήταν διπλοειδείς γίνεται εύκολα αντιληπτό πως σε κάθε νέα γενιά θα υπήρχε μία εκθετική αύξηση των αντιγράφων της γενετικής πληροφορίας, οδηγώντας σε φαινόμενα πολυπλοειδίας. Στον άνθρωπο η κάθε απλοειδής σειρά φέρει 23 χρωμοσώματα ($n=23$), δηλαδή τα διπλοειδή σωματικά κύτταρα πριν την φάση S φέρουν 46 χρωμοσώματα ($2n=46$).

Συγκεκριμένα για τον άνθρωπο, τα σωματικά κύτταρα τα οποία συνιστούν τους δομικούς λίθους των ιστών και των οργάνων, διαιρούνται και πολλαπλασιάζονται με μίτωση, δηλαδή από κάθε διπλοειδές σωματικό κύτταρο ($2n=46$) προκύπτουν δύο θυγατρικά (daughter) διπλοειδή κύτταρα ($2n=46$). Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, ο πολλαπλασιασμός των σωματικών κυττάρων διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την ανάπτυξη του οργανισμού, καθώς και στην αναγέννηση και στην ανάπλαση των ιστών και των οργάνων. Ο πολλαπλασιασμός των σωματικών κυττάρων δεν διαδραματίζει κανένα ρόλο στην αναπαραγωγή. Πολλές δε κατηγορίες σωματικών κυττάρων, μετά την τελική τους διαφοροποίηση, σταματούν να διαιρούνται και παραμένουν μέχρι τον κυτταρικό θάνατο στην φάση G0. Σε αντίθεση με τα σωματικά κύτταρα, οι απλοειδείς γαμέτες, είναι εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία παράγονται μέσω

μίας ιδιαίτερης κατηγορίας κυτταρικής διαίρεσης από προγονικά διπλοειδή κύτταρα των αναπαραγωγικών οργάνων. Πιο αναλυτικά, τα ωάρια τα οποία συνιστούν τους γαμέτες των θηλυκών ατόμων παράγονται στις ωοθήκες και τα σπερματοζώαρια τα οποία συνιστούν τους αρσενικούς γαμέτες παράγονται στους όρχεις. Και στις δύο περιπτώσεις, διπλοειδή κύτταρα της προγονικής αναπαραγωγικής σειράς (ωογόνια και σπερματογόνια, αντίστοιχα) υφίσταται κυτταρική διαίρεση, όχι με μίτωση, αλλά με μείωση. Μέσω της μείωσης, από ένα διπλοειδές προγονικό αναπαραγωγικό κύτταρο ($2n=46$) προκύπτουν τέσσερις απλοειδής γαμέτες ($n=23$).

Μίτωση

Όπως σημειώθηκε, η μίτωση συνιστά μια ενιαία κυτταρική διεργασία, η οποία όμως για λόγους κατανόησης, διακρίνεται σε πέντε επιμέρους κυτταρολογικές φάσεις: την πρόφαση (prophase), την προμετάφαση (prometaphase), την ανάφαση (anaphase), την τελόφαση (telophase) και την κυτταροκίνηση (cytokinesis), η οποία αφορά το διαχωρισμό του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 10) (Blow and Tanaka, 2005; Zhou et al., 2002).



Εικόνα 10. Τα στάδια της μίτωσης. Τροποιημένο από <https://www.britannica.com>.

Πρόφαση

Στην αρχή της πρόφασης οι χρωματίδες είναι πολύ επιμηκυμένες, καθώς η χρωματίνη είναι ακόμα οργανωμένη με την μορφή ινιδίων χρωματίνης. Της πρόφασης και γενικότερα της μίτωσης, προηγείται η αντιγραφή του DNA στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Κάθε διπλοειδές κύτταρο του ανθρώπου στην έναρξη της ζωής του (G1 φάση) φέρει δύο αντίγραφα της απλοειδούς σειράς ($2n=46$), δηλαδή δύο αντίγραφα της γενετικής πληροφορίας υπό τη μορφή δίκλωνου γραμμικού DNA. Συνολικά, ένα αντίγραφο της γενετικής πληροφορίας αποτελείται από 23 γραμμικά “κομμάτια” DNA, άρα κάθε διπλοειδές κύτταρο φέρει 46 γραμμικά “κομμάτια” DNA, ανά δύο όμοια. Στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, καθένα από αυτά τα 46 κομμάτια υφίσταται αντιγραφή. Με την ολοκλήρωση της αντιγραφής κάθε διπλοειδές κύτταρο φέρει 92 γραμμικά “κομμάτια” DNA. Τα αντίγραφα παραμένουν ενωμένα μεταξύ τους και συνιστούν της αδελφές χρωματίδες. Έτσι, κάθε διπλοειδές κύτταρο εισέρχεται στη μίτωση με 46 ζεύγη αδελφών χρωματίδων. Κάθε ζεύγος θα σχηματίσει ένα χρωμόσωμα και έτσι δημιουργούνται τα 46 χρωμοσώματα που απαντώνται στον καρυότυπο του ανθρώπου. Συνολικά, σχηματίζονται 23 ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων (“iGenetics,” n.d.).

Κατά την πρόφαση, δεν παρατηρούνται σημαντικά φαινόμενα όσον αφορά την πύκνωση της χρωματίνης, αλλά συντελείται η δόμηση της μιτωτικής ατράκτου. Κάθε διπλοειδές κύτταρο στην G1 φάση φέρει ένα κεντροσωμάτιο, το οποίο αποτελείται από δύο κεντριόλια. Ο βασικός δομικός λίθος των κεντριολίων είναι τα ινίδια των μικροσωληνίσκων, τα οποία και αποτελούν πολυμερή της πρωτεΐνης τουμπουλίνη. Κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, εκτός από την αντιγραφή του DNA, συντελείται ένα ακόμα μοναδικό φαινόμενο, αυτό του διπλασιασμού των κεντροσωματίων. Κατά την πρόφαση, τα κεντροσωμάτια βρίσκονται έξω από τον πυρηνικό φάκελο και διατάσσονται στο ισημερινό πεδίο του κυττάρου. Κάθε κεντροσωμάτιο αποτελεί και ένα κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι αρχίζουν να σχηματίζονται και να διατάσσονται ακτινωτά γύρω από το κεντροσωμάτιο σχηματίζοντας μία δομή που μοιάζει με αστέρα. Στην αρχή της πρόφασης τα κεντροσωμάτια βρίσκονται πλησίον του πυρήνα, σταδιακά όμως απομακρύνονται ακολουθώντας μία περιφερειακή πορεία, με αντίθετες κατευθύνσεις το ένα από το άλλο, γύρω από τον πυρήνα. Στο τέλος της πρόφασης, τα κεντροσωμάτια έχουν διαταχθεί έξω από τον πυρήνα και αντιδιαμετρικά το ένα από το άλλο, στους δύο πόλους του κυττάρου (“iGenetics,” n.d.).

Στο τέλος της πρόφασης, χρονικό σημείο που καλείται προμετάφαση (prometaphase), λαμβάνουν χώρα σημαντικά φαινόμενα που αφορούν την οργάνωση και την δομή του πυρήνα. Αρχικά, οι πυρηνίσκοι παύουν να είναι ορατοί καθώς αποδιοργανώνονται και η πυρηνική μεμβράνη (πυρηνικός φάκελος) διαρρηγνύεται. Λόγω της διάρρηξης της πυρηνικής μεμβράνης, μικροσωληνίσκοι που εκπορεύονται από τους δύο πόλους της μιτωτικής ατράκτου, εισέρχονται στο εσωτερικό του πυρήνα και προσδένονται επί των κινητοχώρων σε κάθε αδελφή χρωματίδα. Ταυτόχρονα, η χρωματίνη αρχίζει να γίνεται πιο πυκνή και έτσι σχηματίζονται τα χρωμοσώματα (“iGenetics,” n.d.).

Μετάφαση

Χρονικά η έναρξη της μετάφασης ορίζεται ως η στιγμή που έχει πραγματοποιηθεί ολοκληρωτική καταστροφή της πυρηνικής μεμβράνης και πλήρης αποδιοργάνωση του πυρήνα του πατρικού κυττάρου. Η πυκνωση της χρωματίνης κατά την μετάφαση είναι εξαιρετικά έντονη και πλέον τα ινίδια της χρωματίνης έχουν λάβει την μορφή χρωμοσώματος. Κατά την μετάφαση, οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου, οι οποίοι από την πρόφαση είχαν προσδεθεί στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων, κατευθύνουν τα χρωμοσώματα έτσι ώστε τα κεντρομερή τους να στοιχίζονται σε ένα κάθετο επίπεδο που ισαπέχει από τους δύο πόλους της ατράκτου, με τον επιμήκη άξονα των χρωμοσωμάτων να είναι κάθετος του άξονα της ατράκτου και κάθετος του ισημερινού πεδίου. Ο άξονας παράταξης των χρωμοσωμάτων ονομάζεται μεταφασική πλάκα (metaphase plate) (“iGenetics,” n.d.).

Ανάφαση

Η εκκίνηση της ανάφασης σηματοδοτείται όταν οι μοριακοί μηχανισμοί του σημείου ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου επιτρέψουν την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C. Η ενεργοποίηση του APC/C προϋποθέτει την σωστή παράταξη όλων των χρωμοσωμάτων επί της μεταφασικής πλάκας, την πρόσδεση μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους όλων των αδελφών χρωματίδων και την διαπίστευση πως στον κινητοχώρο της κάθε αδελφής χρωματίδας έχουν προσδεθεί μικροσωληνίσκοι που εκπορεύονται από έναν και μόνο πόλο της μιτωτικής ατράκτου. Η ενεργοποίηση του APC/C έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την διάσπαση του συμπλόκου της κοχεσίνης που συγκρατεί ενωμένες τις αδελφές χρωματίδες στο κεντρομερίδιο των χρωμοσωμάτων και τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, φαινόμενο που μηχανικά οδηγεί στον αποχωρισμό των αδελφών

χρωματίδων. Οι αδελφές χρωματίδες μηχανικά έλκονται προς τα κεντροσωμάτια που βρίσκονται ακροβολισμένα στους δύο αντιδιαμετρικούς πόλους της ατράκτου. Συνήθως, στα τελικά στάδια της ανάφασης ξεκινά και η κυτταροκίνηση, δηλαδή η διαδικασία καταμερισμού του κυτταροπλάσματος (“iGenetics,” n.d.).

Τελόφαση

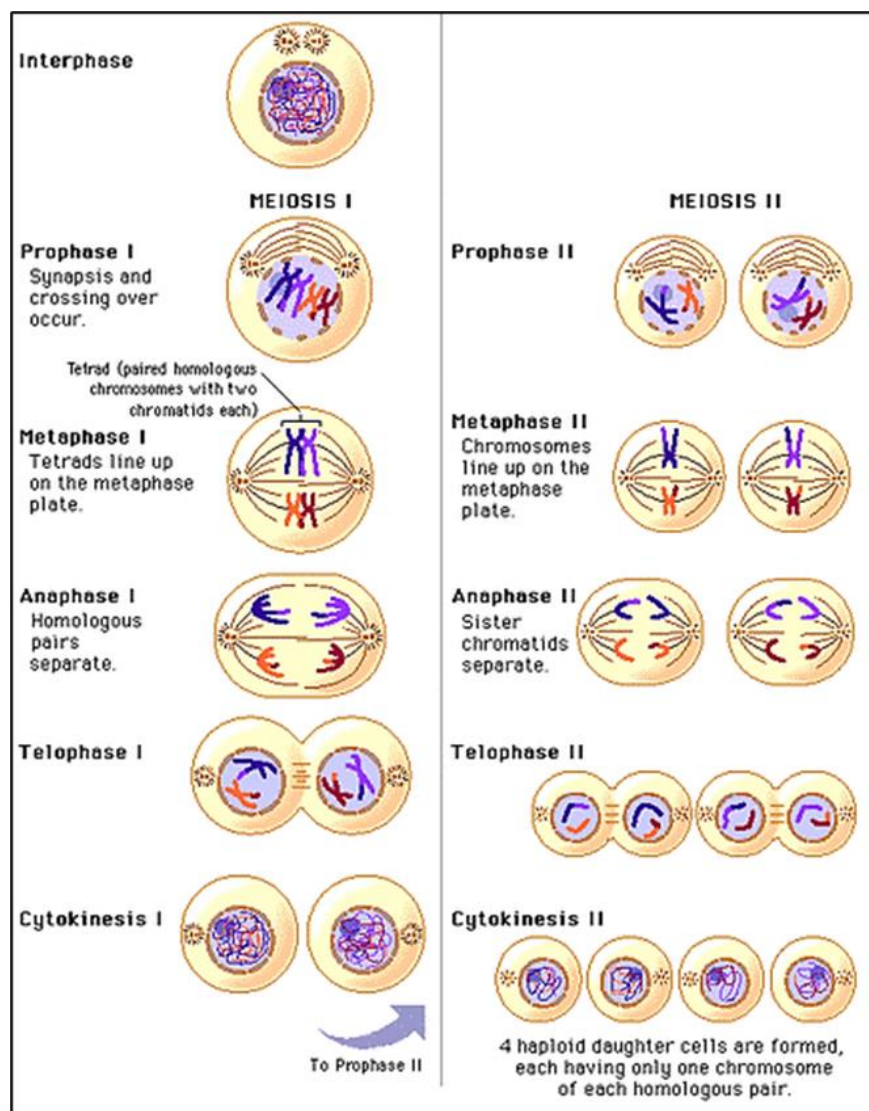
Η έναρξη της τελόφασης σηματοδοτείται από τον πλήρη διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και την ολοκλήρωση της μετακίνησής τους στους δύο πόλους του κυττάρου. Στην φάση αυτή, από κάθε χρωμόσωμα, η μία χρωματίδα βρίσκεται στον έναν πόλο του κυττάρου και η αδελφή της στον αντιδιαμετρικό πόλο. Στην τελόφαση αρχίζει η αποσυσπείρωση της χρωματίνης, η οποία σταδιακά αποκτά δομή ινιδίων χρωματίνης. Επίσης, σταδιακά αρχίζει η εκ νέου διοργάνωση δύο πυρηνικών φακέλων, στους δύο πόλους του κυττάρου, οι οποίοι και εγκλείουν τις διαχωρισμένες πλέον αδελφές χρωματίδες. Σε κάθε νέο πυρηνικό φάκελο εμπεριέχονται 46 γραμμικά μόρια DNA, ανά δύο όμοια (μία αδελφή χρωματίδα από κάθε ζεύγος ομόλογων χρωμοσωμάτων), δηλαδή δύο αντίγραφα της απλοειδούς γενετικής σειράς. Σε σύντομο χρονικό διάστημα από τον σχηματισμό των πυρηνικών φακέλων αρχίζει και ο σχηματισμός των προπυρήνων. Παράλληλα, τα κεντροσωμάτια πλησιάζουν τους νεοσχηματιζόμενους πυρήνες και οι μικροσωληνίσκοι αποπολυμερίζονται πλήρως, με αποτέλεσμα την διάλυση της μιτωτικής ατράκτου. Με αυτόν τον τρόπο, τα δύο νέα κύτταρα που θα προκύψουν, μετά την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης, θα αποτελούνται από έναν διπλοειδή πυρήνα και ένα κεντροσωμάτιο. Πρακτικά, με την ολοκλήρωση της ανάφασης η πυρηνική διαίρεση έχει ολοκληρωθεί (“iGenetics,” n.d.).

Κυτταροκίνηση

Κυτταροκίνηση καλείται η τελική φάση της μίτωσης και ουσιαστικά αποτελεί την φάση διαχωρισμού του κυτταροπλάσματος και όλων των υποκυτταρικών δομών και οργανιδίων, με σκοπό τα δύο νέα θυγατρικά κύτταρα να περιέχουν ισότιμο αριθμό των απαραίτητων εκείνων στοιχείων που απαιτούνται για την διατήρηση της έμβιας ύλης. Στα ζωικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων του ανθρώπου, η κυτταροκίνηση πραγματοποιείται μέσω μίας περίσφιξης που δημιουργείται από τον κυτταροσκελετό, στο μέσο του κυττάρου. Η περίσφιξη αυτή συνεχίζεται μέχρι να παραχθούν δύο πανομοιότυπου μεγέθους θυγατρικά κύτταρα (“iGenetics,” n.d.).

Μείωση

Όπως τονίστηκε και παραπάνω, ο όρος μείωση αναφέρεται σε μία ιδιαίτερη κατηγορία κυτταρικής διαίρεσης, μέσω της οποίας από ένα διπλοειδές προγονικό γαμετικό κύτταρο προκύπτουν απλοειδείς γαμέτες, ο σχηματισμός των οποίων λαμβάνει χώρα στα αναπαραγωγικά όργανα (ωοθήκες και όρχεις), μέσω μίας βιολογικής διεργασίας που καλείται γαμετογένεση. Αν και στον άνθρωπο η γαμετογένεση μεταξύ ωαρίων (θηλυκών γαμετών) και σπερματοζωαρίων (αρσενικών γαμετών) παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μείωση πραγματοποιείται με ένα συγκεκριμένο μοτίβο και συντελείται υπό το πλαίσιο κοινών μηχανισμών που στόχο έχουν τη δημιουργία απλοειδών σπερματοζωαρίων και ωαρίων (Εικόνα 11) (“iGenetics,” n.d.).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της μείωσης που λαμβάνει χώρα κατά την γαμετογένεση. Τροποημένο από <https://socratic.org>.

Η μείωση ουσιαστικά περιλαμβάνει δύο διαδοχικές διαιρέσεις (1^η μειωτική και 2^η μειωτική διαίρεση) ενός διπλοειδούς πυρήνα (πυρήνας προγονικού γαμετικού κυττάρου), οι οποίες ακολουθούν μετά από έναν κύκλο αντιγραφής του DNA. Πιο αναλυτικά και πιο ειδικά για τον άνθρωπο, ο πυρήνας του προγονικού γαμετικού κυττάρου είναι διπλοειδής ($2n=46$), δηλαδή, όπως συμβαίνει και στα σωματικά κύτταρα, φέρει δύο αντίγραφα του απλοειδούς γονιδιώματος ($n=23$) υπό την μορφή ινιδίων δίκλωνου γραμμικού DNA (2×23). Το ένα αντίγραφο είναι μητρικής προέλευσης και το άλλο πατρικής. Ανάλογα με την φυσιολογία του θήλεος και του άρρενος γενετικού συστήματος και σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή του κύκλου ζωής του οργανισμού, το προγονικό γαμετικό κύτταρο εισέρχεται από την G1 στην S φάση, όπου και πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού, όπως συμβαίνει και στα διπλοειδή σωματικά κύτταρα. Μετά την ολοκλήρωση της S φάσης, το προγονικό γαμετικό κύτταρο φέρει στον πυρήνα του 92 γραμμικά “κομμάτια” DNA ($4n=92$), δηλαδή τα 46 που έφερε αρχικά και 46 αντίγραφα των αρχικών μορίων. Τα αντίγραφα παραμένουν ενωμένα μεταξύ τους στο κεντρομερίδιο και συνιστούν της αδελφές χρωματίδες των μελλοντικών χρωμοσωμάτων. Έτσι, κάθε διπλοειδές προγονικό γαμετικό κύτταρο εισέρχεται στη μείωση με 46 ζεύγη αδελφών χρωματίδων. Κάθε ζεύγος θα σχηματίσει ένα χρωμόσωμα και έτσι δημιουργούνται τα 46 χρωμοσώματα. Συνολικά, σχηματίζονται 23 ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων, όπου το κάθε ζεύγος φέρει τις δύο αρχικές χρωματίδες, όπου η κάθε μία είναι συνδεδεμένη με την αντίστοιχη αδελφή χρωματίδα που προέκυψε με την αντιγραφή του DNA. Κατά την μείωση τα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν με το ομόλογο χρωμόσωμα και υπόκεινται σε δύο διαδοχικές διαιρέσεις (μείωση I και μείωση II), χωρίς την μεσολάβηση εκ νέου αντιγραφής του DNA. Κατά την μείωση I πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων και κατά την μείωση II πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων. Κατά συνέπεια, από κάθε διπλοειδές προγονικό γαμετικό κύτταρο σχηματίζονται τέσσερα κύτταρα μέσω δύο διαδοχικών μειωτικών διαιρέσεων, οι πυρήνες των οποίων εμπεριέχουν ένα ινίδιο δίκλωνου γραμμικού DNA από κάθε χρωμοσωμική σειρά, δηλαδή ένα πλήρες απλοειδές γονιδίωμα ($n=23$) (Εικόνα 10) (“iGenetics,” n.d.).

1^η Μειωτική Διαίρεση

Η 1^η μειωτική διαίρεση, δηλαδή η φάση κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων, αποτελείται από τέσσερα στάδια: την πρόφαση I, την μετάφαση I, την ανάφαση I και την τελόφαση I.

Κατά την πρόιμη πρόφαση I (ονομάζεται και στάδιο του λεπτονήματος), αρχίζει ο σχηματισμός της μειωτικής ατράκτου, με ανάλογο μηχανισμό εκείνου που περιεγράφηκε ανωτέρω για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, κατά την πρόιμη πρόφαση της μίτωσης. Παράλληλα, και σε αναλογία με τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την μίτωση, ο προφασικός πυρήνας του διπλοειδούς προγονικού γαμετικού κυττάρου φέρει 46 ζεύγη αδελφών χρωματίδων, καθώς έχει προηγηθεί η αντιγραφή του DNA στην S φάση. Η χρωματίνη στην πρόιμη πρόφαση I αρχίζει και συσπειρώνεται και οι χρωματίδες (96 δίκλινα γραμμικά “κομμάτια” DNA) αρχίζουν να γίνονται ορατές υπό την μορφή επιμηκυμένων, λεπτών νηματίων χρωματίνης, ενωμένων στο κεντρομερίδιο. Όταν ένα προγονικό γαμετικό κύτταρο εισέλθει στην φάση του λεπτονήματος, η διαδικασία της μείωσης είναι πλέον μη αναστρέψιμη (“iGenetics,” n.d.).

Μεταξύ της αρχής και του μέσου της πρόφασης I (ονομάζεται και στάδιο του ζυγονήματος) η συσπείρωση της χρωματίνης γίνεται πολύ έντονη και έτσι σχηματίζονται τα 46 χρωμοσώματα. Επιπρόσθετα, στην φάση αυτή λαμβάνει χώρα ένα περίπλοκο και παράδοξο φαινόμενο. Καθένα από τα 46 χρωμοσώματα, μέσω μίας δυναμικής διεργασίας, εντοπίζει το ομόλογό του και τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα στοιχίζονται το ένα δίπλα στο άλλο. Ακολουθεί η σύναψη των ομολόγων χρωμοσωμάτων, δηλαδή η ισχυρή ένωση αυτών, βάση προς βάση, μέσω ενός περίπλοκου πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο έχει δομή που μοιάζει με φερμουάρ. Τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο ονομάζεται συναπτονημικό σύμπλοκο. Έτσι, κατά το ζυγόνημα σχηματίζονται 23 συναπτονημικά σύμπλοκα εντός του πυρήνα του προγονικού γαμετικού κυττάρου. Τα χρωμοσώματα πριν την δημιουργία του συναπτονημικού συμπλόκου έχουν αποκτήσει την μέγιστη συσπείρωσή τους. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα ομόλογα χρωμοσώματα εντοπίζουν δυναμικά το ένα το άλλο παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστος, ωστόσο μελέτες δείχνουν πως σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα τελομερή των χρωμοσωμάτων, τα οποία συγκεντρώνονται στην πυρηνική μεμβράνη και δημιουργούν μία δομή που μοιάζει με ανθοδέσμη (bouget). Με την συνδρομή εξειδικευμένων πρωτεϊνών τα τελομερή των χρωμοσωμάτων στοιχίζονται με τα ομόλογα τελομερή του ομόλογου χρωμοσώματος και έτσι σταδιακά τα ομόλογα χρωμοσώματα στοιχίζονται το ένα δίπλα στο άλλο βάση προς βάση, σε όλο το μήκος τους (“iGenetics,” n.d.).

Η ολοκλήρωση της σύναψης σηματοδοτεί την είσοδο στο μέσο της πρόφασης I, στάδιο το οποίο καλείται παχύνημα. Κατά το παχύνημα λαμβάνει χώρα ένα εξαιρετικά

σημαντικό γεγονός το οποίο καλείται διασκελισμός (crossing-over). Πρόκειται για την αμοιβαία φυσική ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων. Η φυσική αυτή ανταλλαγή ευνοείται από την απόλυτη, βάση προς βάση, στοίχιση των ομολόγων χρωμοσωμάτων μέσω του συναπτονημικού συμπλόκου. Αν και τα ομόλογα χρωμοσώματα περιέχουν τους ίδιους γενετικούς τόπους στις ίδιες ακριβώς θέσεις, αυτοί δύνανται να διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των βάσεων, δηλαδή να περιέχουν διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως το ένα ομόλογο χρωμόσωμα είναι μητρικής και το άλλο πατρικής προέλευσης, άρα ενδέχεται να περιέχουν διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια. Αν όντως υπάρχουν διαφορές στην αλληλουχία των γενετικών τόπων, ο διασκελισμός θα οδηγήσει εν τέλει στην δημιουργία νέων γονιδιακών συνδυασμών σε μία χρωματίδα. Συνήθως πραγματοποιούνται αμοιβαίες ανταλλαγές μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων και έτσι δεν παρατηρείται απώλεια ή προσθήκη γενετικού υλικού. Ωστόσο, ο διασκελισμός είναι ένα εξαιρετικά συχνό φαινόμενο το οποίο ουσιαστικά προκαλεί ανακατομή της γενετικής πληροφορίας μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων. Εάν ένα χρωμόσωμα μετά το παχύνημα φέρει διαφορετική σύσταση γενετικών τόπων από αυτήν που είχε αρχικά ονομάζεται ανασυνδυασμένο χρωμόσωμα και ο μηχανισμός που το δημιουργεί ονομάζεται γενετικός ανασυνδυασμός. Ο γενετικός ανασυνδυασμός αποτελεί τον βασικό μηχανισμό πρόκλησης γενετικής ποικιλομορφίας και εξελικτικά έχει επικρατήσει καθώς επιτρέπει την προσαρμογή και την εξέλιξη των αμφιγονικά αναπαραγόμενων οργανισμών (“iGenetics,” n.d.).

Η λήξη του σταδίου του παχυνήματος και η έναρξη του επόμενου σταδίου, το οποίο καλείται διπλόνημα, σηματοδοτείται από την καταστροφή του συναπτονημικού συμπλόκου και την φυσική απομάκρυνση των χρωμοσωμάτων από τα ομόλογά τους. Λόγω της απομάκρυνσης αυτής, στα σημεία που έχει λάβει χώρα διασκελισμός, σχηματίζεται μία σταυροειδής δομή που ονομάζεται χιάσμα. Η ύπαρξη χιασμάτων υποδηλώνει λοιπόν την ανταλλαγή χρωμοσωμικού υλικού μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων. Στα χιάσματα τα ομόλογα χρωμοσώματα είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Από το στάδιο του διπλονήματος αρχίζει η αποσυγκρότηση της πυρηνικής μεμβράνης και η καταστροφή του πυρηνίσκου, ενώ παράλληλα τα διπλασιασμένα κεντροσώματα παρατάσσονται αντιδιαμετρικά επί του ισημερινού πεδίου του κυττάρου έξω από τον πυρήνα (“iGenetics,” n.d.).

Αν και στους περισσότερους οργανισμούς μετά το διπλόνημα παρατηρείται γρήγορη πρόοδος της μείωσης, στον άνθρωπο και σε πολλά άλλα θηλαστικά, τα προγονικά γαμετικά κύτταρα τα οποία θα δώσουν γένεση στα ωάρια παραμένουν στο στάδιο του διπλονήματος, της πρόφασης I, της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης για πολλά χρόνια. Στον άνθρωπο για παράδειγμα, τα ωογόνια (προγονικά κύτταρα των ωαρίων) διέρχονται από τα στάδια της μείωσης I ως το διπλόνημα μέχρι τον έβδομο μήνα της εμβρυϊκής ζωής και παραμένουν σε αυτό το στάδιο έως την εφηβεία, όπου και προκαλείται η ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος μέσω της ενεργοποίησης του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Γονάδες (ΥΥΓ). Από την εμμηναρχή έως και την εμμηνόπαυση, μέσω ενός περίπλοκου ενδοκρινικού μηχανισμού ο οποίος και θα περιγραφεί σε επόμενο κεφάλαιο, ένα με δύο ωογόνια σε κάθε έμμηνο κύκλο ολοκληρώνουν την 1^η μειωτική διαίρεση και ακολουθεί η ωορρηξία. Με την ωορρηξία απελευθερώνεται από το γραφιανό ωοθυλάκιο ένας σχηματισμός ο οποίος αποτελείται από το ώριμο ωάριο, στο οποίο έχει ολοκληρωθεί η 1^η μειωτική διαίρεση (διακρίνεται ως ένα μεγάλο κύτταρο με ομοιογενές κυτταρόπλασμα στο οποίο δεν είναι ορατός ο πυρήνας) και από το πρώτο πολικό σωματίο (μικρός κυτταρικός σχηματισμός πάνω στο ωάριο στον οποίο δεν διακρίνεται πυρήνας). Τόσο το ωάριο όσο και το στενά συνδεδεμένο με αυτό πρώτο πολικό σωματίο περιβάλλονται από ένα πρωτεϊνικής σύστασης περίβλημα το οποίο καλείται διάφανη ζώνη (zona pellucida) και από ένα σύμπλοκο κοκκιωδών κυττάρων. Το ωάριο δεν ολοκληρώνει την 2^η μειωτική διαίρεση έως ότου επέλθει γονιμοποίηση, η οποία στην φυσιολογική σύλληψη πραγματοποιείται στην σάλπιγγα. Αμέσως μετά την γονιμοποίηση, το ωάριο ολοκληρώνει την 2^η μειωτική διαίρεση, η επιτυχής ολοκλήρωση της οποίας σηματοδοτείται από την έξοδο του δεύτερου πολικού σωματίου. Η επιτυχής γονιμοποίηση και η δημιουργία του διπλοειδούς ζυγωτού (του πρώτου κυττάρου του νέου οργανισμού) προϋποθέτει την ολοκλήρωση και των δύο μειωτικών διαιρέσεων του ωαρίου και την σύντηξη με ένα απλοειδές σπερματοζωάριο. Η φυσιολογική γονιμοποίηση καθορίζεται από την ύπαρξη δύο πολικών σωματίων και δύο προπυρήνων εντός του γονιμοποιημένου ωαρίου, οι οποίοι προπυρήνες είναι ορατοί 16-18 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Στην συνέχεια οι δύο προπυρήνες συντήκονται σε έναν για να σχηματιστεί ο διπλοειδής πυρήνας του ζυγωτού (“iGenetics,” n.d.).

Σε αντίθεση με τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά την ωογένεση και την μείωση που υφίσταται τα προγονικά κύτταρα των ωαρίων, κατά την σπερματογένεση στον άνθρωπο παρατηρείται γρήγορη πρόοδος της μείωσης. Έτσι από τα προγονικά κύτταρα των σπερματοζωαρίων (σπερματογόνια) προκύπτουν μέσω μείωσης και μίας διαδικασίας

ωρίμανσης τα ώριμα σπερματοζώαρια. Σε αντίθεση με την ωογένεση, η σπερματογένεση είναι μία βιολογική διεργασία η οποία πραγματοποιείται κυκλικά και εκκινεί με την ωρίμανση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Όρχεις κατά την έναρξη της εφηβείας. Διαρκεί πρακτικά μέχρι και την γεροντική ηλικία, ωστόσο, σταδιακά και με την πρόοδο της ηλικίας του άντρα ο μηχανισμός της σπερματογένεσης επιβαρύνεται με αποτέλεσμα τόσο την ποσοτική, όσο και ποιοτική υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος. Υπολογίζεται πως κάθε κύκλος σπερματογένεσης διαρκεί περίπου 90 ημέρες (Griswold, 2015).

Η έναρξη της όψιμης πρόφασης I (στάδιο διακίνησης) καθορίζεται από την πλήρη αποδιοργάνωση τόσο της πυρηνικής μεμβράνης, όσο και του πυρηνίσκου. Ταυτόχρονα η μειωτική ατράκτος οργανώνεται πλήρως καθώς μικροσωληνίσκοι εκπορευόμενοι από τα κέντρα οργάνωσης (κεντροσωμάτια) προσδένονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων (“iGenetics,” n.d.).

Κατά την έναρξη της μετάφασης I, η πυρηνική μεμβράνη και ο πυρηνίσκος έχουν πλήρως αποδιοργανωθεί και τα μεταφασικά χρωμοσώματα στοιχίζονται, με την εφαρμογή δύναμης τάσης από τους συνδεδεμένους μικροσωληνίσκους επί του ισημερινού πεδίου του κυττάρου, κατά ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων. Σε αντίθεση με την μετάφαση της μίτωσης όπου τα χρωμοσώματα παρατάσσονται ανεξάρτητα το ένα κάτω από το άλλο επί της μεταφασικής πλάκας, στην μετάφαση I της μείωσης τα χρωμοσώματα παρατάσσονται κατά ζεύγη ομολόγων, ώστε το κάθε χρωμόσωμα να είναι προσδεδεμένο με μικροσωληνίσκους που εκπορεύονται από αντίθετο πόλο σε σχέση με το ομόλογό του χρωμόσωμα (“iGenetics,” n.d.).

Όπως και στην μιτωτική διαίρεση, έτσι και στην μείωση I, η εκκίνηση της ανάφασης I σηματοδοτείται όταν οι μοριακοί μηχανισμοί του σημείου ελέγχου της μειωτικής ατράκτου επιτρέψουν την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C. Η ενεργοποίηση του APC/C προϋποθέτει την σωστή παράταξη όλων των ζευγών ομολόγων χρωμοσωμάτων επί του ισημερινού πεδίου του κυττάρου, την πρόσδεση μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους όλων των ομολόγων χρωμοσωμάτων και την διαπίστευση πως στον κινητοχώρο του κάθε ομόλογου χρωμοσώματος έχουν προσδεθεί μικροσωληνίσκοι που εκπορεύονται από έναν και μόνο πόλο της μειωτικής ατράκτου. Μόλις οι μηχανισμοί ελέγχου της ακεραιότητας της μειωτικής ατράκτου το επιτρέψουν πραγματοποιείται εκκίνηση του μηχανισμού διαχωρισμού των ομολόγων χρωμοσωμάτων.

Έτσι, το ένα χρωμόσωμα κατευθύνεται προς τον ένα πόλο του κυττάρου και το ομόλογό του προς τον αντίθετο. Η μετακίνηση αυτή είναι τυχαία και ανεξάρτητη και έτσι δημιουργείται ένας περίπλοκος συνδυασμός χρωμοσωμάτων πατρικής και μητρικής προέλευσης σε κάθε πόλο, αυξάνοντας ακόμα περισσότερο την γενετική ποικιλομορφία των γαμετών. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως στην ανάφαση I της μείωσης οι αδελφές χρωματίδες των διαχωρισμένων ομόλογων χρωμοσωμάτων παραμένουν ενωμένες στα κεντρομερή και δεν διαχωρίζονται όπως συμβαίνει στην μίτωση. Ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων θα πραγματοποιηθεί στην 2^η μειωτική διαίρεση (“iGenetics,” n.d.).

Η λήξη της ανάφασης I και η έναρξη της τελόφασης I σηματοδοτείται όταν ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Στην φάση αυτή, 23 χρωμοσώματα βρίσκονται στον ένα πόλο του κυττάρου και τα υπόλοιπα 23 ομόλογά τους στον άλλο. Γύρω από κάθε ομάδα χρωμοσωμάτων σχηματίζεται νέος πυρηνικός φάκελος και στα περισσότερα ζωικά ήδη ακολουθεί η κυτταροκίνηση από την οποία και προκύπτουν δύο νέα κύτταρα. Έτσι, η μείωση I, που αρχίζει με ένα προγονικό διπλοειδές γαμετικό κύτταρο το οποίο περιέχει μία χρωμοσωμική σειρά πατρικής και μια χρωμοσωμική σειρά μητρικής προέλευσης, καταλήγει με τον σχηματισμό δύο νεών κυττάρων τα οποία περιέχουν ένα χρωμόσωμα από κάθε ομόλογο ζεύγος, μεικτής γονεϊκής προέλευσης. Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω αναφορικά με τον γενετικό ανασυνδυασμό και την τυχαία κατανομή των ομολόγων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, καθίσταται εύκολα αντιληπτό ότι ο αριθμός των επιμέρους δυνατών συνδυασμών είναι τόσο μεγάλος που πρακτικά είναι αδύνατον να σχηματιστούν γαμέτες που να φέρουν την ίδια ακριβώς γενετική σύσταση (“iGenetics,” n.d.).

2^η Μειωτική Διαίρεση

Κάθε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από την 1^η μειωτική διαίρεση περιέχει στον πυρήνα του 23 χρωμοσώματα όπου το καθένα φέρει τις δύο αδελφές χρωματίδες ενωμένες στο κεντρομερίδιο. Επί της ουσίας, το κάθε κύτταρο περιέχει 46 γραμμικά μόρια DNA, μικτής γονικής προέλευσης και είναι απλοειδές, καθώς φέρει ένα αντίγραφο της γενετικής πληροφορίας, ανεξάρτητα από το αν περιέχει εις διπλούν την γενετική πληροφορία (αδελφές χρωματίδες). Ο κάθε γενετικός τόπος αντιπροσωπεύεται δηλαδή μία φορά. Προκειμένου να παραχθούν οι ώριμοι γαμέτες, τα δύο αυτά κύτταρα εισέρχονται άμεσα στην 2^η μειωτική διαίρεση, χωρίς να προηγηθεί όμως εκ νέου διπλασιασμός του γενετικού υλικού (“iGenetics,” n.d.).

Η 2^η μειωτική διαίρεση είναι παρόμοια με την μιτωτική διαίρεση. Στην πρόφαση II τα 23 χρωμοσώματα που υπάρχουν σε κάθε κύτταρο συσπειρώνονται. Στην μετάφαση II σε κάθε θυγατρικό κύτταρο οργανώνεται μία άτρακτος και αποδιοργανώνονται οι πυρηνικές μεμβράνες. Μικροσωληνίσκοι εκπορευόμενοι από τους δύο πόλους της ατράκτου προσδένονται στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων και τα 23 χρωμοσώματα στοιχίζονται τυχαία επί του ισημερινού πεδίου των κυττάρων, ενώ οι αδελφές χρωματίδες συνεχίζουν να είναι ενωμένες στο κεντρομερίδιο. Η εκκίνηση της ανάφασης II σηματοδοτείται όταν οι μοριακοί μηχανισμοί του σημείου ελέγχου της ατράκτου επιτρέψουν την ενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C. Η ενεργοποίηση του APC/C προϋποθέτει την σωστή παράταξη όλων των χρωμοσωμάτων επί του ισημερινού πεδίου, την πρόσδεση μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους όλων των αδελφών χρωματίδων και την διαπίστευση πως στον κινητοχώρο της κάθε αδελφής χρωματίδας έχουν προσδεθεί μικροσωληνίσκοι που εκπορεύονται από έναν και μόνο πόλο της ατράκτου. Κατά την ανάφαση II οι αδελφές χρωματίδες μηχανικά έλκονται προς τα κεντροσώματα που βρίσκονται ακροβολισμένα στους δύο αντιδιαμετρικούς πόλους της ατράκτου. Έτσι, η μία αδελφή χρωματίδα κάθε ζεύγους πηγαίνει στον έναν πόλο και η άλλη στον αντίθετο πόλο του κυττάρου (“iGenetics,” n.d.). Τέλος, ακολουθεί η τελόφαση II και αρχίζει η αποσυσπείρωση της χρωματίνης, η οποία σταδιακά αποκτά δομή ινιδίων χρωματίνης. Σταδιακά αρχίζει η εκ νέου διοργάνωση δύο πυρηνικών φακέλων, στους δύο πόλους του κυττάρου και αρχίζει η κυτταροκίνηση. Μετά την ολοκλήρωση της τελόφασης II έχουν πλέον σχηματιστεί τέσσερα απλοειδή κύτταρα (n=23) (“iGenetics,” n.d.).

1.2 Βλάβες στο DNA και Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης

Η διατήρηση της ακεραιότητας, της δομής και της αλληλουχίας του γενετικού υλικού αποτελεί συνθήκη αναγκαία και ικανή για την διατήρηση της ζωής στον πλανήτη. Ταυτόχρονα, η παρουσία μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό, δηλαδή η αλλαγή στην δομή ή/και στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, αποτελεί τον βασικό μηχανισμό δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας, η οποία με την σειρά της αποτελεί την βάση της εξέλιξης των ειδών. Αν και οι μεταλλάξεις προωθούν την εξέλιξη και άρα την συνέχιση της ζωής στον πλανήτη, καθώς μέσω αυτών οι οργανισμοί είναι σε θέση να αποκτούν την απαραίτητη προσαρμοστική διαφοροποίηση ώστε να ανταπεξέρχονται στις συνεχείς μεταβολές του περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν, σε κυτταρικό επίπεδο προκαλούν σημαντικές

μεταβολές στην λειτουργία των κυττάρων. Η επίδραση των μεταλλάξεων στους ανώτερους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σχετίζεται με την δυσλειτουργία των κυττάρων και κατά επέκταση των ιστών και των οργάνων, με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση ασθενειών, όπως ο καρκίνος και την γήρανση. Είναι γνωστό πως το μόριο του DNA, το οποίο αποτελεί το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών οργανισμών και ως εκ τούτου την βασική μονάδα κληρονομικότητας, είναι ένα δυναμικό μόριο το οποίο υφίσταται πολλαπλές αλλαγές στην δομή και την αλληλουχία του από μία πλειάδα χημικών παραγόντων προερχόμενων τόσο από τον ενδοκυτταρικό, όσο και από το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επιπρόσθετα, πηγή μεταλλάξεων και βλαβών στο DNA αποτελούν τα λάθη που λαμβάνουν χώρα σε μεγάλη συχνότητα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Γίνετε αντιληπτό ότι κατά τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου συμβαίνουν χιλιάδες βλάβες στο DNA, οι οποίες εν δυνάμει είναι θανατογόνες και οι οποίες μπορούν να απορυθμίσουν την κυτταρική λειτουργία, θέτοντας σε κίνδυνο την επιβίωση των οργανισμών. Για αυτό τον λόγο έχουν αναπτυχθεί ποικίλοι μηχανισμοί σε πολλαπλά επίπεδα, οι οποίοι έχουν ως στόχο την αποκατάσταση των βλαβών, όπου αυτό είναι εφικτό, την ανάπτυξη κυτταρικής ανοχής στην βλάβη, ώστε να μην επηρεάζεται η κυτταρική λειτουργία, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπως αυτή παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 1.1 και την ρύθμιση των μονοπατιών πρόκλησης κυτταρικού θανάτου, προκειμένου να διατηρηθεί η ομαλή λειτουργία των ιστών και των οργάνων και να αποτραπεί η διαιώνιση των βλαβών στο DNA στις επόμενες γενεές κυττάρων.

1.2.1 Κατηγορίες βλαβών στο DNA

Οι βλάβες στο DNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες αναφορικά με την πηγή προέλευσής τους: στις ενδογενείς και τις εξωγενείς. Η μεγάλη πλειονότητα των ενδοκυτταρικών βλαβών προκαλείται από βιοχημικές αντιδράσεις υδρόλυσης και οξειδωσης που λαμβάνουν χώρα όταν το μόριο του DNA αλληλοεπιδρά με μόρια νερού και ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), αντίστοιχα, χημικοί παράγοντες οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται εντός των κυττάρων. Όπως γίνεται αντιληπτό, οι αντιδράσεις αυτές μεταξύ των μορίων DNA και των παραγόντων που βρίσκονται στο άμεσο χημικό του περιβάλλον είναι πολύ συχνές και η επιδιόρθωση αυτών απαιτεί την ύπαρξη μίας πλειάδας μοριακών ενδοκυτταρικών μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης. Αποτελούν δε την βάση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών πρόκλησης

κληρονομικών και επίκτητων ασθενειών, αλλά και σποραδικών καρκίνων (Perrone et al., 2016; Reuter et al., 2010; Visconti and Grieco, 2009). Σε αντίθεση με τις ενδογενείς βλάβες, οι εξωγενείς βλάβες στο DNA λαμβάνουν χώρα όταν περιβαλλοντικοί, φυσικοί ή/και χημικοί παράγοντες του εξωτερικού περιβάλλοντος του κυττάρου, επιδρούν στο DNA διαταράσσοντας την δομή και την αλληλουχία του. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εξωγενών παραγόντων πρόκλησης βλάβης στο DNA είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (UV radiation), η ιονίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation) και οι ακετυλιωτικοί χημικοί παράγοντες (Chatterjee and Walker, 2017).

Ενδογενείς βλάβες στο DNA

Λάθη κατά την αντιγραφή, Λανθασμένα ζευγαρωμένες βάσεις και σύμπλοκα τοποϊσομεράσης-DNA

Κάθε φορά που πραγματοποιείται αντιγραφή του DNA σε ένα ανθρώπινο κύτταρο, περίπου 3×10^9 βάσεις αντιγράφονται ταχύτατα υπό την δράση ενός περίπλοκου συμπλόκου ενζύμων και πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα μέσω της ενζυμικής δραστηριότητας των υψηλής αξιοπιστίας DNA πολυμερασών δ και ϵ , οι οποίες πραγματοποιούν την αντιγραφή του DNA με υψηλή αποτελεσματικότητα και πιστότητα. Ωστόσο, τα κύτταρα είναι εξοπλισμένα και με μία πλειάδα επιπρόσθετων DNA πολυμερασών (α , β , σ , γ , λ , REV1, ζ , η , ι , κ , θ , ν , μ , Tdt and PrimPol), οι οποίες όμως παρουσιάζουν μικρότερη αξιοπιστία, σε σύγκριση με τις δ και ϵ , αναφορικά με την πιστότητα της αντιγραφής του DNA που πραγματοποιούν (Loeb and Monnat, 2008). Παρά το γεγονός πως η αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται με υψηλή πιστότητα, φαινόμενα αντικατάστασης, προσθήκης ή/και αφαίρεσης μεμονωμένων βάσεων λαμβάνουν χώρα με συχνότητα 10^{-6} έως και 10^{-8} σε κάθε ανθρώπινο κύτταρο, ανά κύκλο αντιγραφής του DNA (Kunkel, 2011, 2009, 2004). Επιπρόσθετα, λάθη κατά την αντιγραφή του DNA συμβαίνουν λόγω ολίσθησης των DNA πολυμερασών στην αλυσίδα του DNA, φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κυρίως στις περιοχές εκείνες του γονιδιώματος που παρατηρείται αλληλουχία όμοιων βάσεων (repetitive sequences). Το φαινόμενο της ολίσθησης έχει σαν αποτέλεσμα την λανθασμένη προσθήκη ή και αφαίρεση νουκλεοτιδίων και την ολική διατάραξη του πλαισίου ανάγνωσης (reading frame), με τελικό αποτέλεσμα την ολική καταστροφή της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών που θα προκύψουν μετά την μεταγραφή και την μετάφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στο οποίο θα συμβεί ολίσθηση κατά την αντιγραφή (Chatterjee et al., 2016; Viguera et al., 2001).

Σε άλλες περιπτώσεις, καθίσταται δυνατόν οι DNA πολυμεράσες να τοποθετήσουν λανθασμένα στην διπλή έλικα του DNA ριβονουκλεοτίδια (rNTPs) ουρακίλης, αντί θυμίνης, με αποτέλεσμα την διατάραξη της αλληλουχία της γενετικής πληροφορίας στο σημείο της βλάβης. Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει συνήθως χώρα όταν υπάρχει πλεόνασμα των σχετικών και απόλυτων συγκεντρώσεων των ριβονουκλεοτιδίων (rNTPs), έναντι των δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) εντός του κυττάρου. Στο πλαίσιο αυτό και σύμφωνα με τον νόμο δράσης των μαζών, οι DNA πολυμεράσες λανθασμένα τοποθετούν ριβονουκλεοτίδια (rNTPs) στην διπλή έλικα, κατά την αντιγραφή του DNA (Buckland et al., 2014; Potenski and Klein, 2014). Σε κάθε περίπτωση και ανεξάρτητα από το αίτιο της βλάβης, όταν αυτή δεν ανιχνεύεται και δεν επιδιορθώνεται, θα εγκαθιδρυθεί ως μετάλλαξη και πλέον θα μεταβιβάζεται σε όλες τις γενιές των επόμενων κυττάρων. Με αυτόν το μηχανισμό, ένα λάθος που λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή του DNA σε ένα μόνο κύτταρο, μπορεί εν τέλει να οδηγήσει στην δημιουργία ενός κλώνου μεταλλαγμένων κυττάρων και για τον λόγο αυτό τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA θεωρούνται ως ένα από τα βασικά αίτια πρόκλησης αυθόρμητων μεταλλάξεων.

Μία ακόμα πηγή ενδογενών μεταλλάξεων, που λαμβάνουν χώρα στο πλαίσιο της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA, αποτελεί η δράση μίας εξειδικευμένης ομάδας ενζύμων που καλούνται τοποϊσομεράσες. Η δράση των τοποϊσομερασών έγκειται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και συγκεκριμένα στην απομάκρυνση των περιελίξεων στα σημεία που παρατηρείται έντονη αναδίπλωση της χρωματίνης (superhelical tension). Στα σημεία αυτά η πρόσθεση των συμπλόκων της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA καθίσταται αδύνατη, καθώς η χρωματίνη είναι υπερβολικά αναδιπλωμένη, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται τα σημεία έναρξης της αντιγραφής και οι υποκινητές των γονιδίων, αντίστοιχα. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται επτά γονίδια τοποϊσομερασών, με την TOPI να αποτελεί την πιο κοινή παραλλαγή των ενζύμων. Η απομάκρυνση των περιελίξεων, η οποία καταλύεται από τις τοποϊσομεράσες, πραγματοποιείται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού, όπου τα σημεία στα οποία παρατηρείται η έντονη περιέλιξη, αποκόπτονται από τις γειτονικές τους αλληλουχίες. Στη συνέχεια η διπλή έλικα περιστρέφεται με τέτοιο προσανατολισμό, ώστε να απομακρυνθεί η περιέλιξη. Τέλος, το τμήμα επανασυνδέεται με τα άκρα των γειτονικών τμημάτων, όντας πλέον μη περιελιγμένο. Η αντίδραση απομάκρυνσης των περιελίξεων είναι μία σύνθετη διαδικασία και η διατήρηση της ακεραιότητα της δομής του DNA είναι άμεσα συνυφασμένη με την σταθερότητα των

συμπλόκων τοποϊσομεράσης-DNA. Σε περίπτωση που το σύμπλοκο αποσταθεροποιηθεί, τότε είναι πιθανόν να συμβούν εκτεταμένες βλάβες στην αρχιτεκτονική της διπλής έλικας του DNA, συμπεριλαμβανομένων των μεγάλων ελλειμάτων και της λανθασμένης προσθήκης βάσεων εκτός του πλαισίου ανάγνωσης της γενετικής πληροφορίας. Αποσταθεροποίηση των συμπλόκων τοποϊσομεράσης-DNA παρατηρείται συνήθως σε σημεία που προϋπάρχουν βλάβες στο DNA, όπως είναι οι βλάβες που έχουν προκληθεί από την επίδραση της UV ακτινοβολίας ή/και χημικών παραγόντων που προκαλούν ακετυλίωση, αλλά και στα σημεία που έχει διαταραχθεί η αρχιτεκτονική της διπλής έλικας του DNA, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις θέσεις που δεν υπάρχει βάση (abasic sites) ή υπάρχουν λανθασμένα ζευγαρωμένες βάσεις (mismatches). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία εκτεταμένων βλαβών στο DNA. Συνήθως οι βλάβες που προκαλούνται από την αποσταθεροποίηση των συμπλόκων τοποϊσομεράσης-DNA επιδιορθώνονται μέσω επανασύνδεσης των περιελιγμένων τμημάτων ή απομάκρυνσης αυτών από ένζυμα, όπως είναι το ένζυμο TDP1 (tyrosyl DNA phosphodiesterase) και οι ενδονουκλεάσες. Ωστόσο, οι επιδιορθώσεις αυτές στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν είναι ολοκληρωτικές, με αποτέλεσμα να μην αποκαθίσταται πλήρως η αρχιτεκτονική της χρωματίνης στα σημεία της βλάβης (Chatterjee and Walker, 2017).

Αυθόρμητη απαμίνωση βάσεων

Η απαμίνωση των βάσεων (base deamination) συνιστά έναν από τους βασικούς μηχανισμούς πρόκλησης αυθόρμητων μεταλλάξεων στα κύτταρα του ανθρώπου. Στο πλαίσιο της απαμίνωσης, οι αζωτούχες βάσεις του DNA και πιο συγκεκριμένα η κυτοσίνη (C), η αδενίνη (A), η γουανίνη (G) και η 5-μεθυλ-κυτοσίνη (5mC) απολύουν την εξωκυκλική τους αμίνη και μετατρέπονται σε ουρακίλη (U), υποξανθίνη, ξανθίνη και θυμίνη (T), αντίστοιχα (Chatterjee and Walker, 2017). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως οι αντιδράσεις απαμίνωσης λαμβάνουν χώρα με μεγαλύτερη συχνότητα σε περιοχές, όπου η αλυσίδα του DNA είναι μονή (single-stranded) σε σύγκριση με τις περιοχές του DNA όπου η αλυσίδα είναι διπλή (double-stranded) (Yonekura et al., 2009). Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω, εξάγεται τι συμπέρασμα πως οι αντιδράσεις απαμίνωσης συμβαίνουν κυρίως κατά την διάρκεια της αντιγραφής, της μεταγραφής και του ανασυνδυασμού του DNA. Μέσω των αντιδράσεων απαμίνωσης είναι δυνατόν να συμβούν σημαντικές αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και κατά επέκταση στην κωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας. Για παράδειγμα, έστω το ζεύγος

νουκλεοτιδίων C:G, όπου το νουκλεοτίδιο της C υφίσταται απαμίνωση και έτσι το ζεύγος C:G μετατρέπεται στο ασταθές ζεύγος U:G. Λόγω της αστάθειας του ζεύγους, στον πρώτο κύκλο αντιγραφής η γουανίνη αντικαθίσταται από την συμπληρωματική βάση της U, η οποία είναι η A και το αρχικό ζεύγος C:G αντικαθίσταται από το ζεύγος U:A. Στον επόμενο κύκλο αντιγραφής και δεδομένου πως η U δεν αποτελεί βάση του DNA, αυτή θα αντικατασταθεί από T. Έτσι, το αρχικό ζεύγος C:G μετά από απαμίνωση της C και έπειτα από δύο κύκλους αντιγραφής του DNA, θα αντικατασταθεί από το μεταλλαγμένο ζεύγος TA. Στην περίπτωση όπου η μετάλλαξη λάβει χώρα σε εσώνιο γονίδιο ή σε περιοχή που δεν κωδικοποιεί κάποιο γονίδιο, τότε η γενετική πληροφορία παραμένει αναλλοίωτη. Σε αντίθετη περίπτωση και λόγω της αλλαγής στην αλληλουχία του πλαισίου ανάγνωσης, παρατηρείται δυσλειτουργία του πρωτεϊνικού μορίου που κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο γονίδιο, ή ακόμα και παντελή έλλειψη αυτού (Chatterjee and Walker, 2017). Οι βάσεις της κυτοσίνης και της 5-μεθυλ-κυτοσίνης (5mC) είναι αυτές που υφίσταται απαμίνωση με μεγαλύτερη συχνότητα σε σύγκριση με τις άλλες βάσεις του DNA και πιο ειδικά η 5-μεθυλ-κυτοσίνη (5mC), η οποία και υφίσταται απαμίνωση με συχνότητα τρεις με τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με την κυτοσίνη (Chatterjee and Walker, 2017). Βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν πως η αντικατάσταση των βάσεων GC από τις βάσεις AT, φαινόμενο που λαμβάνει χώρα έπειτα από την απαμίνωση των βάσεων της κυτοσίνης και της 5-μεθυλ-κυτοσίνης (5mC) σε περιοχές του DNA όπου υπάρχουν αλληλουχίες CpG, ευθύνεται για το ένα τρίτο το μεταλλάξεων αντικατάστασης νουκλεοτιδίων (single cite mutations), οι οποίες και προκαλούν πλήθος κληρονομικών ασθενειών στον άνθρωπο (De Bont and van Larebeke, 2004).

Παρά το γεγονός πως οι αυθόρμητες αντιδράσεις απαμίνωσης συνιστούν φαινόμενο πρόκλησης επιβλαβών μεταλλάξεων, θα πρέπει να τονιστεί πως αυτές λαμβάνουν χώρα και στο πλαίσιο της φυσιολογικής απόκρισης των οργανισμών και προσφέρουν εξελικτικά πλεονεκτήματα (Chatterjee and Walker, 2017). Πιο αναλυτικά, ενζυμική απαμίνωση νουκλεοτιδίων κυτοσίνης παρατηρείται έντονα στο πλαίσιο της παραγωγής αντισωμάτων από τον ξενιστή έναντι των ρετροϊών (retrovirus), αντίδραση η οποία καταλύεται σε στοχευμένες θέσεις του γονιδιώματος από τις απαμινάσες AID (activation-induced deaminase) και APOBEC1 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1) (Chandra et al., 2015). Επιπρόσθετα, αντιδράσεις απαμίνωσης συμβαίνουν και υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων, όπως είναι η UV ακτινοβολία, οι ακετυλιωτικοί

παράγοντες, το νιτρικό οξύ και το όξινο θειώδες νάτριο, οι οποίοι από κοινού αυξάνουν την συχνότητα των αντιδράσεων απαμίνωσης στα νουκλεοτίδια του πυρηνικού DNA (d'Ischia et al., 2011). Δεδομένα δείχνουν πως τόσο οι εξωγενείς, όσο και οι ενδογενείς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν αντιδράσεις απαμίνωσης, συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση της γενετικής ποικιλομορφίας των ζωικών οργανισμών και του ανθρώπου και ως εκ τούτου συνδράμουν σημαντικά στην αύξηση της προσαρμοστικής ικανότητας και της εξέλιξης των ειδών και ειδικότερα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Chatterjee and Walker, 2017; Nabel et al., 2012).

Νουκλεοτίδια χωρίς αζωτούχο βάση (abasic sites)

Το φαινόμενο των νουκλεοτιδίων χωρίς αζωτούχο βάση (abasic sites, APs) παρατηρείται πολύ συχνά στο μόριο του DNA και είναι αποτέλεσμα της απομάκρυνσης της αζωτούχου βάσης, έπειτα από την διάσπαση του N-γλυκοζιτικού δεσμού που συνδέει την αζωτούχο βάση με το σάκχαρο της δεοξυριβόζης, που αποτελεί τον “σκελετό” του νουκλεοτιδίου. Η διάσπαση του δεσμού μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αυθόρμητα, μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, είτε υπό την ενζυμική επίδραση των ενζύμων DNA γλυκοζυλάσης. Το φαινόμενο AP παρατηρείται συχνά στα σημεία που λαμβάνει χώρα απομάκρυνση νουκλεοτιδίων ουρακίλης από το DNA, αντίδραση που πραγματοποιείται υπό την δράση της ουρακίλ-DNA γλυκοζυλάσης (Lindahl and Barnes, 2000). Υπολογίζεται πως στο ανθρώπινο γονιδίωμα σχηματίζονται περίπου 10.000 APs κάθε ημέρα. Δεδομένα καταδεικνύουν πως το εξωκυτταρικό περιβάλλον διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την δημιουργία θέσεων AP, καθώς τόσο οι ακραίες τιμές pH, όσο και η υψηλή θερμοκρασία, επάγουν τον σχηματισμό τους. Λόγω της έλλειψης της αζωτούχου βάσης, τα σημεία του γονιδιώματος που φέρουν APs είναι ασταθή, καθώς διαταράσσεται η αρχιτεκτονική της διπλής έλικας του DNA. Λόγω της γονιδιωματικής αστάθειας, στα σημεία αυτά συνήθως δημιουργούνται ρήγματα στην μία εκ των δύο αλυσίδων του DNA (single strand breaks-SSBs). Τα ρήγματα αυτά δημιουργούνται μέσω αντιδράσεων β-εξάλειψης (β-elimination), στο πλαίσιο των οποίων πραγματοποιείται διάσπαση των 3' φωσφοδιεστερικών δεσμών που συνδέουν το νουκλεοτίδιο AP, με το γειτονικό στα αριστερά νουκλεοτίδιο (Chatterjee and Walker, 2017). Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι θέσεις APs επιδιορθώνονται αποτελεσματικά μέσω της δράσης των AP ενδονουκλεασών. Επιπρόσθετα, καθίσταται δυνατή η προσπέλαση αυτών μέσω της δράσης των TLS πολυμερασών (Chan et al., 2013). Ωστόσο, λόγω της υψηλής συχνότητας

με την οποία σχηματίζονται και λόγω του ότι ο σχηματισμός τους συνδέεται άμεσα με την δημιουργία SSBs, οι θέσεις APs θεωρούνται ως πηγές σημαντικού ποσοστού μεταλλάξεων που λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Chatterjee and Walker, 2017).

Οξειδωτικές βλάβες στο DNA

Οι ενεργές ή δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) συνιστούν τυπικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και προκύπτουν στο πλαίσιο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής που επιτελείται στους αερόβιους οργανισμούς. Επιπρόσθετα, ROS παράγονται στο πλαίσιο της καταβολικής οξείδωσης, των βιοχημικών διεργασιών του αναβολισμού και του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού των υπεροξυσωμάτων (peroxisomal metabolism).

Βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν πως σε μικρές συγκεντρώσεις οι ROS συνιστούν ιδιαίτερα σημαντικά μόρια που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας και της ομοιόστασης των κυττάρων, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων και στην ανάπτυξη άμυνας του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, στο πλαίσιο των ανοσολογικών αντιδράσεων. Ωστόσο, σε υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις οι ROS μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες στην λειτουργία και την αρχιτεκτονική των κυττάρων. Λόγω της ασταθούς μοριακής τους δομής μπορούν να επάγουν πλήθος βιοχημικών αντιδράσεων, αλλοιώνοντας την μοριακή δομή του συνόλου των μορίων που ενέχονται στην δομή και φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοκυτταρικών μεμβρανικών οργανιδίων και ειδικά των μορίων των ριβονουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του DNA. Πιο ειδικά και αναφορικά με το DNA, έχει φανεί σε πολυάριθμες μελέτες πως οι ROS μπορούν να προκαλέσουν περισσότερες από 100 διαφορετικές βλάβες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι μοριακές τροποποιήσεις της δεοξυριβόζης, καθώς και τα μονά και διπλά ρήγματα στο DNA (single strand and double strand breaks, SSBs and DSBs), τα οποία ευθύνονται για το φαινόμενο του κατακερματισμού του DNA (DNA fragmentation). Μάλιστα, υπολογίζεται πως λόγω της επίδρασης των ROS, λαμβάνουν χώρα περισσότερα από 2300 SSBs ανά κύτταρο του οργανισμού ανά ώρα. Συνοψίζοντας τα ανωτέρω, γίνεται αντιληπτό πως τα κύτταρα βρίσκονται διαρκώς υπό την επίδραση των ROS και ως εκ τούτου οι ROS συνιστούν αίτιο

πρόκλησης πολυάριθμων μεταλλάξεων, όχι μόνο στο επίπεδο των βάσεων του DNA, αλλά και στο επίπεδο της αποδιοργάνωσης της χρωματίνης. Για τον λόγο αυτό τα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών είναι εξοπλισμένα με μία ποικιλία μηχανισμών που ρυθμίζουν την ομοιοστασία των ROS, εξασφαλίζοντας πως οι ROS βρίσκονται σε ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις, που από την μία να επιτρέπουν την επιτέλεση των σημαντικών ενδοκυτταρικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν και από την άλλη τον περιορισμό της συσσώρευσης αυτών, ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση βλαβών, οι οποίες θα επηρεάσουν σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων και των ιστών.

Μεταξύ των πολυάριθμων διαφορετικών ROS που έχουν καταγραφεί και περιγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία, οι πιο δραστικές είναι οι ελεύθερες ρίζες του υπεροξειδίου ($\bullet\text{O}_2^-$), τα μόρια του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και οι ελεύθερες ρίζες του υδροξειδίου ($\bullet\text{OH}$). Και οι τρεις αυτές κατηγορίες ROS ευθύνονται για την πλειονότητα των μεταλλάξεων που προκαλείται από ROS, ωστόσο τα $\bullet\text{O}_2^-$ συνιστούν την δραστικότερη μορφή αυτών, λόγω της εξαιρετικά ασταθούς φύσης τους, η οποία οφείλεται στην κβαντική δομή τους που φέρει δραστικά ηλεκτρόνια σθένους. Τα ανιόντα $\bullet\text{O}_2^-$ προκύπτουν ως παραπροϊόντα της αντίδρασης Fenton που λαμβάνει χώρα στο πλαίσιο του μεταβολισμού του H_2O_2 και η εξουδετέρωσή τους καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη. Πρακτικά τα ανιόντα $\bullet\text{O}_2^-$ αλληλοεπιδρούν με τα άτομα του συνόλου των μακρομορίων, που αποτελούν δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Πιο ειδικά και αναφορικά με το DNA, τα ανιόντα $\bullet\text{O}_2^-$ αλληλοεπιδρούν με τις βάσεις του DNA, προσβάλλοντας τους δεσμούς υδρογόνου που διασυνδέουν τις συμπληρωματικές βάσεις του DNA, αποδεσμεύουν άτομα υδρογόνου από τις μεθυλομάδες με τις οποίες βρίσκονται συνδεδεμένα και επιδρούν άμεσα στην δομή της δεοξυριβόζης. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται σημαντικές βλάβες στο μόριο του DNA, όπως μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσεων και ρήγματα στην διπλή έλικα.

Όπως τονίστηκε ανωτέρω, τα κύτταρα είναι εξοπλισμένα με μηχανισμούς προστασίας έναντι των βλαβερών επιπτώσεων των ROS, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται ο περιορισμός της αναπνευστικής δραστηριότητας από τα μιτοχόνδρια όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ROS ξεπεράσει ένα κρίσιμο σημείο, η προστασία των μορίων του DNA από τις ιστόνες και η εξουδετέρωση των ROS από μία πλειάδα εξειδικευμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων (superoxide dismutase, catalase, και peroxiredoxin). Ωστόσο, οι

μηχανισμοί αυτοί διαθέτουν πεπερασμένη αποτελεσματικότητα, ειδικά όταν οι ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις των ROS είναι υπερβολικά υψηλές. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ROS επηρεάζεται σημαντικά και από εξωγενείς παράγοντες, ο έλεγχος της επίδρασης των οποίων καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολος. Πιο αναλυτικά, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία και οι τοξίνες, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τα επίπεδα των ROS στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (lifestyle parameters), όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η μη ισορροπημένη διατροφή και η ελλιπής ή εξεζητημένη σωματική άσκηση, αποτελούν αίτια αύξησης των ROS στον οργανισμό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες προκαλούνται από την καταστροφική δράση των ROS, παρατηρείται επιπρόσθετη τροφοδότηση της παραγωγής ROS και ως εκ τούτου δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος, όπου το αίτιο γίνεται αποτέλεσμα και το αποτέλεσμα αίτιο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, δηλαδή τα αυτοάνοσα νοσήματα, η χρόνια πυελική φλεγμονή, η υφέρπουσα φλεγμονώδης νόσος και η ενδομητρίωση, το μεταβολικό σύνδρομο και ο διαβήτης. Επιπρόσθετα, εξεζητημένη αύξηση των ROS προκαλείται μετά από κάθε λοίμωξη, οπότε οι χρόνιες λοιμώξεις, η χρόνια ενδομητρίτιδα και η χρόνια προστατίτιδα, συνιστούν σημαντικό αίτιο αύξησης των ROS στον οργανισμό.

Ανεξάρτητα από την πηγή παραγωγής τους, οι ROS, λόγω των μεταλλαξογόνων ιδιοτήτων που διαθέτουν, βρίσκονται στην βάση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών πρόκλησης μίας πλειάδας σοβαρών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως είναι οι διάφοροι τύποι κακοήθειας, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις του νευρικού συστήματος (π.χ οι νόσοι Alzheimer και Parkinson), ο διαβήτης και η καρδιακή ανεπάρκεια.

Ιδιαίτερη ευαισθησία στις βλαπτικές επιδράσεις των ROS φαίνεται πως παρουσιάζει τόσο το άρρεν, όσο και το θήλυ αναπαραγωγικό σύστημα. Πιο αναλυτικά και αναφορικά με το άρρεν αναπαραγωγικό σύστημα, οι ROS επιδρούν άμεσα στο μικροπεριβάλλον των όρχεων, επηρεάζοντας αρνητικά τόσο την διαδικασία της σπερματογένεσης, όσο και στην λειτουργία των σπερματοζωαρίων αυτή καθαυτή. Μελέτες αναφέρουν πως σε ένα σημαντικό ποσοστό των ανδρών, οι οποίοι παρουσιάζουν ανεξήγητη υπογονιμότητα και μη φυσιολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα, τα επίπεδα του οξειδωτικού stress και των επιπέδων των ROS είναι πολύ αυξημένα σε σύγκριση με τον γόνιμο πληθυσμό. Οι ROS δύνανται να επηρεάσουν όλες τις

παραμέτρους του σπέρματος και ειδικότερα την συγκέντρωση και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επιπρόσθετα, υπό την επίδραση των ROS επηρεάζονται σημαντικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων, όπως είναι η δυνατότητα πρόσδεσης των σπερματοζωαρίων στην διάφανη ζώνη και η πραγματοποίηση της ακροσωμικής αντίδρασης. Ωστόσο, η πιο βλαπτική επίδραση των ROS στα σπερματοζωάρια φαίνεται πως συντελείται στο μόριο του DNA. Σε δείγματα σπέρματος που παρατηρούνται υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress και ROS, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που φέρουν κατακερματισμό του DNA είναι πολύ υψηλό. Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων ευθύνεται για φαινόμενα όπως είναι η αποτυχία γονιμοποίησης, καθώς και για την υποβάθμιση της ποιότητας, για τον περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης και του δυναμικού εμφύτευσης των εμβρύων, τα οποία προέρχονται από σπερματοζωάρια που φέρουν κατακερματισμένο DNA.

Σε αναλογία με τα όσα περιεγράφηκαν ανωτέρω για την επίδραση των ROS στο αρρεν αναπαραγωγικό σύστημα, εξ ίσου καταστροφική είναι και η επίδρασή τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Τα ROS, η παραγωγή των οποίων στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα έχει συσχετιστεί με μία πλειάδα παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η χρόνια πυελική νόσος, η ενδομητρίωση και οι χρόνιες λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπαραγωγικού, επιδρούν στο σύνολο των φυσιολογικών διεργασιών που επιτελούνται στις ωοθήκες και στο ενδομήτριο. Πιο αναλυτικά, η αυξημένη συγκέντρωση ROS στο μικροπεριβάλλον των ωοθηκών έχει συσχετιστεί με απορρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης και της ορμονικής λειτουργίας του άξονα Y-Y-Ω, με απώτερο αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας και του βαθμού ωριμότητας των ωαρίων και ως εκ τούτου του συνολικού αναπαραγωγικού δυναμικού. Ως εκ τούτου, ακόμα και στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilization, IVF), οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS μπορούν να οδηγήσουν σε αποτυχία γονιμοποίησης και περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Όπως συμβαίνει και στα σπερματοζωάρια, έτσι και στα ωάρια οι ROS αυξάνουν σημαντικά το ποσοστό του κατακερματισμού του DNA, γεγονός που προκαλεί περαιτέρω υποβάθμιση της ποιότητας των ωαρίων. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερη ευαισθησία στα ROS παρουσιάζουν και τα κύτταρα του ενδομητρίου. Η εξεζητημένη παρουσία των ROS στο ενδομήτριο προκαλεί ολοκληρωτική αποδιοργάνωση των ανοσολογικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της εμφύτευσης των εμβρύων, με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού αποτυχημένης εμφύτευσης,

ακόμα και στο πλαίσιο της IVF. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η εξεζητημένη παρουσία των ROS φαίνεται πως δεν επηρεάζει αρνητικά μόνο την ποιότητα των ωαρίων, την γονιμοποίηση, την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και την εμφύτευση, αλλά και την εγκαθίδρυση μίας φυσιολογικής εγκυμοσύνης, καθώς τα αυξημένα επίπεδα ROS έχουν συσχετιστεί ισχυρά με φαινόμενα πρόιμης απώλειας της κύησης και αποβολών.

Εξωγενείς βλάβες στο DNA

Ιονίζουσα ακτινοβολία (Ionizing Radiation, IR)

Ο όρος ιονίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation, IR) χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο διακριτών μορφών ακτινοβολίας μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι ακτίνες άλφα, βήτα, γάμμα, τα νετρόνια και οι ακτίνες X. Το περιβάλλον ανάπτυξης της ζωής βρίθει ιονίζουσας ακτινοβολίας, καθώς πηγές αυτής συνιστούν τα πετρώματα, το έδαφος, η κοσμική ακτινοβολία, αλλά και συσκευές καθημερινής χρήσης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και διάφορα μηχανήματα, όπως είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της ακτινοδιαγνωστικής. Οι διάφορες μορφές ιονίζουσας ακτινοβολίας διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ανάλογα με την πυκνότητα της ενέργειας που μεταφέρουν στην έμβια ύλη και με βάση το εάν η επίδρασή τους επί της έμβιας ύλης είναι άμεση ή έμμεση. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε πως η ιονίζουσα ακτινοβολία επιδρά προκαλώντας βλάβες στο DNA τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα. Έμμεσα η IR προκαλεί βλάβες μέσω της τροποποίησης του περιβάλλοντος διαβίωσης των κυττάρων, για παράδειγμα μέσω της πρόκλησης φαινομένων ραδιόλυσης μορίων ύδατος και απελευθέρωσης ενεργών ριζών οξυγόνου (π.χ ανιόντων υδροξυλίου). Στην περίπτωση αυτή, η IR προκαλεί έμμεσα οξειδωτικές βλάβες στο DNA, μέσω των μηχανισμών που περιεγράφηκαν ανωτέρω. Ωστόσο, οι διάφορες μορφές IR προκαλούν και άμεσες βλάβες στο DNA, μέσω τροποποίησης της μοριακής αρχιτεκτονικής των αζωτούχων βάσεων. Οι τροποποιήσεις αυτές οδηγούν στον σχηματισμό μονών και διπλών θραυσμάτων στο DNA.

Υπεριώδης ακτινοβολία (ultraviolet, UV radiation)

Κύρια πηγή UV ακτινοβολίας είναι ο ήλιος και όπως η IR, έτσι και η UV ακτινοβολία διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες, ο διαχωρισμός όμως αυτός βασίζεται στο μήκος κύματος της κάθε δέσμης ακτινοβολίας. Ανάλογα λοιπόν με το μήκος κύματος η UV ακτινοβολία

διακρίνεται σε UV-C (190–290 nm), UV-B (290–320 nm) και UV-A (320–400nm). Από αυτές η πιο επιβλαβής για την έμβια ύλη είναι η UV-C, καθώς το DNA, ως χημικό μόριο, απορροφά UV ακτινοβολία με μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης τα 260 nm. Ωστόσο, σημαντικό μέρος της επιβλαβούς UV-C ακτινοβολίας απορροφάται από το στρώμα του όζοντος και κατά αυτόν τον τρόπο προστατεύεται η έμβια ύλη από τις μεταλλαξιγόνες δράσεις της UV-C ακτινοβολίας. Η UV ακτινοβολία επιδρά στο μόριο του DNA τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα. Άμεσες βλάβες προκαλούνται όταν η UV έχει μήκος κύματος που επιτρέπει την απορρόφησή της από το DNA. Έμμεσες βλάβες προκαλούνται όταν η UV έχει μήκος κύματος που δεν επιτρέπει την απορρόφησή της από το DNA. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή η UV δύναται να απορροφηθεί από γειτονικά μόρια, τα οποία και μεταφέρουν την ενέργεια της ακτινοβολίας στο DNA. Μέσω πολύπλοκων μηχανισμών, η UV προκαλεί σημαντικές βλάβες στο DNA και η πιο διαδεδομένη εξ αυτών είναι η δημιουργία διμερών πυριμιδίνης. Οι βλάβες αυτές στο σύνολό τους προκαλούν σημαντικές αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση της διπλής έλικας, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η αντιγραφή του DNA. Επιπρόσθετα, οι βλάβες αυτές οδηγούν στην δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων και θραυσμάτων στο DNA.

Εξωγενείς χημικοί παράγοντες (exogenous chemical agents)

Μία τεράστια ποικιλία εξωγενών χημικών παραγόντων δύναται να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες και μεταλλάξεις στο μόριο του DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εξωγενών χημικών παραγόντων είναι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, οι αρωματικές αμίνες και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση συνδεδεμένοι μέσω σταθερών ομοιοπολικών δεσμών με πυρηνόφιλες ομάδες του μορίου του DNA, αντίδραση που καλείται ακετυλίωση του DNA. Δεδομένα συνηγορούν πως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες αντιδρούν κυρίως με τις θέσεις N⁷ της γουανίνης και N³ της γουανίνης στη διπλή αλυσίδα του DNA σχηματίζοντας χιαστές συνδέσεις (cross links). Μηχανικά, οι συνδέσεις αυτές παρεμποδίζουν τον διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA. Επειδή η ακετυλίωση του DNA προκαλεί διακοπή ζωτικών κυτταρικών διεργασιών, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες παρουσιάζουν εξαιρετικά τοξική δράση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον

προκαλεί το γεγονός πως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες επιδρούν στα κύτταρα κυρίως κατά την φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Ως εκ της κυτταροτοξικής τους δράσης, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην αντιμετώπιση νεοπλασιών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η κυκλοφωσφαμίδη και η κισπλατίνη.

Οι αρωματικές αμίνες είναι χημικοί παράγοντες που βρίσκονται κυρίως στον καπνό του τσιγάρου και σε βιομηχανικά παραπροϊόντα, ενώ παράγονται και από πολυάριθμες άλλες δραστηριότητες της καθημερινότητας. Οι αρωματικές αμίνες ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση αφού πρώτα ενεργοποιηθούν από το σύστημα της μονο-οξυγενάσης P450. Η ενεργοποίηση αυτή μετατρέπει τις αρωματικές αμίνες σε αλκυλιωτικούς παράγοντες (εστέρες) οι οποίοι προσβάλλουν την θέση C⁸ της γουανίνης. Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί σημαντική αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του DNA.

Παρόμοια με τις αρωματικές αμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι οποίοι συνιστούν υδρογονάνθρακες που φέρουν δύο οι περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, προκαλούν εκτεταμένες βλάβες στην αρχιτεκτονική της διπλής έλικας. Η κυτταροτοξική δράση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων εμφανίζεται αφού πρώτα αποκτήσουν ενεργή μορφή μετά από ενεργοποίηση από το σύστημα P450 των κυττάρων του ήπατος.

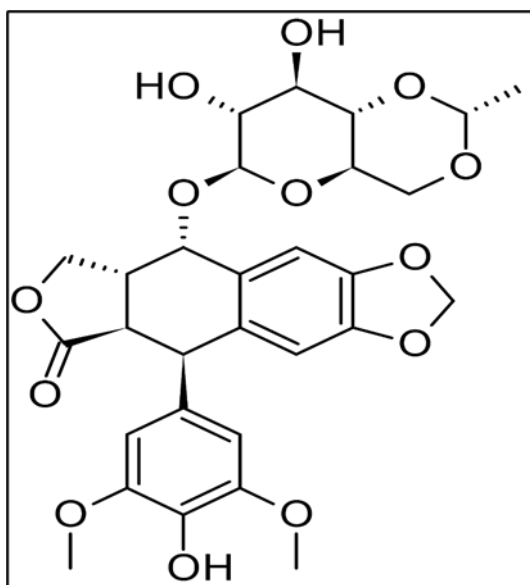
Άλλοι δραστικοί ηλεκτρονιόφιλοι παράγοντες

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως διάφοροι πρωτεϊνικοί και ορμονικοί παράγοντες, οι οποίοι φυσιολογικά επιτελούν θεμελιώδεις ενδοκρινικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία των ιστών και των οργάνων, μπορούν να αποκτήσουν χημικές μορφές που δύναται να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες στο DNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα οιστρογόνα. Τα οιστρογόνα συνιστούν την κύρια μορφή των φυλετικών ορμονών των θηλέων και διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυλετικών χαρακτηριστικών, στην ωρίμανση και την λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων, αλλά και στην εύρυθμη λειτουργία μίας ποικιλίας άλλων ιστών, όπως είναι ο οστίτης ιστός. Είναι στεροειδείς ορμόνες του φύλου και ως εκ τούτου συντίθενται και εκκρίνονται κυρίως από τις ωοθήκες, ωστόσο παράγονται και από περιφερικούς ιστούς, όπως είναι ο λιπώδης ιστός, μέσω της μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα με αρωματοποίηση, αντίδραση που

καταλύεται από το ομόνυμο ένζυμο της αρωματάσης. Ο μεταβολισμός των οιστρογόνων παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλότητα, ωστόσο μία κατηγορία αντιδράσεων δύναται να μετατρέψει τα οιστρογόνα σε κυτταροτοξικές μορφές. Πιο αναλυτικά, μέρος των κυκλοφορούντων οιστρογόνων μετατρέπεται, μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης στην θέση 4 του μορίου των οιστρογόνων, στην δραστική μορφή των κατεχολ-οιστρογόνων. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από το ενζυμικό σύμπλοκο P-450 1B1, το οποίο και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς αλλά κυρίως στους μαστούς. Τα κατεχολ-οιστρογόνα είναι ασταθή μόρια τα οποία, μέσω αντιδράσεων οξειδωσης, γρήγορα μετατρέπονται σε ημικινόνες ή κινόνες. Οι τελευταίες αντιδρούν με τις N3 και N7 θέσεις των πουρινών, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν πηγή ROS. Οι ασταθείς ημικινόνες και κινόνες, μαζί με τις ROS, προκαλούν εκτεταμένες βλάβες και μεταλλάξεις στο μόριο του DNA, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η δημιουργία νουκλεοτιδίων χωρίς αζωτούχο βάση (abasic sites) και η πρόκληση ρηγμάτων στο DNA. Ο ανωτέρω περιγραφόμενος μηχανισμός πρόκλησης μεταλλάξεων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται πως βρίσκεται στην βάση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού πρόκλησης ορμονο-εξαρτώμενων όγκων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται διάφορες μορφές καρκίνου του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη.

Ετοποσίδη (etoposide) και βλάβες στο DNA

Στο σημείο αυτό, θα γίνει εκτενής αναφορά στις μεταλλοξογόνες δράσεις της ετοποσίδης (etoposide), μόριο το οποίο αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η ετοποσίδη είναι ημισυνθετικό παράγωγο της ποδοφυλλοτοξίνης και σήμερα χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ορισμένων νεοπλασιών, διότι παρουσιάζει αντιμιτωτικές ιδιότητες (Εικόνα 12). Η κυριότερη δράση της ετοποσίδης φαίνεται πως είναι η διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, μέσω σχηματισμού θραυσμάτων και στις δύο αλυσίδες του DNA (double-strand breaks, DSBs), φαινόμενο που προκαλείται ύστερα από την αλληλεπίδραση αυτής με τα μόρια της DNA τοποϊσομεράσης II. Παράλληλα, η ετοποσίδη φαίνεται πως επάγει και τον σχηματισμό ROS, προκαλώντας έμμεσα βλάβες στο DNA μέσω των ROS, όπως περιεγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 12. Η μοριακή δομή της ετοποσίδης (τροποποιημένο από: <https://commons.wikimedia.org/>).

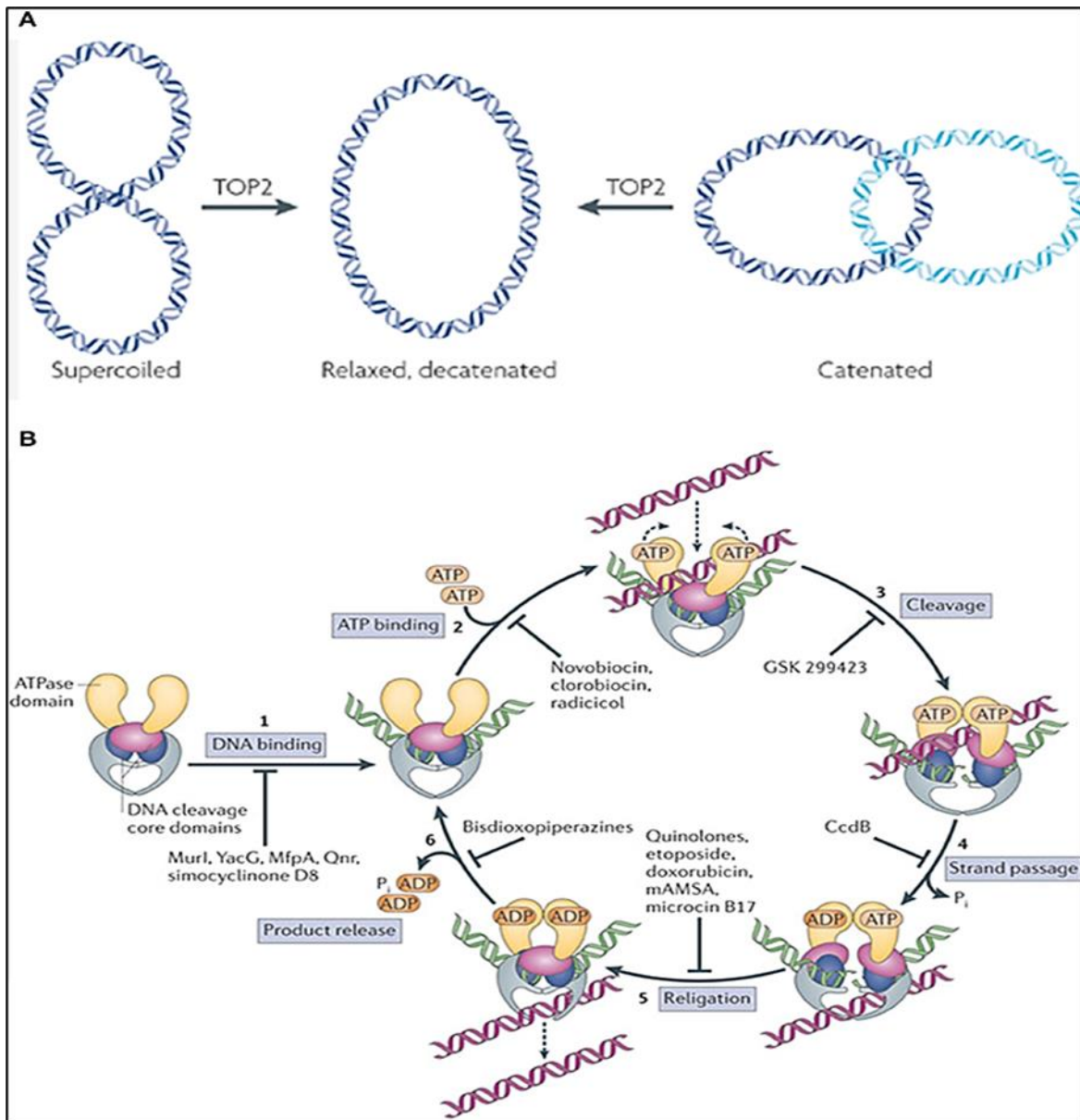
Πιο αναλυτικά, η ετοποσίδη είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διαφόρων τύπων κακοήθειας, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η λευχαιμία, τα λεμφώματα και διάφοροι συμπαγείς όγκοι. Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η αντικαρκινική δράση της ετοποσίδης έγκειται στην ιδιότητά της να προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, μέσω πρόκλησης DSBs στο μόριο του DNA. Ωστόσο, η δράση της δεν είναι στοχευμένη και για αυτόν τον λόγο η αποτελεσματικότητά, αλλά και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με την χρήση της διαφέρουν μεταξύ των ατόμων και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο της κακοήθειας και το εκάστοτε θεραπευτικό σχήμα. Μάλιστα, η επίδρασή της επί του μορίου του DNA είναι τόσο σημαντική που ως παρενέργειες της χρήσης της έχουν καταγραφεί περιστατικά πρόκλησης δευτεροπαθούς λευχαιμίας, τα οποία και οφείλονται στις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που λαμβάνουν χώρα μετά την πρόκληση DSBs από την χορήγηση της ετοποσίδης. Εκτός από την θεραπευτική της αξία, η ετοποσίδη αποτελεί και ένα μόριο ιδιαίτερα χρήσιμο στην ερευνητική προσπάθεια που επιτελείται σήμερα με σκοπό την πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης των DSBs, αλλά και των μηχανισμών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση αυτών. Θα μπορούσαμε να πούμε λοιπόν πως η ετοποσίδη βρίσκεται σήμερα στο επίκεντρο κλινικών μελετών και μελετών βασικής έρευνας, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητά της να προκαλεί DSBs.

Η ετοποσίδη δεν προκαλεί αυτή καθαυτή βλάβες και DSBs στο μόριο του DNA, αλλά αυτό συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής με την DNA τοποϊσομεράση τύπου II (Top2), η οποία αποτελεί τον πρωταρχικό μοριακό στόχο της ετοποσίδης. Η Top2 είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη και λειτουργεί ως ένζυμο του οποίου στόχος είναι η αναδιάταξη της στερεοδιαμόρφωσης του DNA στα σημεία που υπάρχουν υπερ-έλικες. Στα σημεία αυτά καθίσταται αδύνατη η πρόσβαση των ρυθμιστικών και λειτουργικών παραγόντων της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA, οπότε η δράση της Top2 είναι μείζονος σημασίας, καθώς δεν δύναται να εκκινήσουν οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής εάν πρώτα δεν πραγματοποιηθεί αναδιάταξη της στερεοδιαμόρφωσης του DNA στα σημεία που υπάρχουν υπερ-έλικες (Εικόνα 13A). Επιπρόσθετα, η ενζυμική δραστηριότητα της Top2 είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό συζευγμένων αλυσίδων DNA (catenanes), φαινόμενο που δημιουργείται συχνά κατά την αντιγραφή του DNA (Εικόνα 13A). Τα κύτταρα των θηλαστικών και ως εκ τούτου του ανθρώπου, περιέχουν δύο ισομορφές του ενζύμου Top2, την Top2α και την Top2β, οι οποίες και παρουσιάζουν 70% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Μεταξύ αυτών φαίνεται πως κυριαρχεί η Top2α, καθώς εκφράζεται έντονα σε διαιρούμενα και καρκινικά κύτταρα, ενώ περαιτέρω αύξηση της έκφρασής της παρατηρείται κατά τις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου. Από τα ανωτέρω γίνεται αντιληπτό πως ειδικά η Top2α είναι ένα ένζυμο απαραίτητο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς συμμετέχει ενεργά σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται άμεσα με αυτόν, όπως είναι η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA, αλλά και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Σε αντίθεση με την Top2α, η Top2β εκφράζεται εξ ίσου τόσο σε διαιρούμενα, όσο και σε μη-διαιρούμενα κύτταρα. Φαίνεται πως ο ρόλος της δεν είναι τόσο σημαντικός για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά είναι εξαιρετικά σημαντικός για την διαφοροποίηση αυτών και ως εκ τούτου για την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Συνοψίζοντας, τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν πως, από την μία η Top2α είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA και άρα για την επιτυχημένη ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης και από την άλλη η Top2β είναι απαραίτητη, όχι τόσο για την αντιγραφή, αλλά κυρίως για την μεταγραφή του DNA. Ωστόσο, και οι δύο ισομορφές της Top2 ασκούν την ενζυμική τους δράση μέσω ενός κοινού μηχανισμού και ανεξαιρέτως αποτελούν στόχους της ετοποσίδης. Για τον λόγο αυτό και για το υπόλοιπο της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν θα γίνεται αναφορά ειδικά στις Top2α και Top2β, αλλά θα καλούνται από κοινού Top2.

Προκειμένου να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ετοποσίδη προκαλεί DSBs, αξίζει να γίνει αναφορά στον μηχανισμό καταλυτικής δράσης της Top2. Στα σημεία που ανιχνεύονται υπερ-έλικες ή/και σύζευξη των αλυσίδων του DNA (Εικόνα 13A) επιστρατεύεται το ένζυμο της Top2 (catenanes), το οποίο και προσδένεται στο σημείο που υφίσταται η ανώμαλη στερεοδιαμόρφωση του DNA. Μέσω μίας διαδικασίας που απαιτεί την κατανάλωση ATP, κάθε υπομονάδα της Top2 δεσμεύει την μία αλυσίδα του DNA και δημιουργεί DSBs. Καθώς δημιουργείται το DSB, η άλλη αλυσίδα του DNA περνά μέσα από το DSB και κατά αυτόν τον τρόπο αλλάζει η τοπολογία και επιδιορθώνεται η ανώμαλη στερεοδιαμόρφωση του DNA (Εικόνα 13 B). Στο σημείο που η Top2 δημιουργεί το DSB, το 5' άκρο του κομμένου τμήματος βρίσκεται ισχυρά συνδεδεμένο, μέσω ομοιοπολικού δεσμού, με ένα κατάλοιπο τυροσίνης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της κάθε καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου. Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλοκο Top2-κομμένου DNA, το οποίο και καλείται Top2-DNA cleavable complex (Top2cc). Το 3' άκρο συγκρατείται κοντά στο 5' άκρο, ώστε να επιτευχθεί σύνδεση αυτών μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού, αμέσως μόλις η ελεύθερη αλυσίδα διέλθει μέσα από την οπή που έχει σχηματιστεί και το DNA αποκτήσει την σωστή τοπολογία. Με την σύνδεση των 5' και 3' άκρων ολοκληρώνεται ο κύκλος δράσης της Top2 (Εικόνα 13 B).

Αναφορικά με τον ρόλο της ετοποσίδης στην πρόκληση DSB, έχει δειχθεί πως αυτή επιδρά στις καταλυτικές υπομονάδες της Top2 παρεμποδίζοντας την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου στο σημείο όπου σχηματίζεται το Top2cc. Ουσιαστικά, η ετοποσίδη "παγιδεύει" την Top2 στο ενδιάμεσο στάδιο του συμπλόκου Top2cc. Στο στάδιο αυτό η Top2 έχει καταλύσει την αντίδραση θραύσης του DNA, ενώ στο καταλυτικό κέντρο των δύο υπομονάδων της βρίσκεται προσδεδεμένο το 5' άκρο της αλυσίδας του DNA που έχει υποστεί την ρήξη. Ωστόσο, τα δύο άκρα της αλυσίδας του DNA που έχει υποστεί το DSB βρίσκονται, τοπολογικά, το ένα πολύ κοντά στο άλλο, καθώς συγκρατούνται ισχυρά στην θέση αυτή από τα ενεργά κέντρα των καταλυτικών υπομονάδων της Top2 (Εικόνα 13 B). Μόλις πραγματοποιηθεί αποδόμηση της ετοποσίδης τα δύο άκρα του DNA απελευθερώνονται άμεσα. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως όσο διατηρείται το σύμπλοκο Top2cc, οι διπλές ρήξεις που έχουν δημιουργηθεί από την ενζυμική δραστηριότητα της Top2 δεν αναγνωρίζονται, από τους μηχανισμούς ελέγχου βλάβης στο DNA, ως "αληθή" DSBs. Προκειμένου να προκύψουν αληθή DSBs απαιτούνται περαιτέρω κυτταρικές διεργασίες. Παρά το γεγονός πως η κατανόηση των μηχανισμών αυτών είναι εξαιρετικά σημαντική, δεδομένου πως η ετοποσίδη

χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαρκινικό φάρμακο, το έλλειμα γνώσης είναι μεγάλο, καθώς οι μηχανισμοί που μετατρέπουν τα Top2cc σε “αληθινά” DSBs είναι ακόμα εν πολλοίς άγνωστοι και εξαιρετικά δυσνόητοι.



Εικόνα 13. Α) Ενζυμικές δράσεις της Top2, Β) Καταλυτικός κύκλος Top2 και μοριακός μηχανισμός δράσεις αντικαρκινικών φαρμάκων που ονομάζονται από κοινού “αναστολείς της τοποϊσομεράσης”, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και η ετοποσίδη (τροποποιημένο από: Mehta et al. 2013)

Δεδομένα καταδεικνύουν πως ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα Top2cc μετατρέπονται σε “αληθή” DSBs φαίνεται πως βασίζεται στο γεγονός πως τα Top2cc, ως σταθερά σύμπλοκα, δημιουργούν έναν “φραγμό” στους μηχανισμούς αντιγραφής και

μεταγραφής του DNA. Πιο αναλυτικά, έχει παρατηρηθεί πως, κατά την διάρκεια της μεταγραφής, επάγεται η αποδόμηση των Top2ccs. Η αποδόμηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω καταστροφής της Top2 από το σύστημα λιγάσης της ουμπικουιτίνης, όπου η Top2, αφού σημανθεί με τα μόρια της ουμπικουιτίνης, καταστρέφεται από το 26S πρωτεάσωμα. Αν και η σήμανση της Top2 με τα μόρια της ουμπικουιτίνης φαίνεται πως είναι διαδικασία ανεξάρτητη από την μεταγραφή, η αποδόμηση της Top2 από το πρωτεάσωμα φαίνεται πως συνδέεται άμεσα με την μεταγραφή, δεδομένου πως το Top2cc παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση και τα συνοδά ένζυμα στο να ολοκληρώσουν επιτυχώς την μεταγραφή. Μετά την αποδόμηση της Top2 τα δύο άκρα της αλυσίδας του DNA, η οποία είχε υποστεί την δίκλωνη θραύση από τη Top2, απελευθερώνονται. Ωστόσο τα άκρα δεν επανασυνδέονται, δεδομένου πως για την επανένωσή τους απαιτείται η δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού, ο οποίος φυσιολογικά δημιουργείται στο τελευταίο στάδιο του καταλυτικού κύκλου της Top2 και έτσι προκύπτουν "αληθή" DSBs. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε πως η επαγόμενη από την μεταγραφή αποδόμηση της Top2 αποτελεί το βασικό μηχανισμό μετατροπής των Top2cc σε "αληθή" DSBs. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από πειράματα στα οποία η αναστολή, είτε της μεταγραφής, είτε της δράσης του 26S πρωτεασώματος, οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού μετατροπής των επαγόμενων από την ετοποσίδη Top2ccs σε DSBs. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν πως ίσως η ισομορφή Top2β είναι αυτή που πλήττεται περισσότερο από την ετοποσίδη. Έχει όμως παρατηρηθεί πως και οι δύο ισομορφές αποδομούνται ταχύτατα μετά την επίδραση της ετοποσίδης. Μάλιστα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από πειράματα τόσο σε ζωικά μοντέλα, όσο και στον άνθρωπο, ότι η ισομορφή Top2α είναι ο βασικός διαμεσολαβητής της επαγόμενης από την ετοποσίδη κυτταροτοξικότητας. Τα αντικρουόμενα αυτά δεδομένα καταδεικνύουν πως η ετοποσίδη προκαλεί κυτταροτοξικότητα τόσο μέσω της μεταγραφής, όσο και μέσω της αντιγραφής του DNA. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα που δείχνουν πως η ετοποσίδη ασκεί κυτταροτοξική δράση τόσο σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, όσο και σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Μάλιστα φαίνεται πως το μονοπάτι μέσω του οποίου η ετοποσίδη ασκεί εν τέλει την κυτταροτοξική της δράση (δηλαδή εάν η κυτταροτοξικότητα είναι διαμεσολαβούμενη από την αντιγραφή ή την μεταγραφή του DNA) σχετίζεται άμεσα με την συγκέντρωση της ετοποσίδης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται πως η ετοποσίδη ασκεί την κυτταροτοξική της δράση μέσω της αντιγραφής του DNA, πλήττοντας ουσιαστικά μόνο τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, χωρίς να επιδρά σημαντικά στα μη διαιρούμενα κύτταρα. Εν αντιθέσει, σε υψηλές συγκεντρώσεις

η ετοποσίδη ασκεί την κυτταροτοξική της δράση τόσο μέσω της αντιγραφής, όσο και μέσω της μεταγραφής του DNA, προκαλώντας εν τέλει τον θάνατο τόσο των διαιρούμενων, όσο και των μη διαιρούμενων κυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όπως θα αποτυπωθεί στα επόμενα κεφάλαια.

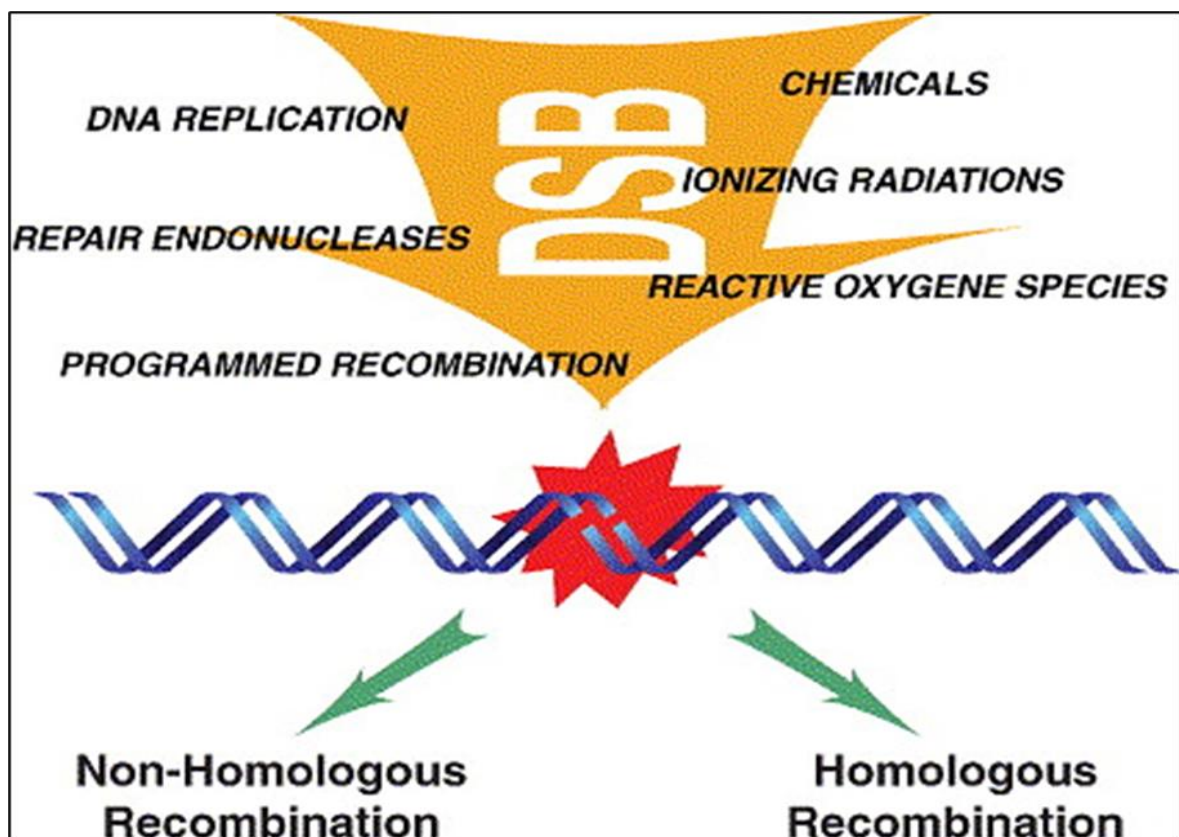
1.2.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλάβης στο DNA

Συνοψίζοντας τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, καθίσταται σαφές πως μία πλειάδα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει πολλές διαφορετικές βλάβες στο μόριο του DNA. Προκειμένου να διατηρηθεί η σταθερότητα του γονιδιώματος, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την εξέλιξη των οργανισμών, καθώς και για την διαιώνιση της γενετικής πληροφορίας, τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών έχουν αναπτύξει μία μεγάλη ποικιλία μηχανισμών για την έγκαιρη αναγνώριση και επιδιόρθωση των βλαβών αυτών. Έτσι έχουν αναπτυχθεί μοριακοί μηχανισμοί για την επιδιόρθωση των λαθών που προκύπτουν κατά την αντιγραφή του DNA, των λανθασμένα ζευγαρωμένων βάσεων του DNA, των βάσεων που έχουν υποστεί απαμίνωση και των νουκλεοτιδίων χωρίς αζωτούχο βάση. Στο πλαίσιο παρουσίασης των μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και για της σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα εστιάσουμε στα δίκλινα ρήγματα της αλυσίδας του DNA (DSBs).

1.2.3 Δίκλινα ρήγματα στην αλυσίδα του DNA (DSBs): Μηχανισμοί πρόκλησης

Τα δίκλινα ρήγματα στην αλυσίδα του DNA (DSBs) συνιστούν μία από τις σοβαρότερες βλάβες που μπορεί να υποστεί το γενετικό υλικό, καθώς προκαλούν άμεσα αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος, δομικά ασταθείς ανακατατάξεις των χρωμοσωμάτων και εν τέλει διατάραξη της αλληλουχίας και της λειτουργικότητας των γονιδίων (Scully et al., 2019). Οι επιπτώσεις των DSBs στην κυτταρική ομοιόσταση, στην λειτουργία των ιστών και των οργάνων και στην ανάπτυξη των οργανισμών είναι εξαιρετικά δυσμενείς. Μελέτες αναφέρουν πως τα DSBs στα κύτταρα της γεννητικής σειράς (germline cells) μπορούν να προκαλέσουν αστάθεια στο γονιδίωμα και ως εκ τούτου η παρουσία τους σχετίζεται με διάφορες μορφές ασθενειών κληρονομικής φύσης, όπως είναι διάφοροι τύποι κακοήθειας, οι διαταραχές της ανάπτυξης και η πρόωρη γήρανση (Scully et al., 2019).

Τα DSBs μπορούν να σχηματιστούν μέσω πολυάριθμων μηχανισμών, στους οποίους βασικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς φυσικοί αλλά και χημικοί παράγοντες (Εικόνα 14). Όπως τονίστηκε οι ROS και το οξειδωτικό stress αποτελούν βασικές αιτίες πρόκλησης DSBs. Επίσης, διάφορες μορφές ακτινοβολίας, αλλά και χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως είναι η ετοποσιδίη, μπορούν άμεσα να πλήξουν την στερεοδιαμόρφωση του DNA προκαλώντας DSBs. Είναι γνωστό πως DSBs μπορούν να σχηματιστούν και κατά την γαμετογένεση και πιο συγκεκριμένα κατά την μείωση, όταν λαμβάνει χώρα ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Διπλά ρήγματα στην αλυσίδα του DNA μπορούν να σχηματιστούν και στο πλαίσιο των ανακατατάξεων που λαμβάνουν χώρα στο γενετικό υλικό, όπως είναι οι ανακατατάξεις των θέσεων των γονιδίων με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης. Επίσης, DSBs δημιουργούνται και κατά την μετακίνηση μεταθετών γενετικών στοιχείων (mobile genetic elements), αλλά και κατά την ενσωμάτωση ετερόλογων τμημάτων γενετικού υλικού επί του γονιδιώματος, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ιϊκών μολύνσεων. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι τα DSBs δεν προκύπτουν μόνο υπό την επίδραση μεταλλαξογόνων παραγόντων, αλλά προκαλούνται και αυθόρμητα, στο πλαίσιο φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών.



Εικόνα 14. Μηχανισμοί πρόκλησης διπλών θραυσμάτων (DSBs) στο DNA (τροποποιημένο από: Bleuyard et al., 2006).

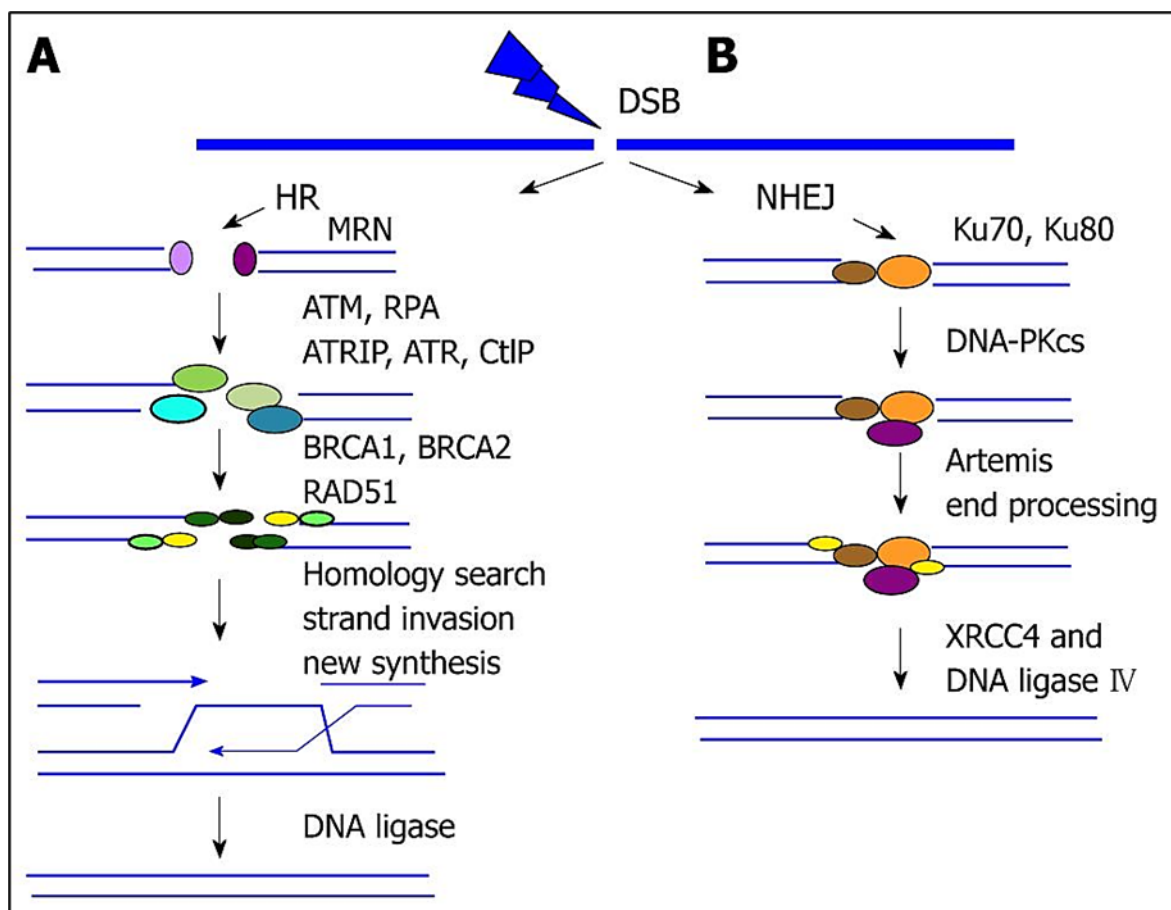
Ανεξάρτητα από την πηγή πρόκλησης, πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως ακόμα και ένα DSB, το οποίο είναι εμμένον και δεν δύναται να επιδιορθωθεί, μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Τα μη επιδιορθωμένα DSBs αποτελούν επίσης την γενεσιουργό αιτία πολυάριθμων άλλων μεταλλάξεων, όπως είναι η απαλοιφή σημαντικών γενετικών τόπων (gene deletion), οι μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων και η απώλεια χρωμοσωμικών τμημάτων και γενικά η πρόκληση αστάθειας στο γονιδίωμα. Γι' αυτό τα DSBs βρίσκονται στην παθοφυσιολογική βάση των μηχανισμών πρόκλησης διαφόρων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος. Επιπρόσθετα, η παρουσία DSBs στα κύτταρα της γενετικής σειράς και στους γαμέτες μπορεί να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό την γονιμοποιητική ικανότητα, την ανάπτυξη του εμβρύου και την έκβαση της κύησης. Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές πως η εξάλειψη της κυτταροτοξικής δράσης των DSBs αποτελεί συνθήκη απαραίτητη για την διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας. Για τον λόγο αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των DSBs, οι οποίοι και θα παρουσιαστούν στην συνέχεια.

1.2.4 Δίκλινα ρήγματα στην αλυσίδα του DNA (DSBs): Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Για την ζωτικής σημασίας επιδιόρθωση των DSBs, απαιτείται πρώτα η έγκαιρη αναγνώριση της βλάβης στο μόριο του DNA. Η βλάβη αναγνωρίζεται έμμεσα, καθώς στα σημεία που υπάρχουν DSBs, η στερεοδιαμόρφωση της χρωματίνης επηρεάζεται σημαντικά. Οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι αυτές που σηματοδοτούν την ύπαρξη DSBs και επάγουν στα σημεία αυτά την επιστράτευση πολυάριθμων μορίων, τα οποία σχηματίζουν μεγαλομοριακά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούν την βάση των μοριακών μηχανισμών επιδιόρθωσης των DSBs.

Πιο αναλυτικά, στα σημεία της βλάβης και σε πρώτη φάση ενεργοποιείται το σύμπλοκο ATM. Όπως παρουσιάστηκε στο υποκεφάλαιο 1.1.2, το σύμπλοκο ATM επιστρατεύεται, μαζί με το σύμπλοκο DNA-PKcs, στα σημεία όπου υπάρχει DSB. Η επιστράτευση αυτή καταλύεται από τα σύμπλοκα MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) και Ku70–Ku80, τα οποία προϋπάρχουν στο σημείο της βλάβης, καθώς είναι τα πρώτα που αναγνωρίζουν αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA. Από την στιγμή της επιστράτευσης και της ενεργοποίησης του συμπλόκου ATM άρχεται ένας καταρράκτης πολύπλοκων μοριακών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από πολυάριθμα σύμπλοκα ρυθμιστικών πρωτεϊνών και ενζύμων. Μεταξύ αυτών των αντιδράσεων

περιλαμβάνονται η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX (H2A histone family member X), η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης από την Poly [ADP-ribose] polymerase (chromatin PARylation), η επιστράτευση της πρωτεΐνης ελέγχου MDC1 (Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1) και τελικώς η επιστράτευση των κεντρικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών 53BP1 (p53-binding protein 1) και BRCA1 (BRCA1 DNA Repair Associated). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες συνιστούν σημαντικά στοιχεία των μηχανισμών αναγνώρισης και επιδιόρθωσης των DSBs και ως εκ τούτου η λειτουργικότητά τους είναι άμεσα συνυφασμένη με την δυναμική επιβίωσης των κυττάρων. Η επιδιόρθωση των DSBs στα κύτταρα των θηλαστικών πραγματοποιείται μέσω πολύπλοκων αλληλεπικαλυπτόμενων μοριακών οδών, οι οποίες παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ των οργανισμών, ενώ ταυτόχρονα σταδιακά εξελίσσονται. Ωστόσο θα μπορούσαμε να διακρίνουμε τις δύο πιο σημαντικές από αυτές, οι οποίες είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination, HR) και η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (non-homologous end joining, NHEJ) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA (double strand breaks) μέσω των οδών: **A.** του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR) και **B.** της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (non-homologous end joining, NHEJ) (τροποποιημένο από: Peng and Lin, 2011).

Όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, οι δύο αυτοί οδοί διαφέρουν αναφορικά με το εάν η επιδιόρθωση των DSBs βασίζεται στην ύπαρξη ενός ομόλογου τμήματος DNA, το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο, ή όχι. Πιο αναλυτικά, στο πλαίσιο της οδού HR, η επιδιόρθωση των DSBs βασίζεται, για το πρότυπο της αλληλουχίας του DNA, στο ομόλογο χρωμόσωμα, το οποίο παρέχει την πληροφορία προκειμένου να επιδιορθωθούν με υψηλή πιστότητα τα τμήματα του DNA που είχαν υποστεί την θραύση. Ως εκ τούτου, και δεδομένου πως η επιδιόρθωση πραγματοποιείται στο πλαίσιο του ανασυνδυασμού του DNA, για την ενεργοποίηση της οδού επιδιόρθωσης με HR απαιτείται να έχει πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του DNA. Ωστόσο, DSBs σχηματίζονται και σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου πριν την αντιγραφή του DNA. Σε αυτήν την περίπτωση η επιδιόρθωση των DSBs μέσω HR είναι αδύνατη, καθώς δεν έχουν σχηματιστεί οι αδελφές χρωματίδες, οι οποίες θα λειτουργούσαν ως εκμαγείο. Σε αυτές τις περιπτώσεις ενεργοποιείται η οδός επιδιόρθωσης NHEJ. Μέσω της οδού NHEJ, τα άκρα του DNA στα οποία υπάρχει DSB προστατεύονται από αποδόμηση, επεξεργάζονται κατάλληλα και τέλος επανασυνδέονται, χωρίς να απαιτείται η ύπαρξη ομόλογης αλληλουχίας DNA για να λειτουργήσει ως εκμαγείο. Βιβλιογραφικά δεδομένα επιβεβαιώνουν πως εξελικτικά, η επιδιόρθωση των DSBs μέσω της οδού HR προϋπήρχε της οδού NHEJ, καθώς στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως ο ζυμομύκητας, η βασική οδός επιδιόρθωσης των DSBs είναι η οδός του HR. Ωστόσο, στα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, η οδός NHEJ συνιστά την κύρια οδό επιδιόρθωσης των DSBs.

1.2.5 Επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA (double strand breaks) μέσω της οδού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR)

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination, HR) συνιστά μία βασική βιολογική διεργασία που καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα. Λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια της μείωσης, όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν, πριν την πρώτη μειωτική διαίρεση. Πρόκειται ουσιαστικά για μία φυσική ανταλλαγή τμημάτων DNA μεταξύ των χρωμοσωμάτων και αποτελεί έναν από τους βασικούς μηχανισμούς δημιουργίας γενετικής ποικιλότητας. Ως εκ τούτου είναι άμεσα συνυφασμένος με την εξέλιξη των ειδών και την διατήρηση της έμβιας ύλης στον πλανήτη. Εκτός όμως από την δημιουργία γενετικής ποικιλότητας, ο HR αποτελεί και έναν από τους βασικούς

μηχανισμούς επιδιόρθωσης των DSBs, καθώς επιτρέπει στα κύτταρα να ανακτήσουν χαμένες αλληλουχίες DNA, μέσω της αντικατάστασης του τμήματος του DNA που έχει υποστεί την βλάβη, από μία ανέπαφη αλυσίδα DNA, η οποία και προέρχεται από το ομόλογο χρωμόσωμα (Li and Heyer, 2008).

Συχνά ο HR ξεκινά από σημεία στα οποία το DNA παρουσιάζει DSBs (Εικόνα 15A). Η οδός επιδιόρθωσης HR αποτελείται από ένα σύνολο επιμέρους μοριακών μηχανισμών (sub-pathways), μέσω των οποίων εξασφαλίζεται πως η αποκατάσταση των DSBs θα πραγματοποιηθεί με υψηλή πιστότητα. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της κλασικής οδού επιδιόρθωσης των DSBs μέσω HR, στις οποίες περιλαμβάνονται η εξαρτώμενη από την σύνθεση ανασύνδεση των αλυσίδων (synthesis-dependent strand annealing, SDSA) και η επαγόμενη από θραύσεις επιδιόρθωση (break-induced repair, BIR). Ωστόσο, η περιγραφή αυτών των παραλλαγών ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας διατριβής και για αυτόν τον λόγο θα πραγματοποιηθεί μόνο μία σύντομη περιγραφή του κλασικής οδού του HR για την επιδιόρθωση των DSBs (Li and Heyer, 2008).

Όπως παρουσιάστηκε πιο πάνω, η αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση της αλυσίδας του DNA στα σημεία των DSBs είναι αυτή που επάγει την ενεργοποίηση της οδού HR στα σημεία αυτά. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω HR ξεκινά με την επιστράτευση του συμπλόκου MRN (MRE11-RAD50-NBS1) στα σημεία της βλάβης. Το εν λόγω σύμπλοκο είναι το πρώτο που αναγνωρίζει τα DSBs και αφού προσδεθεί σε αυτά, επάγει την επιστράτευση των συμπλόκων ATM και TIP60 στα σημεία της βλάβης. Το σύμπλοκο TIP60 ενεργοποιεί το σύμπλοκο ATM, το οποίο με την σειρά του ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την κεντρική ρυθμιστική ιστόνη H2AX. Μετά την φωσφορυλίωσή της η ιστόνη H2AX λειτουργεί ως “αγκυροβόλιο” για την πρόσδεση της πρωτεΐνης ελέγχου MDC1. Η ρυθμιστική πρωτεΐνη MDC1 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από το σύμπλοκο ATM και στην συνέχεια λειτουργεί ως ικρίωμα για την σωστή τοποθέτηση στον χώρο των ενζύμων RNF8 και RNF168, οι οποίες παρουσιάζουν δραστηριότητα E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης. Οι εν λόγω λιγάσες επιδρούν επί της ιστόνης H2AX. Έπειτα από την ουβικιτινίωσή της, η ιστόνη H2AX λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης για τους παράγοντες 53BP1 and BRCA1. Οι παράγοντες αυτοί, μέσω πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων, “ανοίγουν” τον δρόμο για την προσέλευση σημαντικών ενζύμων της οδού HR, όπως είναι το σύμπλοκο RPA (Replication Protein A), το οποίο λειτουργεί ως

“καλύπτρα” και προφυλάσσει από την αποδόμηση τα νουκλεοτίδια στα σημεία των DSBs και του λειτουργικού ενζύμου RAD51, το οποίο ουσιαστικά είναι ο “εκτελεστής” του ομόλογου ανασυνδυασμού για την επιδιόρθωση της βλάβης (Li and Heyer, 2008).

Πιο αναλυτικά, στα σημεία των DSBs η δίκλωνη αλυσίδα του DNA υφίσταται τροποποιήσεις και το πρώτο βήμα του μηχανισμού επιδιόρθωσης HR είναι η αποδόμηση του μορίου του DNA που έχει υποστεί το DSB, με σκοπό να παραχθούν μονόκλωνες προεκτάσεις (single strand DNA-ssDNA), γνωστές ως ουρές ssDNA. Η αποδόμηση αυτή καταλύεται από εξειδικευμένες ενδονουκλεάσες (MRN, CtIP, EXO1, BLM, DNA2), με προσανατολισμό 5'→3'. Με αυτόν τον τρόπο η σπασμένη αλυσίδα καταλήγει να έχει μονόκλινα 3' άκρα, στα σημεία των DSBs. Όπως τονίστηκε ανωτέρω, οι μονόκλωνες 3' ουρές καλύπτονται από το σύμπλοκο RPA και προφυλάσσονται από την αποδόμηση. Στην συνέχεια και μέσω της δράσης ενός περίπλοκου συνόλου πρωτεϊνών, στις οποίες περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες RAD51, BRCA2, PALB2 αλλά και πολλές άλλες, οι μονόκλωνες 3' ουρές “εισβάλλουν” στο ομόλογο ανέπαφο δίκλωνο DNA, δημιουργώντας σχηματισμούς “θηλιάς D” (D-loop). Προκειμένου να ολοκληρωθεί η “εισβολή”, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της πρωτεΐνης RAD51, η οποία και επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών RAD54 and RAD54B. Στο σημείο αυτό η εισβάουσα αλυσίδα, η οποία προέρχεται από την αλυσίδα του DNA που έχει υποστεί το DSB, σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την συμπληρωματική της αλυσίδα, η οποία λειτουργεί ως εκμαγείο και προέρχεται από το ομόλογο χρωμόσωμα. Έτσι σχηματίζεται ένα δίκλωνο τμήμα DNA, το οποίο φέρει αζευγάρωτες βάσεις στο 3' άκρο του (μονόκλωνες 3' ουρές). Οι 3' ουρές λειτουργούν ως εκκινητές (primers) για την σύνθεση του DNA προς αποκατάσταση των DSBs. Έτσι, το DNA πολυμερίζεται στα 3'-OH άκρα των μονόκλωνων τμημάτων, αντίδραση που καταλύεται από τις πολυμεράσες δ, κ και ν. Τέλος, τα τμήματα ενώνονται με την δράση της λιγάσης και το DSB έχει αποκατασταθεί. Ωστόσο, ο ανασυνδυασμός δεν έχει ολοκληρωθεί, καθώς η αλυσίδα που είχε υποστεί το DSB, η αλληλουχία της οποίας έχει πλέον αποκατασταθεί, παραμένει μπλεγμένη σε σχηματισμό D-loop με την ομόλογή της αλυσίδα, η οποία λειτούργησε ως εκμαγείο. Η δομή αυτή καλείται κόμβος Holliday. Οι δύο κόμβοι Holliday, που δημιουργούνται στα ενδιάμεσα στάδια του μηχανισμού επιδιόρθωσης των DSBs μέσω HR, μετακινούνται μέσω του μηχανισμού μετανάστευσης χιάσματος και τελικά διαχωρίζονται σε γειτονικό τμήμα του DNA. Ο HR θεωρείται πως έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς μόλις διαχωριστούν οι κόμβοι Holliday (Li and Heyer, 2008).

1.2.6 Επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA (*double strand brakes*) μέσω της οδού της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (*non-homologous end joining, NHEJ*)

Όπως τονίστηκε παραπάνω, η οδός NHEJ αρχικά εμφανίστηκε στην εξέλιξη ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός επιδιόρθωσης των DSBs, όπου σταδιακά εξελίχθηκε και για τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελεί την κύριο οδό επιδιόρθωσης. Σε αντίθεση με τον HR, η οδός NHEJ δεν περιλαμβάνει εκτεταμένα τμήματα ομόλογων αλληλουχιών. Σε αυτήν την περίπτωση δεν υπάρχει κάποια ομόλογη αλληλουχία, η οποία να λειτουργεί ως εκμαγείο για την επιδιόρθωση της αλυσίδας του DNA που έχει υποστεί την βλάβη. Αντ' αυτού, τα δύο άκρα του DNA που προκύπτουν μετά από ένα DSB συνδέονται μεταξύ τους μέσω αταίριαστης ευθυγράμμισης (*misalignment*) (Εικόνα 15B).

Πιο αναλυτικά, ιδιαίτερα σημαντικά στοιχεία της οδού NHEJ είναι ο παράγοντας 53BP1 και το ετεροδιμερές Ku (Ku70 and Ku80). Από την μία, ο παράγοντας 53BP1 παρουσιάζει ρυθμιστικούς ρόλους και είναι υπεύθυνος για την επιστράτευση ενός μεγάλου αριθμού μοριακών στοιχείων της εν λόγω οδού στην περιοχή της βλάβης, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, εξασφαλίζοντας την συνέχιση αυτού μόνο εφόσον επιδιορθωθεί η βλάβη. Από την άλλη το ετεροδιμερές Ku (Ku70 and Ku80) είναι επί της ουσίας ο πρώτος παράγοντας που ανιχνεύει και προσδένεται στα σημεία των DSBs. Αποτελεί μέσο προστασίας των νουκλεοτιδίων που υπάρχουν στα άκρα του ρήγματος, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως ικρίωμα για την πρόσδεση πολλών στοιχείων του μηχανισμού NHEJ. Έχει προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων και πρωτεϊνών που αποτελούν στοιχεία της οδού και μεσολαβούν την επιδιόρθωση των DSBs μέσω NHEJ στα κύτταρα των θηλαστικών. Τα βασικότερα από αυτά είναι οι πρωτεΐνες DNA-PKcs, Artemis, XRCC4, XLF (XRCC4-like factor) και η λιγάση IV (LIG4). Πρόσφατα δημοσιευμένα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η σειρά δράσης των παραγόντων αυτών εξαρτάται σημαντικά από την βαρύτητα της βλάβης. Για παράδειγμα η επιστράτευση της πρωτεΐνης DNA-PKcs ρυθμίζεται σε σημαντικό βαθμό από την φύση και την θέση του δίκλωνου ρήγματος. Ωστόσο, από την στιγμή της επιστράτευσης της πρωτεΐνης DNA-PKcs και έπειτα, ξεκινά ένας καταρράκτης μοριακών αντιδράσεων, ο οποίος ενεργοποιείται από το ίδιο το διαρρηχθέν DNA. Η ενεργοποιημένη DNA-PKcs ωθεί τον παράγοντα Ku εσωτερικά στην διπλή έλικα που έχει υποστεί την ρήξη, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης πολλά στοιχεία του μονοπατιού NHEJ, τα οποία έχουν επιστρατευτεί γύρω από αυτήν. Είναι δε σε θέση να ενεργοποιεί εκ νέου το ίδιο το μόριό της μέσω αυτό-φωσφορυλίωσης (Chang et al., 2017).

Τα μετέπειτα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο πλαίσιο της επιδιόρθωσης των DSBs μέσω του μονοπατιού NHEJ είναι αρκετά περίπλοκα και η λεπτομερής ανάλυση αυτών ξεφεύγει από τους στόχους της εν λόγω διατριβής. Περιληπτικά θα μπορούσαμε να πούμε πως μετά την ενεργοποίησή της, η κινάση DNA-PKcs σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Artemis. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα εξειδικευμένο ένζυμο, το οποίο παρουσιάζει μοναδικές ιδιότητες. Η Artemis φέρει ιδιότητες τόσο 5', όσο και 3' εξωνουκλεάσης, ενώ παράλληλα είναι και μία λανθάνουσα ενδονουκλεάση. Η Artemis ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την βασική κινάση DNA-PKcs. Μέσω των πολλαπλών της ιδιοτήτων η πρωτεΐνη Artemis επεξεργάζεται κατάλληλα τα άκρα των DSBs, αφαιρώντας ομάδες νουκλεοτιδίων που παρουσιάζουν ανώμαλη στερεοδιαμόρφωση, τα οποία και αποτελούν εμπόδια για την σύνδεση των άκρων των DSBs. Επομένως η Artemis, τροποποιεί, σταθεροποιεί και προετοιμάζει τα άκρα των DSBs για επανασύνδεση. Τέλος, η επανασύνδεση των άκρων των DSBs καταλύεται από την λιγάση IV (LIG4), η οποία δρα σε σύμπλοκο με τους παράγοντες XRCC4 και XLF (XRCC4-like factor). Σε περίπτωση που κατά την επεξεργασία των άκρων των DSBs δημιουργηθούν κενά στην διπλή έλικα, αυτά καλύπτονται από τις DNA πολυμεράσες της οικογένειας X (Chang et al., 2017).

Από τα παραπάνω καθίσταται προφανές πως η αξιοπιστία της επιδιόρθωσης μέσω του μονοπατιού HR είναι υψηλότερη σε σύγκριση με την οδό NHEJ. Εύλογα λοιπόν δημιουργείται ένας προβληματισμός αναφορικά με την σημαντικότητα των δύο οδών επιδιόρθωσης για τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών και δη των θηλαστικών, καθώς σε αυτά το μονοπάτι NHEJ είναι κυρίαρχο. Γιατί οι οργανισμοί που έχουν τόσο πολύπλοκη οργάνωση επιλέγουν ένα λιγότερο αξιόπιστο μονοπάτι για την επιδιόρθωση των DSBs; Είναι προφανές ότι μέσω του NHEJ δύναται να προκύψουν μεταλλάξεις, καθώς στην οδό αυτή η επιδιόρθωση του DNA πραγματοποιείται χωρίς να υπάρχει διαθέσιμη κάποια ομόλογη αλυσίδα, η οποία να λειτουργεί ως εκμαγείο για την πιστή επιδιόρθωση της βλάβης, όπως συμβαίνει στην οδό HR. Παρ' όλα αυτά, η πιθανότητα οι μεταλλάξεις αυτές να προκαλέσουν σοβαρές κυτταρικές βλάβες είναι μικρή, δεδομένου πως τα χαρακτηριστικά του γενετικού κώδικα και η οργάνωση του γονιδιώματος είναι τέτοια που εξασφαλίζεται σε μεγάλο βαθμό πως οι μεταλλάξεις δεν θα επηρεάσουν την κυτταρική λειτουργία. Ακόμα, όμως και στην περίπτωση που οι μεταλλάξεις είναι μείζονος βαρύτητας, οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν την δυνατότητα να "θυσιάζουν" τα μεταλλαγμένα κύτταρα, τα οποία οδηγούνται φυσιολογικά σε

προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Σε κάθε περίπτωση, οι μεταλλοξογόνες συνέπειες της οδού NEJH είναι σημαντικά λιγότερο βλαβερές για το κύτταρο συγκριτικά με τις συνέπειες του να αφηθούν τα DSBs χωρίς επιδιόρθωση. Η οδός NEJH παρουσιάζει εγγενή πλεονεκτήματα για τα κύτταρα των θηλαστικών σε σύγκριση με την οδό HR και σε αυτά συγκαταλέγονται η ταχύτητα εκτέλεσης της επιδιόρθωσης και η δυνατότητα επιδιόρθωσης DSBs πριν την φάση S του κυτταρικού κύκλου (Chang et al., 2017).

Σε αντίθεση με τους πολυκύτταρους οργανισμούς, για τους μονοκύτταρους οργανισμούς η πιστή επιδιόρθωση των DSBs είναι απαραίτητη τόσο για την επιβίωση του οργανισμού (δεδομένου πως ο οργανισμός είναι το ίδιο το κύτταρο), όσο και για την διαίωσιση ακέραιης της γενετικής πληροφορίας στην επόμενη γενεές κυττάρων. Για τον λόγο αυτό ο υψηλής πιστότητας HR θεωρείται ως η οδός εκλογής για την επιδιόρθωση των DSBs στους κατώτερους, μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.3 Ωοκύτταρα, Γεννητικός Κύκλος και Βασικά Στοιχεία Φυσιολογίας του Θήλεος Αναπαραγωγικού Συστήματος

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο και σύνθετο σύστημα οργάνων, ιστών και ενδοκρινών αδένων, το οποίο επιτελεί σημαντικές λειτουργίες απαραίτητες για την επίτευξη, την εγκαθίδρυση και την διατήρηση μίας κύησης. Η αναφορά στις βασικές αρχές λειτουργίας του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την γαμετογένεση, τον καταμήνιο κύκλο και την φυσιολογία του συστήματος, καθώς και των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στην αποδιοργάνωση του συστήματος και εν τέλει σε υπογονιμότητα.

1.3.1 Ωογένεση

Ο όρος ωογένεση περιγράφει τη βιολογική και αναπτυξιακή πορεία σχηματισμού και δημιουργίας ώριμων ωαρίων, όπως καλούνται οι θηλυκοί αναπαραγωγικοί γαμέτες. Παρά το γεγονός πως τόσο τα σπερματοζώαρια, όσο και τα ωάρια προέρχονται εμβρυϊκά από μία κοινή καταβολή βλαστικών κυττάρων, τα οποία καλούνται “προγονικά βλαστικά κύτταρα της γαμετικής σειράς (primordial germ cells, PGCs)”, οι αναπτυξιακές πορείες

του σχηματισμού τους διαφέρουν σημαντικά από το στάδιο του σχηματισμού των σπερματογονίων και των ωογονίων και έπειτα. Τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα του αρρενος (male germ cells) παραμένουν στο στάδιο της μίτωσης στον εμβρυϊκό όρχι έως και την εφηβεία. Από την στιγμή που τα βλαστικά σπερματογόνια αρχίζουν να διαφοροποιούνται και εισέρχονται στην μείωση, ο ανθρώπινος όρχις μπορεί να παράγει εκατομμύρια σπερματοζωάρια καθημερινά και ο κάθε κύκλος σπερματογένεσης έχει διάρκεια περίπου 72 ημέρες. Σε αντίθεση με τα βλαστικά κύτταρα των σπερματοζωαρίων, τα βλαστικά κύτταρα των ωαρίων (female germ cells), τα οποία σε αριθμό προσεγγίζουν τα πέντε εκατομμύρια, διαφοροποιούνται και εισέρχονται στην μείωση στην εμβρυϊκή ωοθήκη. Στην συνέχεια ακολουθεί μείωση του αριθμού των ωογονίων και με την άφιξη της εφηβείας και την εμφάνιση της εμμηναρχής, τα προδρομικά κύτταρα των ωαρίων εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο, ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση και εισέρχονται στην δεύτερη. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται αν και μόνον αν το ωάριο γονιμοποιηθεί από ένα σπερματοζωάριο. Σε αντίθεση με την σπερματογένεση, σε κάθε έμμηνο κύκλο παράγεται και απελευθερώνεται (στις περισσότερες των περιπτώσεων) ένα μόνο ώριμο ωάριο. Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής μίας γυναίκας ο αριθμός των ωαρίων που παράγονται προσεγγίζει τα 456, από την στιγμή της εμμηναρχής, η οποία κατά μέσο όρο συμβαίνει στα 12 έτη, έως και την εμμηνόπαυση, η οποία κατά μέσο όρο εμφανίζεται στα 50 έτη. Σταδιακά λοιπόν, ο αριθμός των διαφοροποιημένων ωογονίων εξαντλείται, καθώς σύμφωνα με το ισχύον μοντέλο, δεν υπάρχουν γαμετικά βλαστικά κύτταρα (female germline stem cells, GSCs) στην ενήλικη ωοθήκη (Jung and Kee, 2015; Muciaccia et al., 2013).

Πιο αναλυτικά, η ωογένεση ξεκινά κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπου τα PGCs δίνουν γένεση στα πρόδρομα βλαστικά κύτταρα των ωοκυττάρων. Τα PGCs εμφανίζονται για πρώτη φορά στην εγγύς επιβλάστη, περίπου κατά την τρίτη εβδομάδα της κύησης (De Felici, 2010; Jung and Kee, 2015). Στην συνέχεια, ο πληθυσμός των PGCs αυξάνεται προοδευτικά μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παράλληλα τα PGCs μεταναστεύουν στην ακρολοφία των γονάδων (gonadal ridges), περί την 4^η – 5^η εβδομάδα της κύησης (Mamsen et al., 2012; Pereda et al., 2006). Η διαφοροποίηση των PGCs σε πρόδρομα γοναδοκύτταρα (gonocytes) λαμβάνει χώρα κατά την 8^η εβδομάδα της κύησης, όπου πρακτικά άρχεται ο καθορισμός του φύλου των γονάδων και αρχίζει η διαφοροποίηση της κοινής γεννητικής καταβολής προς ωοθήκες. Τα στάδια αυτά περιγράφουν τις πρώτες φάσεις την ωογένεσης (Motta et al., 1997).

Όπως τονίστηκε και παραπάνω, η ωογένεση παρουσιάζει πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με την σπερματογένεση, τα οποία την καθιστούν ένα από τα πιο εντυπωσιακά και σπάνια αναπτυξιακά φαινόμενα που παρατηρούνται κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου (Gilbert, 2000). Γιατί όμως να διαφέρουν τόσο πολύ οι δύο αναπτυξιακές διαδικασίες παραγωγής γαμετών μεταξύ άρρενων και θήλεων; Η απάντηση στην συγκεκριμένη ερώτηση δίνεται εάν αναλογιστούμε τον ρόλο των δύο γαμετών κατά την γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη του ζυγωτού. Για την επίτευξη γονιμοποίησης απαιτείται η παρουσία κινητών απλοειδών σπερματοζωαρίων, τα οποία προσεγγίζουν το παθητικά κινούμενο απλοειδές ωάριο, το οποίο και βρίσκεται στις σάλπιγγες. Μετά την γονιμοποίηση και πριν την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος του διπλοειδούς ζυγωτού, η ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου πρέπει να υποστηρίζεται από προϋπάρχοντα βιομόρια, τα οποία και παρέχονται από το γονιμοποιημένο ωάριο. Καθίσταται λοιπόν σαφές πως, σε γενικές γραμμές, ο ρόλος της σπερματογένεσης είναι να παράγει απλοειδείς κινητούς γαμέτες και ο ρόλος της ωογένεσης είναι να παράγει απλοειδείς γαμέτες, οι οποίοι να είναι ικανοί να υποστηρίξουν τις πρώτες τρεις και ιδιαίτερα κρίσιμες ημέρες ζωής του νεοσχηματιζόμενου εμβρύου. Για τον λόγο αυτό, τα ωάρια που προκύπτουν μέσω της ωογένεσης χρειάζεται να διαθέτουν ένα σύνθετο κυτταρόπλασμα ικανό να συντηρήσει το απαιτητικό αναπτυξιακό δυναμικό και τον μεταβολισμό του πρώιμου εμβρύου. Ως εκ τούτου, εκτός από το σχηματισμό ενός απλοειδούς πυρήνα, μέσω της ωογένεσης εξασφαλίζεται πως το ωάριο διαθέτει ένα πλούσιο απόθεμα κυτταροπλασματικών ενζύμων, mRNAs, οργανιδίων και μεταβολικών υποστρωμάτων για το πρώιμο έμβρυο (Trebichalská et al., 2021).

Εξαιτίας του διαφορετικού μοτίβου αναπαραγωγής σε άνδρες και γυναίκες, είναι επακόλουθο πως οι αντίστοιχες διαδικασίες της σπερματογένεσης και της ωογένεσης θα παρουσιάζουν ακόμη περισσότερες διαφορές. Ο περιορισμένος αριθμός ωοκυττάρων που αξιοποιεί μια γυναίκα στην αναπαραγωγική της ζωή έχει ως αποτέλεσμα τα αυτό-ανανεώσιμα βλαστικά γαμετικά κύτταρα που ονομάζονται ωογόνια, να παρουσιάζουν ένα πολύ συγκεκριμένο πρότυπο ανάπτυξης. Έτσι, στο ανθρώπινο έμβρυο, χίλια περίπου ωογόνια διαιρούνται ταχύτατα από τον δεύτερο έως τον έβδομο μήνα της κύησης συνθέτοντας με αυτόν τον τρόπο περίπου επτά εκατομμύρια προδρομικά γαμετικά κύτταρα. Ωστόσο, μετά τον έβδομο μήνα της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ο αριθμός των προδρομικών γαμετικών κυττάρων μειώνεται κατακόρυφα. Τα περισσότερα ωογόνια

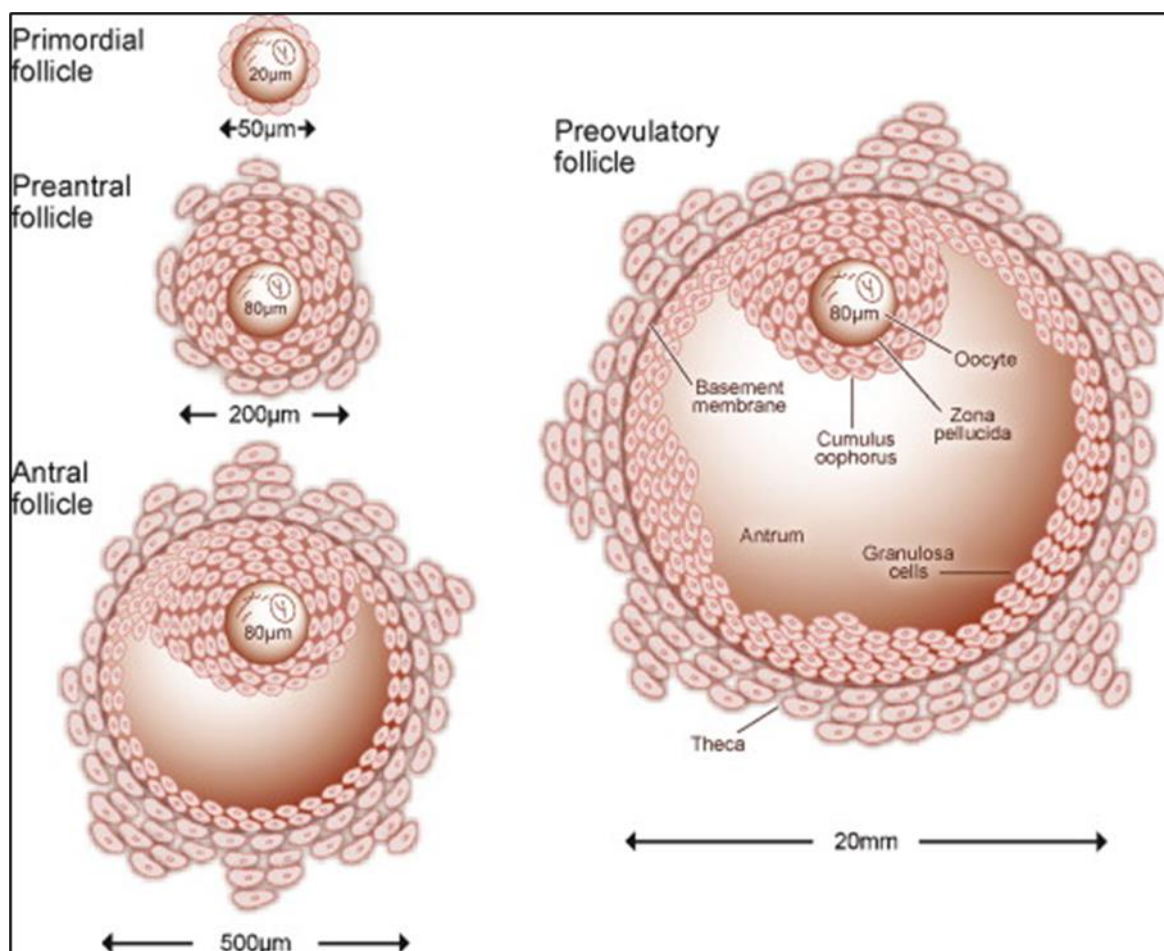
αποπίπτουν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ενώ εκείνα που απομένουν εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση (Gilbert, 2000). Με την έναρξη της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, τα ωογόνα μετονομάζονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα, τα οποία φτάνουν έως το στάδιο της διπλοταινίας και παραμένουν σε αυτό μέχρι και την εφηβεία. Η εμμηναρχή θα σηματοδοτήσει την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης για ομάδες πρωτογενών ωοκυττάρων που σε κάθε καταμήνιο κύκλο στρατολογούνται. Επομένως, στις γυναίκες, η πρώτη μειωτική διαίρεση ξεκινά στην εμβρυική τους ζωή, αλλά το ερέθισμα για την ολοκλήρωσή της δεν δίνεται παρά περίπου 12 χρόνια αργότερα με την έναρξη της εφηβείας. Από τα εκατομμύρια πρωτογενή ωοκύτταρα που υπάρχουν κατά τη γέννηση, μόνο περίπου 400 ωριμάζουν κατά τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας (Brunet and Verlhac, 2011; Gilbert, 2000).

Κατά την διαίρεση του πρωτογενούς ωοκυττάρου, ο πυρήνας του, που ονομάζεται βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle, GV), αποδομείται (germinal vesicle breakdown, GVBD) και η μειωτική άτρακτος μεταναστεύει στην περιφέρεια του κυττάρου. Στη συνέχεια ακολουθεί η 1^η μειωτική διαίρεση και το ωοκύτταρο στο στάδιο αυτό καλείται ωοκύτταρο μετάφασης I (metaphase I, MI). Ως αποτέλεσμα, κατά την τελόφαση, δημιουργείται ένας άνισος διαχωρισμός του μητρικού κυττάρου με αποτέλεσμα το ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν να περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα, ενώ το άλλο κύτταρο περιέχει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρικό περιεχόμενο του πατρικού κυττάρου (Terret and Wassmann, 2008). Το μικρότερο κύτταρο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο, ενώ το μεγαλύτερο κύτταρο αναφέρεται ως δευτερογενές ωοκύτταρο, το οποίο και παραμένει στη μετάφαση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης έως τη γονιμοποίηση. Το ωοκύτταρο στο στάδιο αυτό καλείται ωοκύτταρο μετάφασης II (metaphase II, MII). Κατά τη διάρκεια της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης παρατηρείται ξανά ένας αντίστοιχα άνισος καταμερισμός του κυτταρικού περιεχομένου κατά την κυτταροκίνηση. Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος διατηρείται στο ώριμο ωοκύτταρο, ενώ σχηματίζεται ένα δεύτερο πολικό σωματίο που περιέχει έναν απλοειδή πυρήνα (Miller and Therman, 2001). Η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνον εφόσον επέλθει γονιμοποίηση. Ως εκ τούτου, γίνεται αντιληπτό ότι από τη διαδικασία της ωογένεσης παράγεται ένα ωοκύτταρο που έχει διατηρήσει σχεδόν πλήρως τον όγκο και το περιεχόμενο του κυτταροπλάσματος του αρχέγονου γαμετικού κυττάρου (Gilbert, 2000).

Αναφορικά με την εικόνα των γονάδων, δηλαδή των ωοθηκών, η πλειονότητα του αποθέματος των ωοκυττάρων που διαθέτουν διατηρείται στο στάδιο της διπλοταινίας, στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Κάθε ωοκύτταρο αποτελείται από ένα αρχέγονο θυλάκιο που περιβάλλεται από ένα μονό στρώμα επιθηλιακών κοκκιωδών κυττάρων και ένα λιγότερο καλά οργανωμένο στρώμα μεσεγγυματικών κυττάρων (Baker and Franchi, 1967). Ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο μοτίβο περιοδικότητας, μια ομάδα πρωτογενών ωοθυλακίων εισέρχεται στη φάση της ωοθυλακικής ανάπτυξης σε κάθε καταμήνιο κύκλο. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, παράλληλα με την αύξηση του όγκου των ωοθυλακίων παρατηρείται και αύξηση του αριθμού των κοκκιωδών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν ομόκεντρες στιβάδες γύρω από τα ωοκύτταρα. Αυτός ο πολλαπλασιασμός των κοκκιωδών κυττάρων βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενδοκρινικών, παρακρινικών και αυτοκρινικών παραγόντων (Dong et al., 1996).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των ωοθυλακικών κυττάρων που το περιβάλλουν. Το ωριμάζον ωοκύτταρο συνθέτει παρακρινικούς παράγοντες που επιτρέπουν στα κύτταρα των ωοθυλακίων να πολλαπλασιάζονται, ενώ εκείνα με τη σειρά τους εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης, όπως ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), η λεπτίνη και ο αυξητικός παράγοντας-2 των ινοβλαστών (FGF2), που ρυθμίζουν την περαιτέρω ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων (Antczak et al., 1997). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως η ανάπτυξη των ωοκυττάρων είναι μία πολύπλοκη βιολογική διεργασία, η οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο νευροενδοκρινικών μηχανισμών (Kawamura et al., 2004). Στην κορυφή των νευροενδοκρινικών αυτών μηχανισμών βρίσκεται το σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης, αλλά και ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα, τα οποία συντονίζουν την ενδοκρινική λειτουργία των ωοθηκών με τα αναπτυξιακά στάδια των ωοθυλακίων. Κεντρικοί ρυθμιστές της λειτουργίας των ωοθηκών είναι το νευροπεπτίδιο της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (gonadotropin releasing hormone, GnRH) και οι γοναδοτροπίνες (gonadotropins) (Kawamura et al., 2004). Η GnRH εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, ο οποίος ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα από ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα. Η GnRH με την σειρά της επιδρά στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, τα οποία εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες κατά ώσεις. Το εύρος και η διάρκεια των ώσεων, καθώς και το είδος της εκκρινόμενης γοναδοτροπίνης, καθορίζουν τόσο την ανάπτυξη, όσο και την ενδοκρινική λειτουργία των ωοθηκών (Kawamura et al., 2004).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις ωοθήκες τα ωοθυλάκια βρίσκονται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, είτε πρωτογενή, είτε δευτερογενή, είτε αρχέγονα (Εικόνα 16). Στο αρχέγονο ωοθυλάκιο περιέχεται ένα πρόδρομο ωοκύτταρο με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, καθώς όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα ωοκύτταρα βρίσκονται σε παύση στην διπλοταινία της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Το πρόδρομο αυτό ωοκύτταρο περιβάλλεται από κοκκιώδη κύτταρα και τη βασική μεμβράνη, με τα κοκκιώδη κύτταρα να παραμένουν αδρανή έως και το στάδιο της ωρίμανσης του ωοκυττάρου, όπου από πλακώδη μεταπίπτουν σε κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο αντίστοιχα, περιέχει ένα αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο, τη διάφανη ζώνη που περιβάλλει αυτό το ωοκύτταρο, τη στιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων και τη βασική μεμβράνη περιμετρικά των κοκκιωδών κυττάρων. Το μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου είναι το δευτερογενές. Το δευτερογενές ωοκύτταρο περιλαμβάνει δύο διαφορετικούς πληθυσμούς κοκκιωδών κυττάρων, τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας και τα κύτταρα της έσω και έξω θήκης (Gilbert, 2000). Ο κάθε πληθυσμός εκφράζει διαφορετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Έτσι, τα κοκκιώδη κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) και τα κύτταρα της θήκης υποδοχείς της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone, LH) (Lee et al., 2007). Καθώς η αναπτυξιακή διαδικασία εξελίσσεται, μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων σχηματίζονται και εν συνεχεία ενώνονται για να σχηματίσουν το άντρο, το οποίο συγκεντρώνει στο εσωτερικό του ένα μείγμα πρωτεϊνών, ορμονών και άλλων βιομορίων. Ταυτόχρονα με τον σχηματισμό του άντρου, παύει πλέον η ωρίμανση των ωοθυλακίων να είναι εξαρτώμενη από εξωγενείς ορμονικούς παράγοντες, δηλαδή την FSH και την LH. Τα επόμενα αναπτυξιακά στάδια περιλαμβάνουν την δημιουργία του ωχρού και του λευκού σωματίου. Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωοθυλάκιο κατακλύζεται με έμμορφα συστατικά. Στο τέλος της ωχρινικής φάσης όπου παρατηρείται η πτώση των επιπέδων οιστρογόνων και προγεστερόνης λόγω εκφυλισμού του ωχρού σωματίου, το ωχρό σωματίο ορίζεται πλέον ως λευκό σωματίο, ενώ σε περίπτωση επίτευξης εγκυμοσύνης μετονομάζεται σε ωχρό σωματίο της κύησης (Gilbert, 2000).



Εικόνα 16. Σύνοψη των σταδίων της ωοθυλακικής ανάπτυξης (“Diagnosis and Management of Ovarian Disorders - Second Edition,” n.d.)

1.3.2 Ρύθμιση Καταμήνιου Κύκλου

Ο έμμηνος ή καταμήνιος κύκλος διακρίνεται σε δύο βασικές φάσεις, οι οποίες διακρίνονται μεταξύ τους σε σχέση με τα γεγονότα που αφορούν την ανάπτυξη, την ωρίμανση και απελευθέρωση ενός ώριμου ωαρίου. Η πρώτη φάση καλείται ωοθυλακική ή παραγωγική φάση (follicular phase) και χαρακτηρίζεται από την έντονη εκκριτική δραστηριότητα της υπόφυσης, η οποία απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες FSH. Η έναρξη της ωοθυλακικής φάσης ενός νέου καταμήνιου κύκλου σηματοδοτείται από την έλευση της εμμηνορροσίας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μόνο τα ωοθυλάκια που έχουν φτάσει σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο είναι ικανά να ανταποκριθούν στην παρουσία αυτής της ορμόνης, που θα πυροδοτήσει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που τα δομούν. Η παρουσία FSH επάγει επίσης και την έκφραση των υποδοχέων LH στα κοκκιώδη κύτταρα. Εν συνεχεία, μετά από αυτή την ωοθυλακική φάση

με έντονη την παρουσία της FSH που θα προκαλέσει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, η υπόφυση εκκρίνει LH. Σε απόκριση στην παρουσία της LH, οι πυρηνικές μεμβράνες των ωοκυττάρων καταστρέφονται και το χρωμοσωμικό περιεχόμενο αναδιοργανώνεται για να ολοκληρωθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση. Το ένα σύνολο χρωμοσωμάτων διατηρείται μέσα στο ωοκύτταρο και το άλλο καταλήγει στο μικρό πολικό σωματίο. Και τα δύο περικλείονται από τη διάφανη ζώνη, και πλέον η ωορρηξία είναι σε θέση να πραγματοποιηθεί (Holesh et al., 2021).

Η δράση της FSH και της LH έχει ως αποτέλεσμα τα ωοθυλακικά κύτταρα να παράγουν αυξημένες ποσότητες οιστρογόνων, τα οποία διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην περαιτέρω ρύθμιση της εξελικτικής πορείας του έμμηνου κύκλου. Τα οιστρογόνα, αρχικά, προκαλούν έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο ενδομήτριο, το οποίο ταυτόχρονα εμπλουτίζεται με αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, προκαλούν αραίωση του ιξώδους της τραχηλικής βλέννης, διευκολύνοντας τη δίοδο των σπερματοζωαρίων στην αναπαραγωγική οδό έως το σημείο της γονιμοποίησης. Η παρουσία οιστρογόνων προκαλεί αύξηση του αριθμού των υποδοχέων FSH στα κοκκιώδη κύτταρα των ώριμων ωοθυλακίων, ενώ η δράση τους στην υπόφυση οδηγεί στη μείωση της παραγωγής της FSH. Διεγείρει επίσης τα κοκκιώδη κύτταρα για να εκκρίνουν την πεπτιδική ορμόνη ινχιμίνη, η οποία καταστέλλει περαιτέρω την έκκριση της FSH από την υπόφυση. Όπως έχει αποδειχθεί, σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα οιστρογόνα αναστέλλουν την παραγωγή LH, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι ικανά να την διεγείρουν (Gilbert, 2000; Kammerman and Ross, 1975; Woodruff et al., 1988).

Η αλληλεπίδραση της LH με τους υποδοχείς της στα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων προκαλεί την σύνθεση ανδρογόνων, μια διαδικασία που ονομάζεται στεροειδογένεση. Παράλληλα, η δράση της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα εξασφαλίζει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα μέσω του ενζύμου της αρωματάσης και μιας διαδικασίας που ονομάζεται αρωματοποίηση (Nelson and Bulun, 2001). Τα επίπεδα της LH συνεχίζουν να αυξάνονται, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των οιστρογόνων. Καθώς τα οιστρογόνα συνεχίζουν να παράγονται από την 7η έως την 10η ημέρα του κύκλου, τα κοκκιώδη κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Από την 10η ημέρα, η έκκριση οιστρογόνων αυξάνεται κατακόρυφα. Αυτή η αύξηση ακολουθείται στα μέσα του κύκλου από μια τεράστια αύξηση της LH και μια μικρότερη έκρηξη της FSH (Gilbert, 2000).

Αν και ο λεπτομερής μηχανισμός της ωορρηξίας δεν είναι ακόμη γνωστός, η απελευθέρωση του ώριμου ωοκυττάρου από το ωοθυλάκιο φαίνεται να οφείλεται σε αύξηση των επιπέδων ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, της κολλαγενάσης, που προκαλείται από την αιχμή της LH. Η κολλαγενάση είναι ένας ενεργοποιητής του πλασμινογόνου και των προσταγλανδινών εντός του ωοθυλακίου. Το mRNA για την έκφραση αυτού του ενζύμου παραμένει αδρανές στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων αναμένοντας την αιχμή της LH, η οποία θα προκαλέσει πολυαδενυλίωση, ενεργοποίηση και κατά συνέπεια έκφραση αυτού (Huarte et al., 1987). Ζωτικός θεωρείται και ο ρόλος των προσταγλανδινών στο φαινόμενο της ωορρηξίας. Οι προσταγλαδίνες προκαλούν συστολή των λείων μυϊκών ινών των ωοθηκών, ενώ παράλληλα επάγουν τη ροή του νερού από τα ωοθηκικά τριχοειδή, αυξάνοντας την πίεση του υγρού στο άντρο (Caldwell et al., 1973; Koos and Clark, 1982; Sugimoto et al., 2015). Εν ολίγοις, η αιχμή της LH οδηγεί σε αύξηση της πίεσης εντός του ωοθυλακίου με παράλληλη αποδόμηση του τοιχώματος των ωοθυλακίων, γεγονός που επάγουν την απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου και την ολοκλήρωση της ωοθυλακιωρρηξίας. Λίγο πριν την ωοθυλακιωρρηξία, τα κοκκιώδη κύτταρα του κυρίαρχου ωοθυλακίου παράγουν υψηλά επίπεδα οιστρογόνων που φτάνουν το μέγιστο της συγκέντρωσής του 24-36 ώρες πριν την ωοθυλακιωρρηξία. Σε αυτό το χρονικό σημείο, ολοκληρώνεται η πρώτη μειωτική διαίρεση που βρισκόταν σε παύση και παρατηρείται πλέον έκφραση των υποδοχέων της LH όχι μόνο στα κύτταρα της θήκης, αλλά και στα κοκκιώδη κύτταρα (Holesh et al., 2021).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκκίνηση της ωοθυλακιωρρηξίας αποτελεί η αιχμή της τιμής της LH. Ουσιαστικά η σταδιακή αύξηση των οιστρογόνων στην πρώτη φάση του κύκλου, επιδρά στην υπόφυση με θετική ανατροφοδότηση και προκαλεί αύξηση των υποδοχέων της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (gonadotropin-releasing hormone, GnRH). Έτσι, 12-14 ώρες μετά την αιχμή της LH παρατηρείται η ωοθυλακιωρρηξία, εντούτοις η δράση της στα κοκκιώδη κύτταρα έχει ξεκινήσει 48 ώρες πριν την αιχμή της, διεγείροντας την απελευθέρωση προγεστερόνης από αυτά. Παρότι η ωοθυλακική φάση του κύκλου είναι η χαρακτηριστική περίοδος αύξησης των επιπέδων της προγεστερόνης, 12-24 ώρες πριν την ωοθυλακιωρρηξία αυξάνεται επίσης σημαντικά (Holesh et al., 2021; Su et al., 2017).

Σε κάθε έμμηνο κύκλο, επιστρατεύονται μερικά ωοθυλάκια για να ωριμάσουν, ένα όμως από αυτά, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, θα υποστεί ωοθυλακιωρρηξία. Η επιλογή αυτού του κυρίαρχου ωοθυλακίου αποτελεί ένα περίπλοκο φαινόμενο της φυσιολογίας της

αναπαραγωγής. Μια έως δύο μέρες πριν το τέλος ενός έμμηνου κύκλου παρατηρείται αύξηση της FSH, μια κατάσταση που ονομάζεται “παράθυρο της FSH” που έχει σαν αποτέλεσμα να ωθεί ένα πεπερασμένο αριθμό ωοθυλακίων να προχωρήσουν στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Σε αυτή τη φάση, έχει προταθεί πως το ωοθυλάκιο το οποίο θα συνθέτει μέσω της αρωματοποίησης των ανδρογόνων των κυττάρων της θήκης του τα περισσότερα οιστρογόνα, είναι παράλληλα και εκείνο με τους περισσότερους υποδοχείς FSH, καθιστώντας το ικανό να γίνει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Όλη η διαδικασία έως την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου διαρκεί έως και την 5^η-7^η ημέρα του κύκλου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι υπεύθυνη για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου και την διάσωσή του από μια πιθανή ατρησία δεν είναι μόνο η FSH, αλλά και ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας -1 (IGF-1). Όταν ολοκληρωθεί η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων που απελευθερώνονται από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, μέσω αρνητικής ανάδρασης, προκαλούν μείωση στην εκκρινόμενη ποσότητα γοναδοτροπινών από την υπόφυση, με αποτέλεσμα την μείωση της FSH. Αυτή η πτώση των επιπέδων της FSH είναι ζωτική σε αυτό το σημείο ώστε τα ωοθυλάκια που δεν κατάφεραν να γίνουν κυρίαρχα, να καταστραφούν με ατρησία. Εντούτοις, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ανταπεξέρχεται ακόμα και στα μειωμένα επίπεδα FSH λόγω της πληθώρας των υποδοχέων που διαθέτει στην επιφάνειά του. Στην υπόλοιπη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, το οποίο ουσιαστικά αποτελεί ένα δευτερογενές ωοθυλάκιο, έχει την τάση να συσσωρεύει ωοθυλακικό υγρό στην κοιλότητα του άντρου του και έτσι να οδηγείται σε μια εντυπωσιακή και απότομη αύξηση της διαμέτρου (Gilbert, 2000; Holesh et al., 2021).

Η ωορρηξία σηματοδοτεί την έναρξη της ωχρινικής φάσης που αποτελεί τη δεύτερη και τελευταία φάση του έμμηνου κύκλου. Τα υπόλοιπα κύτταρα του διαρρηγμένου ωοθυλακίου, υπό τη συνεχή επίδραση της LH, μετατρέπονται στο ωχρό σωματίο. Τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να ανταποκριθούν στην παρουσία της LH, επειδή η αύξηση της FSH πυροδοτεί την έκφραση περισσότερων υποδοχέων LH σε αυτά. Το ωχρό σωματίο είναι υπεύθυνο για την έκκριση των οιστρογόνων, αλλά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος τους στην έκκριση προγεστερόνης. Η προγεστερόνη αποτελεί μια στεροειδής ορμόνη, κύριος ρόλος της οποίας είναι η προετοιμασία του ενδομητρίου για την εμφύτευση της βλαστοκύστης μέσω διέγερσης και πάχυνσης του τοιχώματος της μήτρας και των αιμοφόρων αγγείων. Η προγεστερόνη αναστέλλει, επίσης, την παραγωγή FSH, εμποδίζοντας έτσι την ωρίμανση των ωοθυλακίων. Εάν το ωοκύτταρο

δεν γονιμοποιηθεί, το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται, η έκκριση προγεστερόνης σταματά και το τοίχωμα της μήτρας αποβάλλεται. Με τη μείωση των επιπέδων προγεστερόνης στον ορό, η υπόφυση εκκρίνει ξανά FSH και ο κύκλος ανανεώνεται. Ωστόσο, εάν συμβεί γονιμοποίηση, η τροφοβλάστη που αναπτύσσεται επιδρά μέσω ορμονικών σημάτων στο ωχρό σωματίο, το οποίο παραμένει ενεργό και τα επίπεδα προγεστερόνης στον ορό διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα, προκειμένου να υποστηρίξουν την αρχόμενη κύηση. Με αυτό τον τρόπο, συνοπτικά, ο έμμηνος κύκλος επιτρέπει την περιοδική ωρίμανση και απελευθέρωση των ωοκυττάρων (Gilbert, 2000; Jones, 1991; Messinis et al., 2009; Sonntag and Ludwig, 2012).

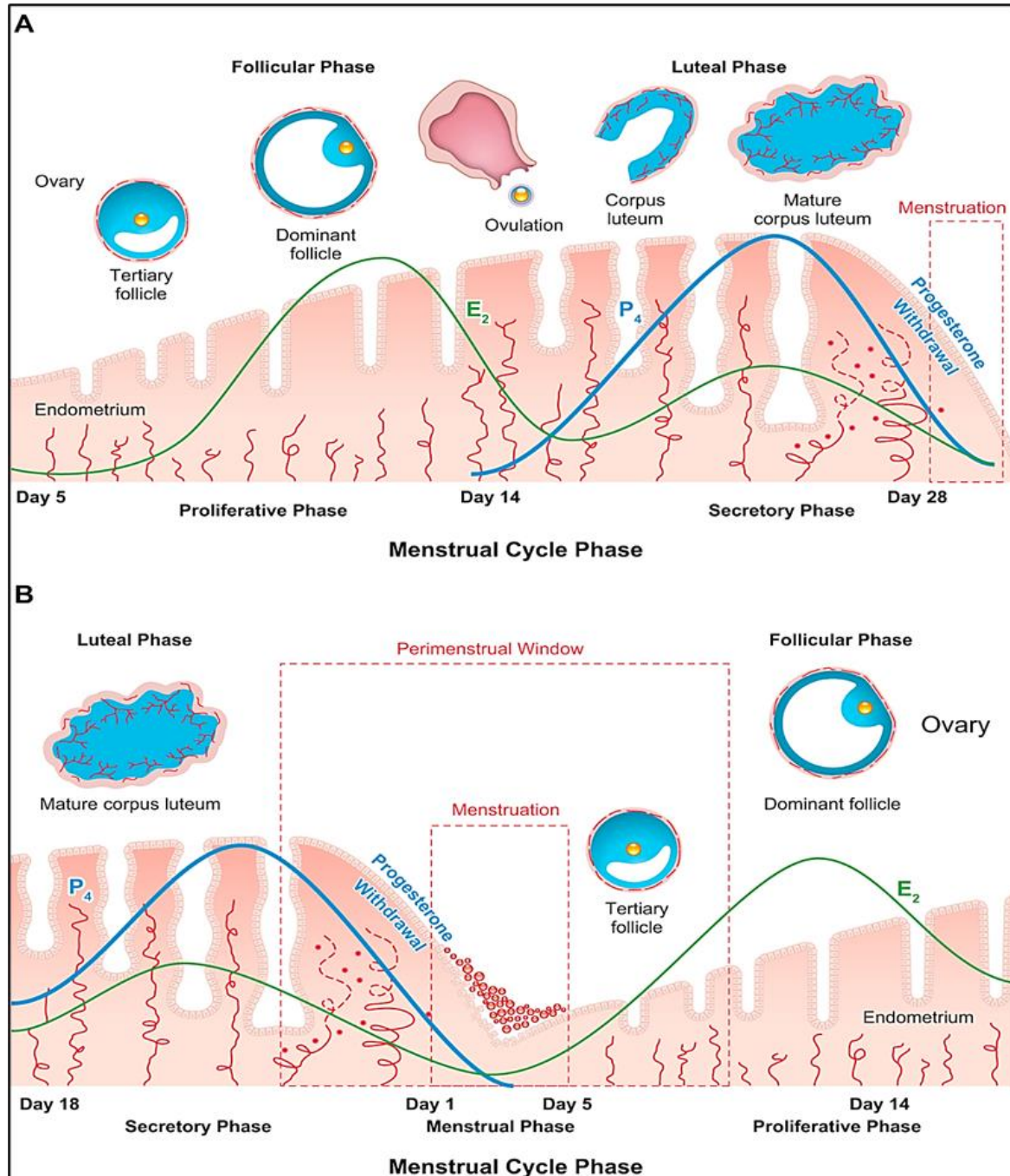
1.3.3 Βασικές Αρχές Φυσιολογίας του Θήλεος Αναπαραγωγικού Συστήματος

Το σύνολο των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα έχουν ως στόχο την επίτευξη, την διατήρηση και την επιτυχή έκβαση μία εγκυμοσύνης. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις βιολογικές αυτές διεργασίες διαδραματίζει το ενδομήτριο. Το ενδομήτριο, που ουσιαστικά αποτελεί την επένδυση της μήτρας, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναπαραγωγή και τη διατήρηση του ανθρώπινου είδους και οι λειτουργίες του ελέγχονται από πολύπλοκα ενδοκρινικά σήματα (Critchley et al., 2020; Diedrich et al., 2007). Το ενδομήτριο είναι ένας σύνθετος πολυκυτταρικός ιστός που αποτελεί στόχο μίας πλειάδας στεροειδών ορμονών και υφίσταται περιοδικές μεταβολές στην δομή, την οργάνωση και την λειτουργία του, ανάλογα με την φάση του καταμήνιου κύκλου. Το τελικό αποτέλεσμα των διεργασιών αυτών επί απουσίας εγκυμοσύνης είναι η απόπτωση της εξωτερικής του στιβάδας. Εν συνεχεία, επιδιορθώνεται άμεσα χωρίς υπολειμματικές ουλές ή απώλεια λειτουργίας, ώστε να εκκινήσει ξανά ο επόμενος κύκλος. Η επιδιόρθωση του ενδομητρίου, μετά την αποβολή του, περιλαμβάνει τον περιορισμό της φλεγμονής, την αγγειογένεση και την ανάπλαση του επιθηλίου (Maybin and Critchley, 2009). Οι κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στο ενδομήτριο περιλαμβάνουν στρωματικά, επιθηλιακά, αγγειακά κύτταρα, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο δυναμικός διάλογος μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων επιτυγχάνεται μέσω πολύπλοκων ενδοκρινικών, αυτοκρινικών και παρακρινικών σημάτων και είναι απαραίτητος για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική αποβολή του ενδομητρίου και η επακόλουθη αναγέννηση του επιθηλίου, δηλαδή επιδιόρθωση της τραυματισμένης επιφάνειας του βλεννογόνου (Kayisli et al., 2004).

Ιστολογικά, το ενδομήτριο αποτελείται από μία μονή επιθηλιακή, στιβάδα η οποία περιβάλλει ένα πολύπλοκο στρώμα κυττάρων. Το στρώμα φιλοξενεί κυτταρικά στοιχεία συνδετικού ιστού, καθώς και στρωματικά κύτταρα (ινοβλάστες), ενώ περιέχει και σωληνοειδείς αδένες που γειτνιάζουν με την επιφάνεια του αυλού, σπειροειδείς αρτηρίες και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Noyes et al., 2019). Επιπρόσθετα, δεδομένα δείχνουν πως στο ενδομήτριο υπάρχουν πληθυσμοί ενήλικων βλαστικών κυττάρων (Gargett and Masuda, 2010). Τα βλαστικά αυτά κύτταρα του ενδομητρίου μπορούν να διαφοροποιηθούν σε στρωματικά και επιθηλιακά κύτταρα και να συμβάλλουν στην αποτελεσματική αντικατάσταση και διατήρηση της ακεραιότητας του ενδομητρίου που απαιτείται μετά την έμμηνο ρύση. Στον άνθρωπο τα βλαστικά αυτά κύτταρα εντοπίζονται στην βασική στιβάδα του ενδομητρίου (Santamaria et al., 2018). Επιπλέον, τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου αποτελούν τον κύριο στόχο της προγεστερόνης.

Κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, το ενδομήτριο εκτίθεται σε συγκεκριμένα μοτίβα κυκλοφορούντων στεροειδών ορμονών που παράγονται στις ωοθήκες. Η αλληλεπίδραση αυτών των ορμονών με το ενδομήτριο είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής του. Κύριοι πρωταγωνιστές στην προετοιμασία του ενδομητρίου για την επίτευξη εμφύτευσης είναι η 17β-οιστραδιόλη και η προγεστερόνη, οι συγκεντρώσεις των οποίων παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου (Critchley et al., 2020). Στο ενδομήτριο περιβάλλον κυριαρχεί αρχικά η οιστραδιόλη, κατά την πρώιμη παραγωγική φάση του έμμηνου κύκλου. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης του ενδομητρίου, τα κύτταρα υφίστανται έντονο πολλαπλασιασμό. Η πολλαπλασιαστική φάση του κύκλου του ενδομητρίου αντιστοιχεί στην ωοθυλακική φάση των ωοθηκών, ενώ η εκκριτική φάση αντιστοιχεί στην ωχρινική φάση των ωοθηκών (Corner and Allen, 2005; Noyes et al., 2019). Κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης, το ενδομήτριο υφίσταται υπερτροφία, δηλαδή παύει ο πολλαπλασιασμός και παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Παράλληλα, αυξάνεται σημαντικά η αγγείωση. Το σύνολο των μεταβολών που υφίσταται το ενδομήτριο κατά την εκκριτική φάση καλείται φθαρτοποίηση (decidualization) και η κυρίαρχη ορμόνη που ρυθμίζει την διαδικασία αυτή είναι η προγεστερόνη (Corner and Allen, 2005; Csapo and Pulkkinen, 1978; Noyes et al., 2019). Συνοπτικά, οι διαδοχικές φάσεις του έμμηνου κύκλου για τα ωοθυλάκια και το ενδομήτριο παρουσιάζονται στην Εικόνα 17. Αυτές οι λειτουργικά διακριτές φάσεις του έμμηνου κύκλου είναι κρίσιμες για

τον συγχρονισμό του ενδομητρίου με την ωρίμανση των ωοκυττάρων, τη γονιμοποίηση και την εμφύτευση του εμβρύου στο μέσο περίπου της εκκριτικής φάσης, όταν η δεκτικότητα του ενδομητρίου είναι συνήθως μέγιστη (Critchley et al., 2020).

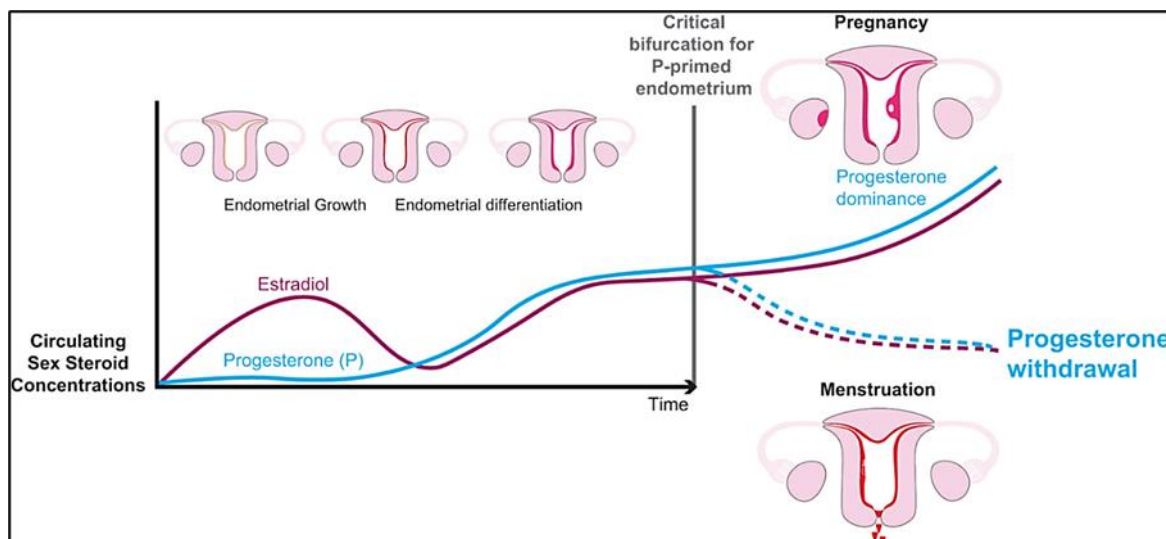


Εικόνα 17. Συνοπτικό διάγραμμα του έμμηνου κύκλου. **A:** η οιστραδιόλη είναι η κυρίαρχη ορμόνη που δρα στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης. Στην εκκριτική φάση μετά την ωορρηξία, το ωχρό σωματίο εκκρίνει προγεστερόνη. **B:** παράθυρο μετάβασης από την ωχρινική φάση του προηγούμενου κύκλου στην ωοθυλακική φάση του επόμενου έμμηνου κύκλου (Critchley et al., 2020).

Η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου περιγράφει μια διαδικασία μετασχηματισμού των κυττάρων του στρώματος του ενδομητρίου σε εξειδικευμένα εκκριτικά κύτταρα που παρέχουν το απαραίτητο υπόστρωμα για την εμφύτευση του εμβρύου και την περαιτέρω ανάπτυξη του πλακούντα (Gellersen and Brosens, 2014). Πρόκειται για μια διαδικασία που περιλαμβάνει τροποποίηση της μορφολογίας των κυττάρων του στρώματος από επιμήκη κύτταρα σε στρογγυλά κύτταρα, με επαγωγή της έκφρασης πληθώρας πρωτεϊνών λόγω την παρουσίας της προγεστερόνης. Αυτά τα πρωτεϊνικά στοιχεία συμπεριλαμβάνουν την προλακτίνη, το γλυκογόνο, τον ιστικό παράγοντα, τον παράγοντα πρόσδεσης του IGF-1 (IGF-BP1) και τον μεταγραφικό παράγοντα Forkhead box O1 (FOXO1) (Brighton et al., 2017; Brosens et al., 1999; Dunn et al., 2003; Lockwood et al., 2007; Schatz et al., 2016). Η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου πυροδοτείται από την ενδοκυττάρια παραγωγή κυκλικού AMP στα περι-αγγειακά στρωματικά κύτταρα (Brosens, 1999). Στην ανθρώπινη φυσιολογία, η φθαρτοποίηση αποτελεί μια ανεξάρτητη από την επαφή εμβρύου/ενδομητρίου διαδικασία και συνεπώς συμβαίνει αυθόρμητα σε συνθήκες έκθεσης σε προγεστερόνη (Suhorutshenko et al., 2018). Η φθαρτοποίηση φαίνεται να αποτελεί προϋπόθεση για την έλευση της εμμήνου ρύσεως σε κάθε καταμήνιο κύκλο που δεν επετεύχθη εγκυμοσύνη. Διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εισβολή της τροφοβλάστης που λαμβάνει χώρα κατά την εμφύτευση (Finn, 1996; Huang et al., 2019).

Οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας οιστραδιόλης μειώνονται στο τέλος της εκκριτικής φάσης, εν μέρει ως συνέπεια της δράσης της προγεστερόνης. Η προγεστερόνη μειώνει την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και έτσι αναστέλλει περαιτέρω τις δράσεις της οιστραδιόλης (Tseng and Gurpide, 1975). Η απουσία εγκυμοσύνης οδηγεί σε παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου και σε μια επακόλουθη απότομη πτώση στα επίπεδα της κυκλοφορούσας προγεστερόνης και οιστραδιόλης (Csapo and Resch, 1979). Η μείωση της οιστραδιόλης και ιδιαίτερα της προγεστερόνης (Εικόνα 18), πυροδοτούν την έναρξη της εμμήνου ρύσεως κατά την οποία το ανώτερο, λειτουργικό στρώμα του ενδομητρίου αποβάλλεται και στη συνέχεια αποκαθίσταται (Critchley et al., 2020). Αυτή η μείωση της προγεστερόνης προκαλεί ορισμένες μορφολογικές αλλαγές στο ενδομήτριο που συμπεριλαμβάνουν οίδημα, αυξημένη ροή αίματος, αύξηση διαπερατότητας αγγείων και ευθραυστότητα (Finn, 1986; Garry et al., 2010; Roberts et al., 1992), καθώς και την μετανάστευση μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων (Dunn et al., 2003, p. 200; Jabbour et al., 2006). Όπως έχει εύστοχα διατυπωθεί, η έμμηνος ρύση είναι ένα φλεγμονώδες συμβάν συνοδευόμενο από τα χαρακτηριστικά της κλασικής φλεγμονής (Finn, 1986). Στην

περίπτωση επίτευξης εγκυμοσύνης, το ωχρό σωματίο, που πλέον καλείται ωχρό σωματίο της κήσης, διατηρεί την λειτουργικότητά του και παράγει προγεστερόνη σε υψηλά επίπεδα, η οποία είναι απαραίτητη για την εμφύτευση και την λειτουργικότητα της τροφοβλάστης. Το ωχρό σωματίο παραμένει η κύρια πηγή παραγωγής της προγεστερόνης, έως ότου σχηματιστεί ο πλακούντας, ο οποίος και αναλαμβάνει στη συνέχεια την έκκριση έως και την ολοκλήρωση της κύησης. Σημαντικά μοριακά και κυτταρικά γεγονότα συνοδεύουν τις μορφολογικές αλλαγές στο ενδομήτριο. Αυτές περιλαμβάνουν την τοπική ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών της μήτρας (matrix metalloproteinases, MMPs) (Gaide Chevonnay et al., 2009), την αυξημένη τοπική έκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) (Jones et al., 1997), τη σύνθεση κυτταροκινών/χημειοκινών όπως η ιντερλευκίνη IL-8 (Critchley et al., 1999) και την αύξηση της τοπικής σύνθεσης προσταγλαδινών στο ενδομήτριο (Smith et al., 2007).



Εικόνα 18. Περιγραφή της εναλλαγής των συγκεντρώσεων των δύο κύριων στεροειδών ορμονών του φύλου, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, στο πλαίσιο των διαφορετικών φάσεων του καταμήνιου κύκλου (Critchley et al., 2020).

1.4 Υπογονιμότητα και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Οι όροι “γονιμότητα” και “υπογονιμότητα” αποτελούν δύο σύνθετες έννοιες, οι οποίες έχουν διατυπωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία με πολλαπλούς ορισμούς, καθώς πρόκειται για καταστάσεις (conditions) που παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία στον γενικό πληθυσμό. Σύμφωνα με τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ορισμό, ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζεύγους να επιτύχει κλινική εγκυμοσύνη μετά από έναν χρόνο

ελεύθερων και τακτικών σεξουαλικών επαφών, όταν η ηλικία της υποψήφιας μητέρας είναι μικρότερη των 35 ετών, ενώ το χρονικό διάστημα του ενός έτους μειώνεται στους έξι μήνες, όταν η ηλικία της γυναίκας είναι μεγαλύτερη των 35 ετών (Zegers-Hochschild et al., 2017). Στην περίπτωση όπου το ζεύγος δεν έχει επιτύχει κλινική κύηση στα ανωτέρω περιγραφόμενα χρονικά διαστήματα, τότε εξ ορισμού είναι υπογόνιμο και χρίζει διερεύνησης για την εύρεση του αιτίου υπογονιμότητας. Παρά ταύτα, η υπογονιμότητα μπορεί να οριστεί και ως η κατάσταση ενός ατόμου του οποίου το αναπαραγωγικό δυναμικό έχει αποδεδειγμένα διαταραχθεί για διάφορους λόγους και στην περίπτωση αυτή δεν απαιτείται η παρέλευση του χρόνου του ενός έτους προκειμένου το άτομο να θεωρηθεί πως αντιμετωπίζει προβλήματα γονιμότητας (Vander Borgh and Wyns, 2018). Η σπουδαιότητα και σημασία του σωστού ορισμού έγκειται στο γεγονός ότι η κατάλληλη διαχείριση των αναπαραγωγικών διαταραχών απαιτεί τη σωστή διάγνωση και ταυτοποίηση αυτών με τη χρήση κατάλληλων όρων. Σε όλο τον κόσμο, υπολογίζεται πως περισσότερα από 186 εκατομμύρια άνθρωποι αντιμετωπίζουν σήμερα προβλήματα υπογονιμότητας, η πλειονότητα των οποίων βρίσκονται στις αναπτυσσόμενες χώρες (Inhorn and Patrizio, 2015). Ενώ ο πιο ισχυρός αρνητικός προγνωστικός παράγοντας μείωσης του αναπαραγωγικού δυναμικού θεωρείται σήμερα πως είναι η συνεχώς αυξανόμενη ηλικία της μητέρας κατά τη σύλληψη (Hart, 2016), άλλοι παράγοντες, όπως ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στα αυξανόμενα ποσοστά υπογονιμότητας των τελευταίων ετών.

Ο επιπολασμός της υπογονιμότητας σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας εκτιμάται ότι είναι ένα στα επτά ζευγάρια στον δυτικό κόσμο και ένα στα τέσσερα ζευγάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η ανδρική υπογονιμότητα φαίνεται να αποτελεί την αποκλειστική αιτία για αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης στο 20-30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας, ενώ συμβάλλει στο 50% του σύνολο των περιπτώσεων. Συνοπτικά, η υπογονιμότητα εκτιμάται ότι επηρεάζει περίπου το 8-12% των ζευγαριών αναπαραγωγικής ηλικίας παγκοσμίως (Ombelet et al., 2008). Η δευτεροπαθής υπογονιμότητα αποτελεί την πιο κοινή μορφή γυναικείας υπογονιμότητας σε όλο τον κόσμο (Nachtigall, 2006) και αποτελεί την εμφάνιση υπογονιμότητας μετά από μια τουλάχιστον επιτυχή σύλληψη στο παρελθόν (Benksim et al., 2018). Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι η δευτεροπαθής υπογονιμότητα είναι ιδιαίτερα συχνή σε περιοχές με χαμηλό επίπεδο ιατρικής περίθαλψης, λόγω της συχνής εμφάνισης μεταγεννητικών λοιμώξεων και επιπλοκών μετά από διακοπές κύησης (Inhorn and Patrizio, 2015). Τα διαθέσιμα δημογραφικά στοιχεία για την υπογονιμότητα εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το ποσοστό γονιμότητας ορίζεται μέσω

του μέσου αριθμού ζώντων γεννήσεων ανά γυναίκα αναπαραγωγικής ηλικίας και είναι εκείνο που ουσιαστικά καθορίζει τις πληθυσμιακές τάσεις (Bongaarts, 2015; Zegers-Hochschild et al., 2017). Έτσι, σε αναπτυσσόμενες χώρες χαμηλού κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση του πληθυσμού, ιδίως σε χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής, ενώ στα ανεπτυγμένα κράτη καταγράφεται μία ανησυχητικά πτωτική τάση του πληθυσμού, που οφείλεται στη γήρανση του πληθυσμού και στα πολύ χαμηλά ποσοστά γονιμότητας (Bongaarts, 2015).

Η ταχεία εξέλιξη των τεχνικών ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (assisted reproductive technologies, ART) για τη διαχείριση των υπογόνιμων ζευγαριών έχει αποτελέσει ένα από τα σπουδαιότερα ιατρικά επιτεύγματα παγκοσμίως. Η υπογονιμότητα θεωρούταν ένα κοινωνικό “στίγμα” για αρκετούς αιώνες. Ωστόσο σήμερα, με την πάροδο του χρόνου και τις σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της σύγχρονης ιατρικής επιστήμης, οι κοινωνικές τάσεις εξελίχθηκαν και μέσω των εξελιγμένων μεθόδων ART καθίσταται πλέον δυνατή η αποτελεσματική διαχείριση εκατομμύρια υπογόνιμων ζευγαριών. Ως εκ τούτου, προβλήματα υπογονιμότητας που στο παρελθόν θεωρούνταν αδύνατο να επιλυθούν, ο τομέας της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει αναπτύξει τα μέσα και τις τεχνολογίες για να τα αντιμετωπίσει επιτυχώς (Sharma et al., 2018).

1.4.1 Αίτια Υπογονιμότητας

Το πρώτο βασικό δεδομένο που πρέπει πάντα να διερευνάται στο πλαίσιο διαχείρισης της υπογονιμότητας είναι εάν αυτή εμφανίζεται ως πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής (Zegers-Hochschild et al., 2017). Ως πρωτοπαθής ορίζεται η υπογονιμότητα όταν στο ιατρικό ατομικό ιστορικό του υπό διερεύνηση ατόμου δεν καταγράφονται προηγούμενες κλινικές κυήσεις. Αντίστοιχα, ως δευτεροπαθής υπογονιμότητα ορίζεται μία κατάσταση στην οποία το άτομο παρουσιάζει αδυναμία επίτευξης κλινικής κύησης, ενώ στο παρελθόν υπάρχει βεβαιωμένη επίτευξη κλινικής κύησης. Η κατηγοριοποίηση αυτή αφορά τόσο την γυναίκα, όσο και τον άνδρα και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον σχεδιασμό του κατάλληλου πλάνου διαχείρισης του υπογόνιμου ζεύγους. Έτσι, για την κατανόηση του αιτίου υπογονιμότητας το πρώτο και θεμελιώδες βήμα είναι η λήψη ενός αναλυτικού ιατρικού ιστορικού (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε πως υπάρχουν τρεις κύριοι παράμετροι που σχετίζονται με την δυνατότητα φυσικής σύλληψης και ως εκ τούτου θα πρέπει πάντα να αξιολογούνται στο πλαίσιο διερεύνησης της υπογονιμότητας. Οι παράμετροι αυτοί είναι η διάρκεια της υπογονιμότητας, η οποία ορίζεται ως ο χρόνος τον οποίο το ζευγάρι αδυνατεί να επιτύχει σύλληψη μέσω ελεύθερων σεξουαλικών επαφών, η ηλικία της γυναίκας και η ύπαρξη υποκείμενων νοσημάτων που αποδεδειγμένα επηρεάζουν το αναπαραγωγικό δυναμικό (Gnoth et al., 2005). Η ποιότητα του σπέρματος και η ενδοκρινική λειτουργία είναι δύο ακόμα παράμετροι που πρέπει πάντα να αξιολογούνται στο πλαίσιο διερεύνησης της υπογονιμότητας.

Ένας από τους βασικότερους παράγοντες που σχετίζεται με την πιθανότητα επίτευξης αυτόματης φυσικής σύλληψης είναι η διάρκεια, αλλά και ο συγχρονισμός των ελεύθερων σεξουαλικών επαφών, ο οποίος και αποτελεί μία σημαντική ένδειξη της σοβαρότητας του αιτίου υπογονιμότητας. Στον γενικό πληθυσμό, το 80% των φυσικών συλλήψεων επιτυγχάνεται στους πρώτους έξι καταμήνιους κύκλους μετά την έναρξη των ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Μάλιστα, η πιθανότητα επίτευξης κύησης αυξάνεται σημαντικά, όταν οι σεξουαλικές επαφές, εκτός από τακτικές, είναι και συγχρονισμένες με το παράθυρο της ωοθυλακιορρηξίας. Το 50% των ζευγαριών που δεν πετυχαίνουν φυσική σύλληψη στο πρώτο εξάμηνο, υπολογίζεται πως θα το καταφέρουν μέσα στους επόμενους έξι μήνες. Έτσι, μετά από 12 ανεπιτυχείς κύκλους, το 10% των ζευγαριών θα χαρακτηριστούν υπογόνιμα, σύμφωνα με τον πλέον ευρέως εφαρμοζόμενο ορισμό. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτά τα υπογόνιμα ζευγάρια, το ποσοστό ζώντων γεννήσεων μετά από αυτόματη σύλληψη αγγίζει το 55% τους επόμενους 36 μήνες. Μετά το πέρας 48 μηνών, μόλις το 5% των ζευγαριών είναι σίγουρα υπογόνιμο με σχεδόν μηδαμινές πιθανότητες αυτόματης σύλληψης και εγκυμοσύνης (Gnoth et al., 2005).

Εν συνεχεία, η ηλικία της γυναίκας αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο που συσχετίζεται ισχυρά με την εκδήλωση υπογονιμότητας. Από τη δεκαετία του 60', η μητρότητα αποτελεί ένα ζήτημα προσωπικών επιλογών και προτιμήσεων που πλέον δεν περιορίζεται από τη φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος (Van De Kaa, 1987). Οι γυναίκες, πλέον μπορούν να αποκτήσουν ανώτερη εκπαίδευση και να αφοσιωθούν στην καριέρα τους, με συνέπεια να παρατηρείται έντονα το φαινόμενο της αναβολής της τεκνοποίησης στις δυτικές κοινωνίες (Simoni et al., 2017). Επί του παρόντος, η μέση ηλικία πρώτης τεκνοποίησης υπολογίζεται προσεγγιστικά στα 30 έτη στην Ευρώπη, ενώ

ένα σημαντικό ποσοστό των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας επιλέγει την τεκνοποίηση μετά τα 35 έτη (Eijkemans et al., 2014). Παρά το γεγονός πως ο οικογενειακός προγραμματισμός έγκειται στην ατομική ελευθερία του εκάστοτε ατόμου, πρέπει να σημειωθεί πως οι βιολογικοί περιορισμοί, που θέτει ο χρόνος στην γυναικεία γονιμότητα, ακολουθούν ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Είναι πλέον τεκμηριωμένο πως το αναπαραγωγικό δυναμικό της γυναίκας παρουσιάζει μέγιστο στην τρίτη δεκαετία της ζωής της, ενώ από τα 30 έτη και μετά αρχίζει μία σταδιακή έκπτωση του αναπαραγωγικού δυναμικού. Η έκπτωση αυτή γίνεται εντονότερη από τα 35 έτη και μετά, ενώ η επίτευξη φυσικής σύλληψης μετά τα 40 έτη καθίσταται σπάνια. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνονται από πρόσφατες μελέτες που δείχνουν πως η μέση ηλικία απόκτησης του τελευταίου τέκνου στον γενικό γυναικείο πληθυσμό είναι τα 40-41 έτη (Eijkemans et al., 2014). Η σχετική με την ηλικία απώλεια του αναπαραγωγικού δυναμικού αυξάνεται από 4,5% στην ηλικία των 25 ετών, 7% σε ηλικία 30 ετών, 12% σε ηλικία 35 ετών και 20% σε ηλικία 38 ετών. Στη συνέχεια, αυξάνεται ραγδαία σε περίπου 50% στην ηλικία των 41 ετών, σχεδόν 90% στην ηλικία των 45 ετών και πλησιάζει το 100% στην ηλικία 50 ετών. Ο μηχανισμός πίσω από το φαινόμενο της μείωσης της γονιμότητας με την πρόοδο της ηλικίας βασίζεται κυρίως στην συνεχή εξάντληση του ωθητικού αποθέματος, δηλαδή του αριθμού των ωοθυλακίων που μπορούν να διεγερθούν και των περιεχόμενων σε αυτά ωαρίων, τα οποία σχηματίζονται στις εμβρυϊκές ωοθήκες και δεν αυτό-ανανεώνονται (te Velde and Pearson, 2002). Παράλληλα, εκτός από την μείωση του ωθητικού αποθέματος, με την πρόοδο της ηλικίας επηρεάζεται σημαντικά και η ποιότητα των ωαρίων (Hart, 2016). Η υποβάθμιση της ποιότητας των ωαρίων οφείλεται γενικά σε διαταραχές του κυτταροπλάσματος, αλλά κυρίως σε βλάβες του μηχανισμού της μείωσης, που σχετίζονται με την αύξηση της συχνότητας των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρούνται με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας. Τα ωάρια πτωχής ποιότητας παρουσιάζουν μειωμένο δυναμικό γονιμοποίησης, ενώ τα έμβρυα που προκύπτουν από αυτά παρουσιάζουν περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας φαινομένων, όπως είναι η πρόιμη απώλεια της κύησης (early miscarriages), οι αυτόματες αποβολές πρώτου τριμήνου και οι μαιευτικές και περιγεννητικές επιπλοκές. Η φυσιολογική “γήρανση” των ωοθηκών και η επακόλουθη έκπτωση του αριθμού και της ποιότητας των ωαρίων, εκφράζεται φαινοτυπικά με σημεία υπογονιμότητας, τα οποία γίνονται σταδιακά ολοένα πιο έντονα. Στην συνέχεια εμφανίζονται σημεία διαταραχών στην κυκλικότητα των καταμήνιων κύκλων και στην ενδοκρινολογική δραστηριότητα των

ωοθηκών (περίοδος περιεμμηνόπαυσης), μέχρι την διακοπή της περιόδου, η οποία κατά μέσο όρο λαμβάνει χώρα στα 50 έτη και σηματοδοτεί την έλευση της εμμηνόπαυσης, όπου η επίτευξη φυσικής σύλληψης θεωρείται πρακτικά αδύνατη (Hart, 2016).

Ωστόσο, έκπτωση του δυναμικού των ωοθηκών δεν παρατηρείται μόνο στο πλαίσιο των φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας, αλλά μπορεί να είναι και αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (premature ovarian insufficiency, POI). Η POI αποτελεί μια διαταραχή του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος που εμφανίζεται σε ποσοστό 1% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Εξ ορισμού, η διάγνωση της POI τίθεται όταν φαινοτυπικά παρατηρούνται διαταραχές στην κυκλικότητα των καταμήνιων κύκλων ή/και αμηνόρροια, με ταυτόχρονη παθολογική αύξηση των επιπέδων της FSH στον ορό, συνθήκες που προσομοιάζουν την εμμηνόπαυση, σε γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 40 ετών. Η παθοφυσιολογική βάση του φαινομένου βασίζεται στη μη φυσιολογική επιτάχυνση της απώλειας του ωοθηκικού αποθέματος. Τα αίτια που οδηγούν σε POI είναι πολλά και σε αυτά περιλαμβάνονται γενετικές διαταραχές (π.χ μεταλλάξεις στο γονίδιο FMR1 που οδηγούν στο Σύνδρομο του Εύθραυστου Χ), χρωμοσωμικές ανωμαλίες (π.χ Σύνδρομο Turner), περιβαλλοντικές διαταραχές και ενδοκρινικοί διαταράκτες, λοιμώξεις του αναπαραγωγικού συστήματος, αυτοάνοσα ή μεταβολικά νοσήματα, αλλά και ιατρογενή αίτια κυρίως στο πλαίσιο της διαχείρισης νεοπλασιών, όπως είναι η εφαρμογή γοναδοτοξικών θεραπειών (χημειοθεραπεία και ακτινοβολία) ή/και χειρουργικών επεμβάσεων που τραυματίζουν τον φλοιό των ωοθηκών (Vander Borgh and Wyns, 2018). Ωστόσο, στο 75% των περιπτώσεων, τα αίτια παραμένουν αδιευκρίνιστα, χαρακτηρίζοντας έτσι την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια ως ιδιοπαθή. Θεωρείται πως πίσω από τις ιδιοπαθής περιπτώσεις POI κρύβονται διαταραχές που αφορούν επιγενετικές αλλοιώσεις. Η μέτρηση της κυκλοφορούσας αντιμυλλέριου ορμόνης (anti-müllerian hormone, AMH) θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει τον αριθμό των ωοθυλακίων που βρίσκονται αποθηκευμένα στις ωοθήκες, καθώς η συγκέντρωσή της στον ορό είναι ανάλογη του αριθμού των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων. Για αυτό το λόγο, η AMH θεωρείται ως ένας κατάλληλος δείκτης για την αξιολόγηση της γήρανσης των ωοθηκών. Εντούτοις, παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα και αποκλίσεις των μετρήσεων AMH μεταξύ των ατόμων, κυρίως λόγω της πολύ μεγάλης μεταβλητότητας στον αριθμό των ωοθυλακίων σε άτομα παρόμοιας ηλικίας (Dewailly et al., 2014).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovary syndrome, PCOS) αποτελεί ίσως η πιο διαδεδομένο ενδοκρινική διαταραχή στις γυναίκες, επηρεάζοντας το 5-10% του γυναικείου πληθυσμού (Franks, 2008). Εκτός από τις διαταραχές της ωορρηξίας, το δυναμικό εμβρυϊκής εμφύτευσης μειώνεται σε περιπτώσεις ασθενών με PCOS όπως αποδεικνύεται από τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Hart, 2016). Το PCOS διαγιγνώσκεται με τα κριτήρια του Ρότερνταμ όταν πληρούνται δύο από τα ακόλουθα τρία κριτήρια: διαταραχές στη συχνότητα ή πλήρης απουσία ωοθυλακιορρηξίας, μορφολογική παρατήρηση πολυκυστικών ωοθηκών με υπερηχογράφημα και τέλος υπερανδρογονισμός. Οι γυναίκες με PCOS εμφανίζουν επίσης αυξημένα επίπεδα AMH λόγω του αυξημένου αριθμού μικρών ωοθυλακίων που αναπτύσσονται στις πολυκυστικές τους ωοθήκες (Dewailly, 2016). Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με μεταβολικές δυσλειτουργίες και διαταραχές της ωορρηξίας τα οποία με τη σειρά τους έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση PCOS. Ως εκ τούτου, η απώλεια βάρους έχει προταθεί ως μέτρο για πιθανή αποκατάσταση της ωορρηξίας και αντιμετώπιση του υπερανδρογονισμού σε αυτές τις ασθενείς (Crosignani et al., 2003).

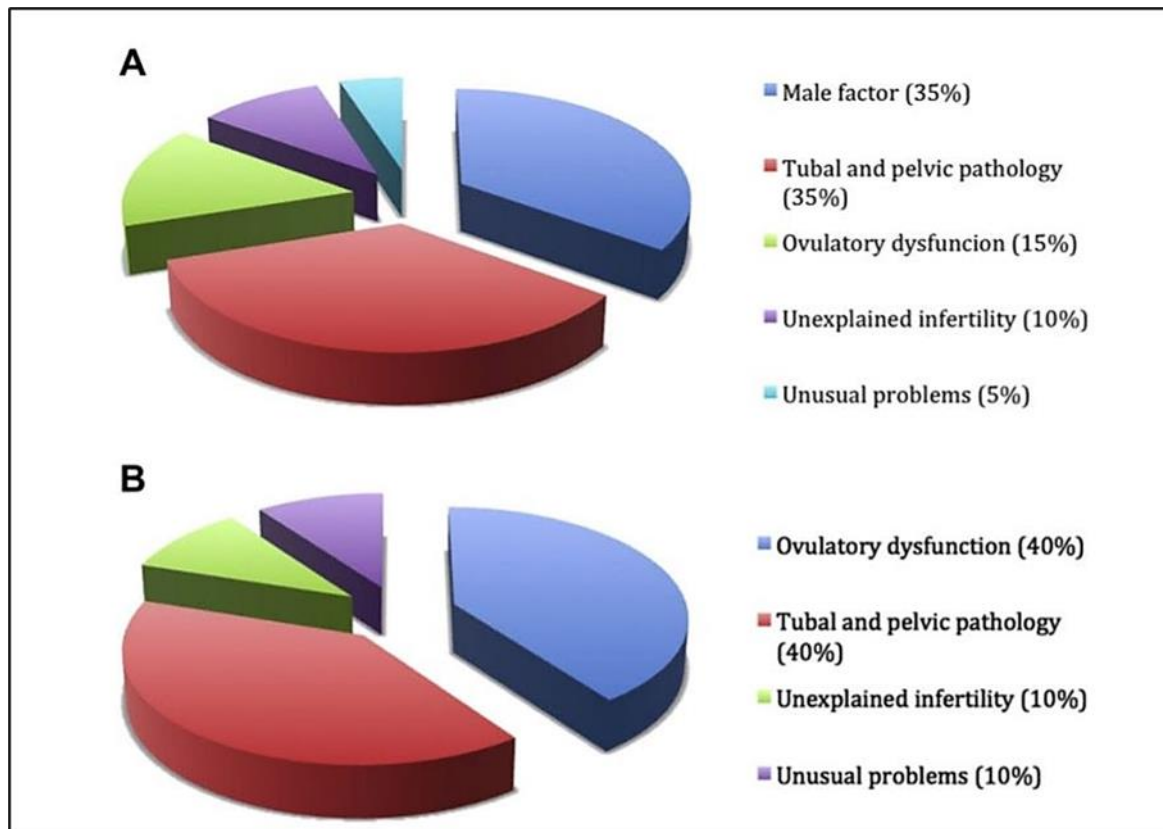
Ο σαλπγγικός παράγοντας υπογονιμότητας αποδίδεται σε απόφραξη των σαλπγγων και σε συμφύσεις της περιτοναϊκής κοιλότητας που διαγιγνώσκονται σε περίπου 30% έως 35% των νεαρών γυναικών με προβλήματα γονιμότητας (Dun and Nezhat, 2012). Η πιο διαδεδομένη αιτία του σαλπγγικού παράγοντα είναι η πυελική φλεγμονώδης νόσος (pelvic inflammatory disease, PID) και η οξεία σαλπγγίτιδα. Τα *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* και άλλοι αναερόβιοι οργανισμοί αποτελούν τα συνηθέστερα ευρήματα κατά τη διερεύνηση του PID. Έχει εκτιμηθεί ότι ο κίνδυνος υπογονιμότητας αυξάνεται με τον αριθμό και τη σοβαρότητα των επεισοδίων πυελικών λοιμώξεων. Έτσι, η επίπτωση της υπογονιμότητας είναι 10% έως 12% μετά από ένα επεισόδιο, 23% έως 35% μετά από δύο επεισόδια, και 54% έως 75% μετά από τρία επεισόδια (Weström, 1994). Τα κλινικά ευρήματα που εντοπίζονται σε περιπτώσεις PID είναι παρόμοια με εκείνα που εντοπίζονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση αποτελεί μια φλεγμονώδη παθολογία του πυελικού εδάφους που σχετίζεται με υπογονιμότητα. Η χρόνια φλεγμονή από τις αντιδραστικές κυτταροκίνες και χημειοκίνες που παράγονται από το έκτοπο ενδομήτριο έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ίνωσης παρόμοια με εκείνη που προκαλεί η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (pelvic inflammatory disease, PID). Ο πραγματικός επιπολασμός της ενδομητρίωσης σε γυναίκες

αναπαραγωγικής ηλικίας παραμένει αβέβαιος. Ο εκτιμώμενος συνολικός επιπολασμός της ενδομητρίωσης σε μελέτες με βάση τον γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 0,8% έως 6%. Ωστόσο, στις γυναίκες που ανήκουν στον υπογόνιμο πληθυσμό, ο επιπολασμός φαίνεται να είναι πολύ υψηλότερος, που κυμαίνεται από 20% έως 50% (Tanbo and Fedorcsak, 2017). Οι μηχανισμοί που ενέχονται στην πρόκληση υπογονιμότητας σε ασθενείς με ενδομητρίωση θεωρείται ότι σχετίζονται με ανατομικές παραμορφώσεις, λόγω συμφύσεων και ινώσεων, έως ενδοκρινικές και ανοσολογικές διαταραχές που σχετίζονται με την παθολογική φύση της ενδομητρίωσης (Tanbo and Fedorcsak, 2017). Όπως αποδεικνύεται από τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, το δυναμικό εμβρυϊκής εμφύτευσης μειώνεται υπό εδάφους ενδομητρίωσης (Barnhart et al., 2002).

Τα λειομύματα της μήτρας αποτελούν τους συνηθέστερους καλοήθεις όγκους της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού. Ακόμα κι αν τους ο ρόλος τους στην υπογονιμότητα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, τα μέχρι σήμερα στοιχεία δείχνουν ότι λόγω της ζωτικής ανατομικής θέσης τους μπορεί να σχετίζονται με αναπαραγωγική δυσλειτουργία. Έχουν αναφερθεί αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί για το πώς τα λειομύματα μπορούν να επηρεάσουν τη γονιμότητα, όπως η ανατομική παραμόρφωση της κοιλότητας του ενδομητρίου, η μη φυσιολογική συσταλτικότητα της μήτρας, η μειωμένη παροχή αίματος στο ενδομήτριο και η αλλοίωση της δεκτικότητας του ενδομητρίου (Siristatidis et al., 2016). Μειωμένο δυναμικό εμφύτευσης του εμβρύου και πρόωρος τερματισμός εγκυμοσύνης έχουν, επίσης, αναφερθεί σε παρουσία πολύποδων ενδομητρίου (Hart, 2016). Οι πολύποδες έχουν συσχετιστεί με μειωμένες συγκεντρώσεις insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP-1), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) και οστεοποντίνης, που αποτελούν δείκτες υποδεκτικότητας του ενδομητρίου. Εντούτοις, η χειρουργική αφαίρεση πολύποδων φαίνεται να αντιστρέφει την κακή πρόγνωση και να οδηγεί στην αποκατάσταση του αναπαραγωγικού δυναμικού (Ben-Nagi et al., 2009).

Επιπλέον, στην βιβλιογραφία έχουν εκτενώς περιγραφεί οι παράγοντες που θεωρείται ότι επηρεάζουν σημαντικά τη γονιμότητα και αφορούν και στα δύο φύλα, όπως υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός, υπερπρολακτιναιμία, κυστική ίνωση, λοιμώξεις, συστηματικά νοσήματα, τρόπος ζωής, παχυσαρκία, κάπνισμα, stress και κατανάλωση αλκοόλ (Vander Borgh and Wyns, 2018). Εντούτοις, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν παθολογικές καταστάσεις που αφορούν αποκλειστικά τη γυναικεία αναπαραγωγική

φυσιολογία και έχουν αντίκτυπο στη γονιμότητα. Στην Εικόνα 19 συνοψίζονται τα συνηθέστερα αίτια υπογονιμότητας που έχουν περιγραφεί μεταξύ ανδρών και γυναικών, αλλά και σε επίπεδο ζεύγους.



Εικόνα 19. Αίτια υπογονιμότητας που εντοπίζονται (A) στα ζευγάρια με διαταραχές γονιμότητας και (B) αποκλειστικά στις γυναίκες (Dun and Nezhat, 2012).

Όσον αφορά την ανδρική υπογονιμότητα, περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων οφείλεται σε μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων, σε κακής μορφολογίας σπερματοζωάρια ή και στα δύο. Άλλες αιτίες περιλαμβάνουν ανατομικά προβλήματα, ορμονικές διαταραχές και γενετικές βλάβες. Ο όρος ολιγοζωοσπερμία αναφέρεται στο σπέρμα που έχει χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ενίοτε μορφολογικές ανωμαλίες και χαμηλή κινητικότητα, ενώ ο όρος αζωοσπερμία αναφέρεται στην πλήρη απουσία σπερματοζωαρίων (Leaver, 2016). Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας, η παραγωγή σπέρματος μπορεί να συμβαίνει φυσιολογικά αλλά λόγω απόφραξης στην εκφορητική οδό του σπέρματος να εμποδίζεται η διέλευσή του, κατάσταση που ορίζεται ως αποφρακτική αζωοσπερμία, σε αντίθεση με τη μη αποφρακτική αζωοσπερμία που χαρακτηρίζεται από

διαταραχή στην παραγωγή σπερματοζωαρίων στους όρχεις (Jungwirth et al., 2012). Ο υπογοναδισμός μπορεί επίσης να επηρεάσει τη διαδικασία της σπερματογένεσης και τη φυσιολογία των όρχεων. Αυτό οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούσας τεστοστερόνης, είτε λόγω πρωτογενούς δυσλειτουργίας των όρχεων (υπεργοναδοτροφικός υπογοναδισμός), είτε λόγω ανεπαρκούς απελευθέρωσης της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών ή των ίδιων των γοναδοτροπινών (υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός) (Jungwirth et al., 2012). Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες, ακόμα και ο τρόπος ζωής είναι στοιχεία που φαίνονται ικανά να προκαλέσουν ενδοκρινικές διαταραχές σε ένα έμβρυο επηρεάζοντας την μετέπειτα ανάπτυξη των όρχεων (Juul et al., 2014). Εν κατακλείδι, θεωρείται πως ένας συνδυασμός παραγόντων επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα. Η ηλικία μπορεί να αποτελεί έναν τέτοιο παράγοντα, καθώς τα επίπεδα τεστοστερόνης εμφανίζουν πτωτική πορεία με την αύξηση της ηλικίας, η συγκέντρωση του σπέρματος μειώνεται και ο κατακερματισμός του γενετικού υλικού είναι εντονότερος σε άνδρες άνω των 45 ετών (Dun and Nezhat, 2012).

1.4.2 Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

Τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μια ραγδαία αύξηση του αριθμού των ασθενών που καταφεύγουν στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να οφείλεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων όπως το μεγάλο εύρος ενδείξεων για τις οποίες συστήνεται πλέον η χρήση ART, η ανάπτυξη νέων τεχνικών, καθώς και λόγω της προθυμίας πλέον των ζευγαριών να αναζητήσουν θεραπεία για τα προβλήματα υπογονιμότητας που βιώνουν χωρίς προκαταλήψεις (Bhandari et al., 2018). Οι τεχνολογίες ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν τεχνικές που αφορούν στον *in vitro* χειρισμό των ανθρώπινων γαμετών και εμβρύων με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης (Zegers-Hochschild et al., 2009). Η υποβοηθούμενη σπερματέγχυση είτε με τη χρήση σπέρματος από το σύντροφο είτε από τον δότη δεν περιλαμβάνονται στο ευρύ φάσμα τεχνικών που καλύπτει το ART. Ένας κύκλος θεραπείας ART αποτελείται από μια σειρά περίπλοκων σταδίων, με το καλό αναπαραγωγικό αποτέλεσμα να εξαρτάται από την αποτελεσματική διαχείριση των κλινικών σε καθένα από αυτά τα στάδια. Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ως μία από τις κύριες και πιο διαδεδομένες τεχνικές της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) είχε αρχικά σχεδιαστεί για την αντιμετώπιση προβλημάτων απόφραξης των σαλπίγγων (Inhorn and Patrizio, 2015).

Ενώ οι αρσενικοί γαμέτες στις πρώτες πρακτικές εφαρμογής της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θεωρούνταν δεδομένο ότι αποτελεί μια σταθερή και συνεπής παράμετρος, αυτό σύντομα άλλαξε όταν έγινε εμφανής η πληθώρα περιπτώσεων αδυναμίας επίτευξης γονιμοποίησης λόγω ανδρικού παράγοντα. Αυτό το φαινόμενο ήταν σίγουρα ο βασικός λόγος που οδήγησε στην επανεξέταση του ρόλου του σπερματοζωαρίου στην εξασφάλιση της γονιμοποίησης (O'Neill et al., 2018). Με αυτό το τρόπο προέκυψαν πιο αναπτυγμένες *in vitro* τεχνικές οι οποίες είχαν υποστεί τροποποίηση, ώστε να ενσωματώνουν στα πρωτόκολλά τους μεθόδους για την επιλογή των σπερματοζωαρίων (Mahadevan, 1981). Η εξέλιξη αυτών των τεχνικών αφιερωμένων στην υπογονιμότητα του ανδρικού παράγοντα στο εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης οδήγησε τυχαία στη γέννηση της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίων (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) (Palermo, 1992). Η μέθοδος αρχικά εισήχθη το 1992 ως τροποποίηση της συμβατικής εξωσωματικής γονιμοποίησης και θεωρείται ένα από τα πιο σπουδαία και επαναστατικά επιτεύγματα στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Palermo et al., 1992). Δίνει τη δυνατότητα σε άντρες με χαμηλή ποσότητα και ποιότητα σπέρματος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με αζωοσπερμία, να αποκτήσουν ένα βιολογικό παιδί (Palermo et al., 2015). Η διαδικασία της ICSI περιλαμβάνει την έγχυση ενός μοναδικού σπερματοζωαρίου απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου, παρακάμπτοντας τη διάφανη ζώνη και τη κυτταρική μεμβράνη χρησιμοποιώντας μια γυάλινη μικρο-πιπέτα (Yuzpe et al., 2000). Επί του παρόντος, η τεχνική της ICSI θεωρείται μια καθιερωμένη εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται παγκοσμίως για τη θεραπεία της υπογονιμότητας (Esteves et al., 2018). Και ενώ αρχικά η τεχνική αναπτύχθηκε για να ξεπεραστούν τα εμπόδια σε περιπτώσεις σοβαρών μορφών υπογονιμότητας οφειλόμενη σε ανδρικό παράγοντα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου γονιμοποίησης έχει αυξηθεί κατακόρυφα τα τελευταία χρόνια, παρά το γεγονός ότι το ποσοστό των υπογόνιμων ζευγαριών λόγω ανδρικού παράγοντα έχει παραμείνει αμετάβλητο (Jain and Gupta, 2007). Αυτή η παρατήρηση αντικατοπτρίζει την τάση των εργαστηρίων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής να εφαρμόζουν ευρέως την τεχνική του ICSI, παρά τις αμφιλεγόμενες αποδείξεις για το όφελος που έχει σε περιπτώσεις ζευγαριών χωρίς υπογονιμότητα λόγω ανδρικού παράγοντα (van Rumste et al., 2004). Κατ' επέκταση, έχουν επανειλημμένως εκφραστεί προβληματισμοί σχετικά με το εάν αυτή η αδιάκριτη εφαρμογή της ICSI πρέπει να αναθεωρηθεί υπό το φως της υποψίας δυσμενών συνεπειών που μπορεί να έχει στην υγεία των παιδιών που προκύπτουν (Boulet et al., 2015).

Λόγω της ιδιαίτερα επεμβατικής φύσης της ICSI, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάλυση των πιθανών κινδύνων που προκύπτουν από την εφαρμογή της. Οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τόσο η συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση όσο και η ICSI θα μπορούσαν να αποτελέσουν παράγοντα κινδύνου τόσο για τη μητέρα όσο και για το παιδί, να προκαλέσουν επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη, όπως η προεκλαμψία, η καθυστερημένη ανάπτυξη και η προωρότητα, καθώς και υψηλότερο ποσοστό συγγενών δυσπλασιών (Erenpreiss et al., 2006; Wen et al., 2012). Ωστόσο, ένας εξίσου σημαντικός αριθμός μελετών αμφισβητεί αυτή τη συσχέτιση, υπογραμμίζοντας ότι οποιαδήποτε σχέση θα μπορούσε κάλλιστα να αποδοθεί στον αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης προβλημάτων υγείας που εντοπίζονται σε ζευγάρια που υποβάλλονται σε κύκλους IVF/ICSI και όχι στις ίδιες τις τεχνικές γονιμοποίησης που εφαρμόζονται (Simoroulou et al., 2016). Το βασικό ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο σήμερα γίνεται κατάχρηση της ICSI, μιας και αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο γονιμοποίησης που χρησιμοποιείται στο πλαίσιο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συνολικά. Ενδεικτικά, ο Boulet et al. αξιολόγησε δεδομένα από κύκλους ART (1996-2012) διαπιστώνοντας ότι στο 65,1% όλων των φρέσκων κύκλων που πραγματοποιήθηκαν εφαρμόστηκε η τεχνική της ICSI. Ανέφερε, επίσης, αύξηση της χρήσης ICSI από 36,4% το 1996 σε 76,2% το 2012 (Boulet et al., 2015). Σε μια άλλη μελέτη όπου αξιολογήθηκαν παγκόσμια δεδομένα της International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) από κύκλους ART μεταξύ του 2008 και 2010, διαπιστώθηκε η χρήση της τεχνικής στο 67% των κύκλων που αναλύθηκαν (Dyer et al., 2016). Πιθανοί λόγοι για την ευρεία χρήση της ICSI σχετίζονται με τον υψηλό βαθμό τυποποίησης (standardization) και επικύρωσης (validation) της μεθόδου, γεγονός που επιτρέπει την άμεση και εύκολη ενσωμάτωσή της στα κέντρα υπογονιμότητας για τη διαχείριση και αντιμετώπιση σχεδόν όλων των αιτιών υπογονιμότητας (Palermo et al., 2015). Σε σύγκριση με τη συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση μεταξύ ζευγαριών που υποβάλλονται σε ART για υπογονιμότητα μη ανδρικής αιτιολογίας, η ICSI σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης (23,0% έναντι 25,2%, (RR) 0,93; 95% CI 0,91-0,95) και χαμηλότερα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (36,5% έναντι 39,2%, RR 0,95, 95% CI 0,93-0,97) (Boulet et al., 2015). Σε μια μεγάλη αναδρομική μελέτη κοορτής που αξιολόγησε 585.065 κύκλους ART στην Αυστραλία μεταξύ του 2002 και του 2013, ο Chambers et al. δεν εντόπισε κανένα όφελος από την εφαρμογή της ICSI έναντι της συμβατικής εξωσωματικής γονιμοποίησης σε ζευγάρια με υπογονιμότητα μη ανδρικού παράγοντα. Ως

εκ τούτου, η Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) έχει προτείνει να μην πραγματοποιείται αδιάκριτη χρήση της ICSI στην μη ανδρικής αιτιολογίας υπογονιμότητα (Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, 2012).

Παρά τις επαναστατικές εξελίξεις στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η ανάπτυξη της IVF και της ICSI, η ενδομήτρια σπερματέγχυση (intrauterine insemination, IUI) αποτελεί έως σήμερα μια φθηνή, ελάχιστα επεμβατική και αποτελεσματική θεραπεία πρώτης γραμμής για επιλεγμένους ασθενείς με τραχηλικό παράγοντα, ήπιο ανδρικό παράγοντα, ανεξήγητη υπογονιμότητα, υπογονιμότητα λόγω ανοσολογικών παραγόντων και υπογονιμότητα λόγω διαταραχών στην εκσπερμάτιση. Έχει προταθεί επίσης και ως θεραπεία σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης, ωοθηκικών διαταραχών, και σαλπινγικού παράγοντα. Αν και η τεχνική της IUI έχει παραμείνει ουσιαστικά η ίδια μέσα στα χρόνια, αρκετές εξελίξεις στα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης, στις τεχνικές επεξεργασίας του σπέρματος, ακόμα και στην υπερηχογραφική παρακολούθηση με πιο εξελιγμένα μέσα οδήγησαν σε υποσχόμενα ποσοστά επιτυχίας με την εφαρμογή IUI (Allahbadia, 2017). Με την εφαρμογή της IUI σε συνδυασμό με αυστηρά κριτήρια επιλογής των ασθενών και τα εξατομικευμένα πρωτόκολλα διέγερσης προσαρμοσμένα στην ηλικία και την αιτιολογία υπογονιμότητας μπορούν να εξασφαλίσουν μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης επιπλοκών, όπως πολύδυμες κύσεις και το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS). Ταυτόχρονα, καθίσταται δυνατό να μεγιστοποιηθεί το συνολικό αποτέλεσμα της κύησης. Όπως προτείνεται, μια ασθενής μπορεί να υποβληθεί σε έως έξι κύκλους IUI πριν εξεταστεί η περίπτωση κάποιας άλλης εναλλακτικής θεραπείας. Ωστόσο, ασθενείς σε προχωρημένη ηλικία, σοβαρή υπογονιμότητα λόγω ανδρικού παράγοντα, παθολογία των σαλπίγγων ή σοβαρή ενδομητρίωση ενδείκνυται να υποβάλλονται άμεσα σε IVF/ICSI, ώστε να επωφεληθούν χωρίς να χρειαστεί να διατρέξουν τον κίνδυνο επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων προσπαθειών με IUI (Allahbadia, 2017).

Οι παράμετροι του σπέρματος που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την πραγματοποίηση της IUI περιλαμβάνουν τον χρόνο επεξεργασίας του σπέρματος, τον συνολικό αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων, την rapid progressive motility μετά την επεξεργασία, τη μορφολογία του σπέρματος πριν και μετά την επεξεργασία, inseminating motile sperm count (IMSC), τον χρόνο έγχυσης IUI και την 24-ωρη επιβίωση σπέρματος.

Πιθανή καθυστέρηση της επεξεργασίας σπέρματος από 30 λεπτά έως 1 ώρα ή/και καθυστέρηση της IUI από 90 λεπτά έως 2 ώρες μετά τη συλλογή του δείγματος μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την έκβαση του κύκλου (Yavas and Selub, 2004). Όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται, δεν έχει καθοριστεί ακόμη διεθνώς ένα επίπεδο κατωφλίου για βασικές παραμέτρους πάνω από το οποίο μπορεί να εκτελεστεί το IUI αποδίδοντας αποδεκτά ποσοστά εγκυμοσύνης (Ombelet et al., 2003). Ωστόσο, υπάρχουν ενδεικτικά δεδομένα που αφορούν σε παραμέτρους που επηρεάζουν αρνητικά την επιτυχία της IUI, όπως για παράδειγμα processed total motile sperm (PTMS) <10 εκατομμύρια (Miller et al., 2002), επιβίωση σπέρματος <70% (Branigan et al., 1999), <5% ποσοστό φυσιολογικών σπερματοζωαρίων, inseminating motile count (IMC) <1×10⁶ (Ombelet et al., 2003) και prewash IUI-semen pregnancy score (IUI-SPS) <150 (Bedaiwy et al., 2003). Σε αυτές τις περιπτώσεις συνίσταται η διερεύνηση εναλλακτικής θεραπείας, καθώς η IUI αδυνατεί να εξασφαλίσει επαρκείς πιθανότητες επίτευξης εγκυμοσύνης. Επιπλέον, ο αριθμός PTMS ≥ 10×10⁶, ένα εύρος 24ωρης επιβίωσης μεγαλύτερο 70% (Branigan et al., 1999), φυσιολογική μορφολογία πριν την επεξεργασία του σπέρματος ≥ 15,5%, γρήγορη και προοδευτική κινητικότητα ≥ 25,5% μετά την επεξεργασία του σπέρματος και η curvilinear velocity (VCL) μετά την επεξεργασία ≥ 102,65 μm/s έχουν προταθεί ως παράμετροι που ανεξάρτητα μπορούν να προβλέψουν το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης σε ασθενείς με υπογονιμότητα λόγω ανδρικού παράγοντα. Αυτές οι παράμετροι θεωρούνται χρήσιμες στην συμβουλευτική που καλείται ένας κλινικός να πραγματοποιήσει στους ασθενείς και τη στρατηγική που προτείνει για τη μελλοντική διαχείριση κάθε περιστατικού στην κλινική πράξη (Shibahara et al., 2004). Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η ήπια διέγερση των ωοθηκών γενικά οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τον φυσικό κύκλο όταν εφαρμόζεται η τεχνική της IUI, διατρέχοντας ως εκ τούτου μεγαλύτερο κίνδυνο για πολύδυμες κυήσεις (Guzick et al., 1999; Thijssen et al., 2017). Όσον αφορά την επίδραση των παραγόντων του σπέρματος στην έκβαση ενός κύκλου IUI, η βιβλιογραφία παρουσιάζει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Αρκετοί συγγραφείς αναφέρουν έναν ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων για ένα αποτελεσματικό κύκλο IUI. Ωστόσο, δεν υπάρχει συμφωνία σχετικά με την ακριβή τιμή αυτού του ελάχιστου αριθμού (Tomlinson et al., 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο μελέτες που κάνουν λόγο και για μέγιστο επιθυμητό αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων (Lemmens et al., 2017; Thijssen et al., 2017). Επίσης, γίνεται λόγος και για την επίδραση της μορφολογίας του σπέρματος στην επιτυχή έκβαση της IUI. Παρά τις αναφορές σε μελέτες που καταδεικνύουν

ξεκάθαρη επίδραση της μορφολογίας του σπέρματος στα αποτελέσματα της ΙUI, σε μια πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, συμπεραίνεται ότι η μορφολογία έχει πολύ πτωχό κλινικό αντίκτυπο στην πρόβλεψη της έκβασης της εγκυμοσύνης (Gatimel et al., 2017). Μία πιθανή εξήγηση στην επίπτωση αυτών των μετρήσεων και παραμέτρων του σπέρματος στην έκβαση αυτών των κύκλων ίσως βρίσκεται στις τεράστιες αποκλίσεις στην κλινική πρακτική της ανάλυσης σπέρματος που χρησιμοποιείται από εργαστήρια (Gatimel et al., 2017; Tomlinson et al., 2013).

Συνοψίζοντας, η συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία από τη γέννηση της Louise Brown το 1978 έως και σήμερα. Αποτελεί όμως μια τεχνική, τα αποτελέσματα της οποίας δεν είναι τα επιθυμητά όταν ποσοτικές ή ποιοτικές παράμετροι του σπέρματος δεν είναι ικανοποιητικές (Palermo et al., 1992). Λαμβάνοντας υπόψη ότι στη φυσιολογική γονιμοποίηση, ένα και μόνο σπερματοζώαριο με λειτουργικό κεντροσωμάτιο και ακέραιο γονιδίωμα αρκεί για να δημιουργήσει ένα υγιές έμβρυο, η τεχνική της ICSI έχει αποτελέσει την ενδεδειγμένη θεραπεία για ζευγάρια με σοβαρή υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα, ενώ πλέον χρησιμοποιείται και σε ένα μεγάλο ποσοστό περιστατικών χωρίς ενδείξεις ανδρικού παράγοντα (Devroey, 2004). Με τη σειρά της, η ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική, που εφαρμόζεται σε πολλές κλινικές σε όλο τον κόσμο (Lemmens et al., 2018). Η αποτελεσματικότητα και η επιτυχία της θεραπείας εξαρτώνται από πολλές παραμέτρους, όπως η ηλικία των γυναικών και των ανδρών, γυναικείοι παράγοντες υπογονιμότητας, η ποιότητα του σπέρματος και ο τύπος θεραπείας όπως για παράδειγμα φυσικός κύκλος έναντι διέγερσης και το πρωτόκολλο πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας. Οι καλύτερες ενδείξεις για την εφαρμογή της ενδομήτριας σπερματέγχυσης είναι ο ήπιος ανδρικός παράγοντας και η ανεξήγητη υπογονιμότητα (Ombelet et al., 2003), με ιδιαίτερη έμφαση στην διάγνωση σαλπινγικού παράγοντα ως την κύρια υποκείμενη αιτία της υπογονιμότητας.

1.4.3 Πρωτόκολλα Διέγερσης των Ωοθηκών

Η ωοθηκική διέγερση (ovarian stimulation, OS) αποτελεί ένα ζωτικό στάδιο των κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ουσιαστικά πραγματοποιείται με τη χρήση ενός φαρμακευτικού σχήματος που σκοπό έχει την πρόκληση της ανάπτυξης ωοθυλακίων στις ωοθήκες (Gallos et al., 2017; Zegers-Hochschild et al., 2017). Η απόκριση των ωοθηκών

στο πρωτόκολλο διέγερσης είναι ένα ζήτημα εξέχουσας σημασίας καθώς σχετίζεται με το ποσοστό ζωντανών γεννήσεων, καθώς και με τη συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Ιδανικά, η συλλογή 8-14 ωοκυττάρων θεωρείται το επιθυμητό και βέλτιστο αποτέλεσμα εφαρμογής ενός πρωτοκόλλου ωοθηκικής διέγερσης. Περισσότερα από 15 ωοκύτταρα αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών χωρίς αύξηση του ποσοστού ζώντων γεννήσεων (Nyboe Andersen et al., 2017). Διάφορες παράμετροι έχουν προταθεί για να γίνει πρόβλεψη της απόκρισης μιας ασθενούς στο πρωτόκολλο ωοθηκικής διέγερσης, με συνεχώς αναδυόμενα στοιχεία να υποδεικνύουν πως αυτές οι παράμετροι μπορούν να προσφέρουν και μια πιο εξατομικευμένη και προσωποποιημένη θεραπευτική προσέγγιση (Mascarenhas and Balen, 2017; van Tilborg et al., 2017). Οι χρησιμοποιούμενοι δείκτες περιλαμβάνουν τα επίπεδα των ορμονών AMH και FSH, καθώς και την εκτίμηση του antral follicle count (AFC) για την πρόβλεψη της απόκρισης των ωοθηκών στα πρωτόκολλα διέγερσης. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι εν λόγω δείκτες που υποδεικνύουν το ωοθηκικό απόθεμα των ωοθηκών, αδυνατούν να αντικατοπτρίσουν την ποιότητα των ωαρίων και των εμβρύων που θα προκύψουν (Howie and Kay, 2018). Τα συμβατικά πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών στοχεύουν στη μεγιστοποίηση του αριθμού των ωαρίων που συλλέγονται για την απόκτηση περισσότερων εμβρύων, επιτρέποντας έτσι την επιλογή των εμβρύων καλύτερης ποιότητας για μεταφορά και τη δημιουργία πλεονάσματος εμβρύων που μπορούν να κρυοσυντηρηθούν για χρήση σε μελλοντικούς κύκλους, χωρίς να απαιτηθεί ξανά να εφαρμοστεί ένα πρωτόκολλο διέγερσης (Fauser et al., 2010). Παρόλο που τα συμβατικά πρωτόκολλα σχετίζονται με καλά κλινικά αποτελέσματα, η υψηλή δόση γοναδοτροπινών που χορηγείται τείνει να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ασθενή, το κόστος, την πιθανότητα συχνών επισκέψεων στο νοσοκομείο για την παρακολούθηση της απόκρισης των ωοθηκών και τον κίνδυνο επιπλοκών, όπως το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Bodri et al., 2008; Steward et al., 2014).

Κεντρικό ρόλο σε αυτά τα θεραπευτικά σχήματα έχει συνήθως η χρήση γοναδοτροπινών για να επιτευχθεί η διέγερση των ωοθηκών. Η βάση για την ανάπτυξη σκευασμάτων γοναδοτροπινών τέθηκε ήδη από τις αρχές του 1900 όπου έγιναν οι πρώτες απόπειρες για τη μελέτη του ρόλου της υπόφυσης στην γοναδική λειτουργία (Lunenfeld, 2004). Όπως συμβαίνει φυσιολογικά, η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) διεγείρει την έκκριση της θυλακιοτρόπου

ορμόνης (follicle stimulating hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone, LH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (Baerwald et al., 2012), οι οποίες εν συνεχεία θα καθορίσουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στην ωοθήκη και την επιλογή ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου. Η απότομη αύξηση (αιχμή) της LH στο μέσο του εμμηνορρυσιακού κύκλου είναι αυτή που θα πυροδοτήσει την ωοθυλακιορρηξία. Η χορήγηση εξωγενών γοναδοτροπινών διατηρεί τα επίπεδα FSH και LH πάνω από ένα κρίσιμο όριο που απαιτείται για να διεγείρει την ανάπτυξη πολλών ωοθυλακίων, επιτρέποντας έτσι την ανάκτηση πολλαπλών ωοκυττάρων σε έναν μοναδικό κύκλο IVF (Fatemi et al., 2012). Για να προληφθεί το ατυχές σενάριο μιας πρόωρης αύξησης της LH λόγω ανάπτυξης πολλαπλών κυρίαρχων θυλακίων, γίνεται ταυτόχρονη χορήγηση ενός αγωνιστή ή ανταγωνιστή GnRH (Humaidan and Alsbjerg, 2014).

Ανάλογα με τον αν γίνεται χρήση ενός GnRH αγωνιστή έναντι ενός ανταγωνιστή, τα πρωτόκολλα IVF με GnRH ανάλογα ταξινομούνται ως πρωτόκολλα με αγωνιστή GnRH ή με ανταγωνιστή GnRH. Επιπλέον, υπάρχει και η διαθέσιμη επιλογή ενός πρωτοκόλλου ήπιας ωοθηκικής διέγερσης που κάνει χρήση της κιτρικής κλομιφαίνης (CC) συνδυαστικά με GnRH ή FSH (Marcic et al., 2013; Mohsen and El Din, 2013; Williams et al., 2002). Τα ανάλογα της GnRH είναι δεκαπεπτίδια σχεδιασμένα ώστε να αλληλοεπιδρούν με GnRH υποδοχείς. Οι αγωνιστές GnRH επιτρέπουν την παρατεταμένη διέγερση του υποδοχέα και την επακόλουθη έκκριση γοναδοτροπινών, ενώ οι ανταγωνιστές GnRH δρουν καταστέλλοντας αυτή την έκκριση (van Loenen et al., 2002). Και τα δύο ανάλογα χρησιμοποιούνται ευρέως στην εξωσωματική γονιμοποίηση για τη ρύθμιση της διέγερσης αποτρέποντας την ενδογενή αιχμή της LH και επιτρέποντας τον συντονισμό της ανάκτησης ωαρίων την ιδανική χρονική στιγμή (Grow et al., 2014; Kara et al., 2013; Khalaf et al., 2010). Αρκετά ανάλογα αγωνιστών (τριπτορελίνη, λευπρορελίνη, δεσλορελίνη, γοσερελίνη και ναφαρελίνη) και μερικά ανάλογα ανταγωνιστών (σετρορελίξη και γκανιρελίξη) έχουν υιοθετηθεί στην κλινική πράξη (Grow et al., 2014; Kara et al., 2013; Lai et al., 2013).

Το μακρύ πρωτόκολλο αγωνιστή GnRH ξεκινά με τη χορήγηση αγωνιστή GnRH, στο μέσο της ωχρινικής φάσης, την 21^η ημέρα του κύκλου και ακολουθεί εξωγενής χορήγηση γοναδοτροπινών σε δόσεις κατά μέσο όρο 150-300 IU καθημερινά, ξεκινώντας περίπου την 2^η ημέρα του κύκλου και όταν έχει επιτευχθεί η καταστολή του άξονα Υ-Υ-Γ. Οι δόσεις των γοναδοτροπινών που χορηγούνται δύνανται να τροποποιηθούν ανάλογα με

την ανταπόκριση της ωοθυλακικής ανάπτυξης στην διέγερση. Η συνεχής χορήγηση αγωνιστή GnRH και γοναδοτροπινών διαρκεί έως την ημέρα της ενέσιμης χορήγησης φαρμακευτικών σκευασμάτων για τη πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας. Τα φαρμακευτικά αυτά σκευάσματα παρουσιάζουν φαρμακοκινητική δράση παρόμοια με αυτή της LH. Τα πιο χαρακτηριστικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας είναι η ανασυνδυασμένη χοριακή γοναδοτροπίνη (r-hCG) χοριογοναδοτροπίνη άλφα (choriogonadotropin alpha, OVITRELLE®) και η τριπτορελίνη (triptorelin) που είναι συνθετικό δεκαπεπτίδιο, ανάλογο της φυσικής GnRH (Arvecap®). Η πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας καθορίζεται εξατομικευμένα ανάλογα με την πρόοδο της ωοθηκικής διέγερσης και πραγματοποιείται συνήθως όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φτάσει σε μέγεθος τα 16-18 χιλιοστά. Μετά την παρέλευση 36 ωρών από την ώρα της πρόκλησης, πραγματοποιείται συλλογή των ωαρίων μέσω διακολπικής παρακέντησης των ωοθυλακίων. Η διαδικασία αυτή καλείται ωοληψία και πραγματοποιείται υπό ήπια καταστολή (μέθη).

Το βραχύ πρωτόκολλο του ανταγωνιστή GnRH άρχεται με ημερήσια χορήγηση γοναδοτροπινών σε δόσεις κατά μέσο όρο 150-300 IU και ξεκινά συνήθως τη 2^η ημέρα του κύκλου. Η δοσολογία των χορηγούμενων γοναδοτροπινών ποικίλλει ανάλογα με την ωοθηκική απόκριση. Περίπου μετά την έκτη ημέρα της διέγερσης ή όταν το μέγεθος των κυρίαρχων ωοθυλακίων γίνει >14 χιλιοστά, άρχεται η υποδόρια χορήγηση του ανταγωνιστή GnRH. Και στα δύο πρωτόκολλα (αγωνιστή και ανταγωνιστή της GnRH), απαιτείται αυστηρή παρακολούθηση της διέγερσης μέσω κολπικού υπερηχογραφήματος και αξιολόγησης του ορμονικού προφίλ και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων της FSH, των οιστρογόνων και προγεστερόνης. Όπως και στη περίπτωση του πρωτοκόλλου του αγωνιστή GnRH, έτσι και στο βραχύ πρωτόκολλο του ανταγωνιστή, η πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας λαμβάνει χώρα όταν τα κυρίαρχα ωοθυλάκια φτάσουν σε μέγεθος τα 16-18 χιλιοστά. Τριάντα έξι ώρες αργότερα πραγματοποιείται η ωοληψία.

Το πρωτόκολλο της ήπιας διέγερσης περιλαμβάνει την χρήση της κιτρικής κλομιφαίνης (CC), που αποτελεί ένα ρυθμιστή των υποδοχέων οιστρογόνων και ένα ανταγωνιστικό αναστολέα της οιστραδιόλης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία γονιμότητας τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες (Zhang et al., 2010). Η αντι-οιστρογονική ιδιότητα της CC είναι το κύριο μειονέκτημα αυτής της θεραπείας. Ωστόσο, αργότερα ανακαλύφθηκε ότι αυτή ακριβώς η αντιοιστρογονική ιδιότητα μπορεί να προκαλέσει

καταστολή της πρόωρης αιχμής της LH, ώστε να διατηρηθεί η ωοθυλακιογένεση. Σε αυτό το πρωτόκολλο θεραπείας, η χορήγηση CC λαμβάνει χώρα την 6η ημέρα, ή νωρίτερα ανάλογα με την αύξηση των επιπέδων της LH και συνεχίζεται μέχρι τη πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας. Το πρωτόκολλο ήπιας διέγερσης που χρησιμοποιεί CC αποτελεί μια ελκυστική επιλογή, λαμβάνοντας υπόψη το χαμηλότερο κόστος, καθώς και τα παρόμοια ποσοστά εγκυμοσύνης σε σύγκριση με το πρωτόκολλο αγωνιστή GnRH. Ως εκ τούτου, αυτό το πρωτόκολλο μπορεί να θεωρηθεί καλύτερη επιλογή σε ασθενείς με πτωχό ωοθηκικό απόθεμα, ωστόσο δεν αποτελεί ιδανική λύση σε ασθενείς με φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία λόγω της μειωμένης ωοθυλακικής ανάπτυξης που επιτυγχάνει (Shrestha et al., 2015). Η λετροζόλη, ένας αναστολέας αρωματάσης, χρησιμοποιείται εναλλακτικά της CC στο πρωτόκολλο ήπιας διέγερσης σε συγκεκριμένους ασθενείς με αντοχή στην χορήγηση CC. Ωστόσο, η λετροζόλη αναπτύχθηκε αρχικά για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού και εξακολουθεί να μην έχει εγκριθεί για χρήση ως μέσο διέγερσης των ωοθηκών (Shrestha et al., 2015).

Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου εξωσωματικής γονιμοποίησης δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένα. Η χρήση των πρωτοκόλλων ωοθηκικής διέγερσης σε κάθε ασθενή βασίζεται συνήθως στην απόφαση του ιατρού, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τα οφέλη και τα μειονεκτήματα κάθε επιλογής θεραπείας και, κυρίως, στην ανταπόκριση του ασθενή. Συνήθως, τα επίπεδα FSH, ο αριθμός των ωαρίων, το ποσοστό ακύρωσης κύκλου, η δόση γοναδοτροπίνης και τα επίπεδα οιστραδιόλης χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για την αξιολόγηση της απόκρισης των ωοθηκών (Oehninger, 2011). Αν και διεξάγονται πολλές μελέτες για να προσδιοριστεί ποιο πρωτόκολλο είναι κατάλληλο για ασθενείς σε καθεμία από τις κατηγορίες απόκρισης, δεν υπάρχει σαφής συναίνεση για το θέμα, καθώς κάθε πρωτόκολλο συνοδεύεται από πλεονεκτήματα, αλλά και περιορισμούς (Shrestha et al., 2015). Με τα συμβατικά πρωτόκολλα διέγερσης, ο βέλτιστος αριθμός ωαρίων είναι ο μέγιστος που μπορεί να ανακτηθεί με ασφάλεια, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των εμβρύων που διατίθενται για κρυοσυντήρηση, με στόχο να βοηθήσει τους ασθενείς να ολοκληρώσουν την οικογένειά τους στον λιγότερο αριθμό διεγερμένων κύκλων. Από την άλλη πλευρά, τα ήπια πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης χρησιμοποιούν χαμηλές δόσεις γοναδοτροπινών και η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη έχει αναδείξει σημαντικά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των

ανακτηθέντων ωαρίων είναι μικρός (Lefebvre et al., 2015; Nargund et al., 2007; Siristatidis et al., 2012). Στην Εικόνα 20 συνοψίζονται οι τρεις κατηγορίες ασθενών που προκύπτουν ανάλογα με την απόκρισή τους στα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης, καθώς και οι κατευθυντήριες οδηγίες που έχουν προταθεί για τη διαχείριση αυτών των ασθενών σε επόμενους κύκλους.



Εικόνα 20. Σχηματική επισκόπηση των κατευθυντήριων γραμμών για την ωοθηκική διέγερση σε κύκλους IVF/ICSI (Ovarian Stimulation et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονη προτίμηση στα πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης, τα οποία προσφέρουν πιο προσιτές και ασφαλέστερες επιλογές για τους ασθενείς. Αντίστοιχα με τα συμβατικά πρωτόκολλα διέγερσης όπου καλύπτουν ένα εύρος διαφορετικών προσεγγίσεων, η έννοια της «ήπιας διέγερσης» ποικίλλει επίσης. Τα πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης συνήθως χαρακτηρίζονται από την χρήση χαμηλότερης δόσης (50-150 IU/ημέρα), μικρότερη διάρκεια εξωγενών γοναδοτροπινών ή και τα δύο, σε σύγκριση με τα συμβατικά πρωτόκολλα. Τέτοια πρωτόκολλα στόχο έχουν να περιορίσουν τον τελικό αριθμό των ανακτηθέντων ωοκυττάρων σε λιγότερο από οκτώ (Fauser et al., 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό εγκυμοσύνης ανά κύκλο είναι χαμηλότερο με

ήπια διέγερση σε σύγκριση με τα συμβατικά πρωτόκολλα διέγερσης, τα οποία όμως μπορεί να αποτελούν παράγοντα κινδύνου σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας. Εντούτοις, το cumulative pregnancy rate είτε από φρέσκους είτε από κρυοσυντηρημένους κύκλους αποδείχθηκε συγκρίσιμο και με τις δύο προσεγγίσεις (Fatemi et al., 2013; Heijnen et al., 2007). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις επιπτώσεις της ήπιας ωθηκικής διέγερσης έναντι της συμβατικής διέγερσης στην ποιότητα των ωαρίων δεν είναι επαρκή για να δώσουν σαφή απάντηση, αντιθέτως καταλήγουν σε αντικρουόμενα συμπεράσματα (Arce et al., 2014; Baart et al., 2007; Labarta et al., 2012). Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα κύρια σημεία ενδιαφέροντος στα οποία εστιάζει η βιβλιογραφία σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του συμβατικού και του ήπιου πρωτοκόλλου διέγερσης.

Πίνακας 1. Σύνοψη των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που χαρακτηρίζουν τα συμβατικά πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης έναντι των πρωτοκόλλων ήπιας διέγερσης (Alper and Fauser, 2017).

Συμβατικό Πρωτόκολλο Διέγερσης	Ήπιο Πρωτόκολλο Διέγερσης
Πλεονεκτήματα	
Μεγιστοποιεί τον αριθμό των ανακτηθέντων ωαρίων	Μειωμένο ποσοστό επιπλοκών
Μεγιστοποιεί τον αριθμό των διαθέσιμων εμβρύων για κρυοσυντήρηση	Μικρότερες δόσεις γοναδοτροπινών
Επιθυμητά αποτελέσματα για τους ασθενείς σε μικρότερο συνολικά αριθμό κύκλων διέγερσης	Πιθανή συσχέτιση με καλύτερη ποιότητα εμβρύων
Υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης σε κάθε κύκλο	Μειωμένο ποσοστό drop-out ανά κύκλο
Μειονεκτήματα	
Αυξημένος κίνδυνος επιπλοκών όπως OHSS	Υψηλότερο ποσοστό ακύρωσης ανά κύκλο (πιθανώς να απαιτηθούν περισσότεροι κύκλοι για την επίτευξη εγκυμοσύνης)
Υψηλότερο κόστος ανά κύκλο λόγω μεγαλύτερης δόσης γοναδοτροπινών	Μικρότερος αριθμός διαθέσιμων εμβρύων για κρυοσυντήρηση
Υψηλότερο ποσοστό drop-out ανά κύκλο	Συγκριτικά αυξημένο κόστος το οποίο σχετίζεται με την πιθανότητα να απαιτηθούν πολλαπλοί κύκλοι για τη συλλογή του επιθυμητού αριθμού ωαρίων/εμβρύων

Εν κατακλείδι, τα ολοένα αυξανόμενα ποσοστά επιτυχίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μπορούν εν μέρει να αποδοθούν στη βελτιστοποίηση και την εξέλιξη των πρωτοκόλλων διέγερσης. Εντούτοις, οι έντονες αποκλίσεις αναφορικά με την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη είναι ενδεικτικές της έλλειψης αδιάσειστων στοιχείων σε ερευνητικό επίπεδο. Οι δοκιμασίες ελέγχου του ωθητικού αποθέματος θεωρούνται αξιόπιστες για την πρόβλεψη της απόκρισης των ωθηκών σε σύγκριση με την ηλικία, όμως τα αποτελέσματα των δοκιμασιών δεν μπορούν να συσχετιστούν με την έκβαση ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μια τυποποιημένη δόση γοναδοτροπινών θεωρείται η καταλληλότερη επιλογή σε γυναίκες που αναμένεται να εμφανίσουν φυσιολογική απόκριση, ενώ εξατομικευμένες δόσεις προτείνονται σε γυναίκες που είτε διατρέχουν κίνδυνο πτωχής απόκρισης, είτε υπερδιέγερσης (Howie and Kay, 2018).

1.4.4 Συστήματα καλλιέργειας εμβρύων και γαμετών

Οι σάλπιγγες αποτελούν το φυσικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η γονιμοποίηση των ανθρώπινων ωαρίων και παρέχουν τις βέλτιστες συνθήκες για το αναπτυσσόμενο έμβρυο πριν φτάσει στην κοιλότητα του ενδομητρίου για να επιτευχθεί η εμφύτευση (Hambiliki et al., 2011). Για αυτό το λόγο, τα μέσα καλλιέργειας γαμετών και εμβρύων που χρησιμοποιούνται σε όλες τις διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στόχο έχουν να προσφέρουν τις ιδανικές συνθήκες που θα επιτρέψουν την γονιμοποίηση, όπως ακριβώς συμβαίνει στις σάλπιγγες. Οι συνθήκες καλλιέργειας παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη εμβρύων και συνεπώς στην εξέλιξη μιας εγκυμοσύνης (Hambiliki et al., 2011; Lonergan et al., 2003). Λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη βασική αρχή, έχουν αναπτυχθεί δύο διαφορετικές προσεγγίσεις στα μέσα καλλιέργειας. Η μία βασίζεται στην εναλλαγή διαδοχικών μέσων καλλιέργειας διαφορετικής σύνθεσης (Sequential), τα οποία είναι σχεδιασμένα να μιμούνται τις *in vivo* συνθήκες και τις εναλλαγές περιβάλλοντος που υφίσταται το πρώιμο έμβρυο από τις σάλπιγγες έως τη μήτρα. Η άλλη αρχή βασίζεται σε ένα μέσο καλλιέργειας (Single-Step) που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη ενός εμβρύου έως και το στάδιο της βλαστοκύστης (Biggers and Summers, 2008; Paternot et al., 2010). Αρκετοί ερευνητές έχουν συγκρίνει τα κλινικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τους δύο διαφορετικούς τύπους μέσων καλλιέργειας, αλλά παρά τις πολυάριθμες δημοσιεύσεις για το θέμα, η πλειοψηφία χαρακτηρίζεται από σοβαρά μεθοδολογικά λάθη και ανεπαρκές μέγεθος δείγματος (Campo et al., 2010; Macklon et al.,

2002; Scarica et al., 2015; Sepúlveda et al., 2009; Sfontouris et al., 2016; Sfontouris IA, 2015). Συνοπτικά, θεωρείται πως η χρήση των single-step μέσων καλλιέργειας μπορεί με πολλούς τρόπους να είναι επωφελής στην εργαστηριακή πρακτική. Αυτή η μέθοδος απαιτεί χειρισμό εμβρύων σε περιορισμένο βαθμό και έτσι ελαχιστοποιεί τις πιθανότητες πρόκλησης βλάβης στο έμβρυο, λαμβάνοντας υπόψη ότι ανεξάρτητα από το επιλεγμένο σύστημα καλλιέργειας, τα έμβρυα πρέπει συχνά να απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο για να αξιολογείται η ανάπτυξή τους, εκθέτοντάς τα έτσι σε κυτταρικό stress και ROS. Επιπλέον, παρέχει επίσης ένα εξαιρετικά σταθερό περιβάλλον καλλιέργειας εμβρύων και μειώνει το συνολικό κόστος (Machtinger and Racowsky, 2012). Ωστόσο, όσον αφορά τα κλινικά αποτελέσματα των κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης τα single-step και τα sequential μέσα καλλιέργειας δεν φαίνεται να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές (Dieamant et al., 2017).

Στο πλαίσιο εξασφάλισης ενός ιδανικού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη των εμβρύων, το εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης επιδιώκει συνεχώς τη βελτιστοποίηση των συστημάτων καλλιέργειας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από συστηματικό έλεγχο των παραμέτρων καλλιέργειας όπως είναι, η μέτρηση του pH των καλλιεργητικών υλικών, η αξιολόγηση της θερμοκρασίας των κλιβάνων, της ωσμωτικότητας των καλλιεργητικών υλικών, αλλά και της ποιότητας του αέρα, τόσο των επωαστικών κλιβάνων, όσο και του αέρα του εργαστηρίου. Ως εκ τούτου, ο επωαστικός κλίβανος αποτελεί αναμφισβήτητα το πιο σημαντικό κομμάτι εξοπλισμού στο εργαστήριο, καθώς ελέγχει πολλαπλές περιβαλλοντικές μεταβλητές και «φιλοξενεί» τα έμβρυα. Με την πρόοδο της τεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικοί τύποι επωαστικών κλιβάνων με διαφορετικές δυνατότητες και διαφορετικές μεθόδους για την ρύθμιση και εξασφάλιση της σταθερότητας του εσωτερικού τους περιβάλλοντος. Αν και οι καινοτομίες που αφορούν στην καλλιέργεια των εμβρύων τείνουν να εξαλείψουν την ανάγκη για χρήση των παραδοσιακών επωαστικών κλιβάνων, προς το παρόν έχουν ένα κυρίαρχο ρόλο στη λειτουργία ενός σύγχρονου εργαστηρίου εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Λειτουργικά χαρακτηριστικά του επωαστικού κλιβάνου, όπως ο τύπος του αισθητήρα που χρησιμοποιεί, καθώς και ο έλεγχος θερμοκρασίας και ο αριθμός ασθενών που μπορεί να φιλοξενήσει ανάλογα με την χωρητικότητά του, αποτελούν παράμετροι που πρέπει να αξιολογούνται. Μικρότεροι επωαστικοί κλιβάνοι, ειδικότερα οι benchtop/topload, χαρακτηρίζονται από ταχύτερη αποκατάσταση των συνθηκών αερίου και της θερμοκρασίας.

Ωστόσο, καμία μελέτη δεν έχει καταδείξει σαφές πλεονέκτημα υπέρ ενός συγκεκριμένου τύπου επωαστικού κλιβάνου όσον αφορά στην ανάπτυξη των εμβρύων και στα κλινικά αποτελέσματα. Πρακτικά ζητήματα, όπως το κόστος, ο διαθέσιμος χώρος, αλλά και οι ρεαλιστικές ανάγκες ενός εργαστηρίου ανάλογα με το φόρτο εργασίας πρέπει να συνυπολογίζονται εξίσου. Είναι πιθανό ένας συνδυασμός διαφορετικών τύπων επωαστικών κλιβάνων, συμπεριλαμβανομένων large-box, small-box και benchtop/topload μέσα σε ένα εργαστήριο να βοηθήσει ιδιαίτερα σε διαφορετικά σενάρια που μπορεί να προκύψουν, καθώς προσφέρει ελευθερία και πολλές επιλογές στην καθημερινή ρουτίνα, ενώ παράλληλα επιτρέπει και την ενσωμάτωση νέων αναδυόμενων τεχνολογιών που προκύπτουν και αναβάθμιση του εξοπλισμού. Για την μέγιστη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων ενός επωαστικού κλιβάνου, δεν απαιτείται μόνο η γνώση της σωστής λειτουργίας του, αλλά και η σωστή διαχείριση της ροής των περιστατικών και η εκτέλεση των απαιτούμενων ελέγχων ποιότητας (Swain, 2014).

Η σωστή αξιολόγηση της βιωσιμότητας και της ποιότητας του εμβρύου διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό της επιτυχίας μιας θεραπείας εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται κυρίως στη βελτίωση των ποσοστών εμφύτευσης, στη μείωση των ποσοστών αποβολής και στην ευαισθησία της ανίχνευσης της ανευπλοειδίας στα έμβρυα. Η επιτυχία της εμφύτευσης εξαρτάται στον ίδιο βαθμό τόσο από τη επαρκή ανάπτυξη του ενδομητρίου όσο και από την ποιότητα του εμβρύου (Weimar et al., 2013). Οι τρέχουσες τεχνικές αξιολόγησης της ποιότητας και επιλογής των εμβρύων δεν είναι αρκετά αξιόπιστες και οδηγούν πολλές φορές σε σφάλματα. Κατά συνέπεια, προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχίας, πραγματοποιούνται μεταφορές πολλαπλών εμβρύων με τον κίνδυνο των σοβαρών επιπλοκών που συνοδεύουν τις πολύδυμες κήσεις (Aparicio-Ruiz et al., 2018). Καθώς η μεταφορά ενός και μόνο εμβρύου αποτελεί την ιδανική συνθήκη που αποκτά συνεχώς έδαφος στην κλινική πράξη, η ανάγκη για βελτιστοποίηση των τεχνικών επιλογής των καταλληλότερων εμβρύων μεγαλώνει. Ο προσδιορισμός των μεταβλητών που καθορίζουν ποιο έμβρυο έχει το μεγαλύτερο δυναμικό εμφύτευσης, ιδίως όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός καλής ποιότητας εμβρύων, θα μπορούσε να οδηγήσει στην βελτίωση του ποσοστού γέννησης ζώντων και υγιών νεογνών (live-birth rate) (Gallego et al., 2019). Στο πλαίσιο αυτής της ανάγκης για εξασφάλιση ιδανικών συνθηκών καλλιέργειας με ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των τεχνικών επιλογής των καλύτερων εμβρύων, το time-lapse imaging αποτέλεσε μια καινοτόμα προσθήκη στη φαρέτρα των κλινικών.

Τα συστήματα time-lapse imaging λαμβάνουν ψηφιακές εικόνες εμβρύων σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Τα τελευταία χρόνια κυκλοφορούν στην αγορά ως ολοκληρωμένα συστήματα επώασης και χρήσης της τεχνολογίας time-lapse. Χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο λογισμικό, οι εικόνες συλλέγονται για τη δημιουργία μιας ακολουθίας time-lapse που αποτυπώνει την αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων, καταργώντας έτσι την ανάγκη τα έμβρυα να απομακρύνονται από τον επωαστικό κλίβανο και να υποβάλλονται σε μορφολογική αξιολόγηση από τον εμβρυολόγο (Armstrong et al., 2015). Επιπλέον, ορισμένα συστήματα time-lapse imaging χρησιμοποιούν λογισμικό που επιτρέπει την αξιολόγηση αναπτυξιακών ορόσημων των εμβρύων, γνωστών και ως μορφοκινητικών παραμέτρων, για να προσφέρουν μια ημι-ποσοτική αξιολόγηση των εμβρύων (Conaghan et al., 2013), η οποία ξεφεύγει από την κλασική αυστηρή μορφολογική παρατήρηση. Αυτά τα λογισμικά περιλαμβάνουν αλγορίθμους παρακολούθησης των κυττάρων και αποτελούν τον πλέον σύγχρονο, μη επεμβατικό τρόπο επιλογής εμβρύων με το υψηλότερο δυναμικό εμφύτευσης, εξαλείφοντας εντελώς σφάλματα από την υποκειμενικότητα της κρίσης του κάθε εμβρυολόγου. Έτσι, η εισαγωγή του time-lapse imaging στην κλινική πράξη έδωσε τη δυνατότητα συνεχούς παρακολούθησης του χρονοδιαγράμματος των γεγονότων που διαδραματίζονται κατά την ανάπτυξη ενός εμβρύου μέσω διαχείρισης του λογισμικού τους και παρακολούθηση των time-lapse videos που προβάλλονται μέσω υπολογιστή. Η χρονική διάρκεια του κάθε κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης εμβρύου είναι πλέον εφικτό να καταγραφεί, προκειμένου να εντοπιστούν ανωμαλίες και αποκλίσεις (Gallego et al., 2019). Παρόλο που πολλές δημοσιεύσεις έχουν επισημάνει τα οφέλη από τη χρήση συστημάτων time lapse imaging για την καλλιέργεια και την αξιολόγηση εμβρύων, ορισμένες πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν αμφισβητήσει την αξία τους ισχυριζόμενες ότι τα κλινικά τους οφέλη δεν έχουν ακόμα αποδειχθεί επαρκώς (Kaser and Racowsky, 2014, p. 200; Paulson et al., 2018; Racowsky and Martins, 2017). Εντούτοις, η εφαρμογή της τεχνολογίας time-lapse σε εργαστήρια εξωσωματικής γονιμοποίησης εξαπλώθηκε γρήγορα λόγω της μη επεμβατικής αξιολόγησης των εμβρύων που επιτρέπει, καθώς και της διατήρησης των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας χωρίς διακυμάνσεις που εξασφαλίζει. Η αξιολόγηση των εμβρύων μέσω της ανάλυσης και παρατήρησης του time-lapse imaging, χωρίς να απαιτείται η έκθεση του εμβρύου στις περιβαλλοντικές συνθήκες, υποθετικά μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη ανάπτυξη των εμβρύων μιας και οι συνθήκες αυτές μιμούνται την *in vivo* ανάπτυξη (Gallego et al., 2019).

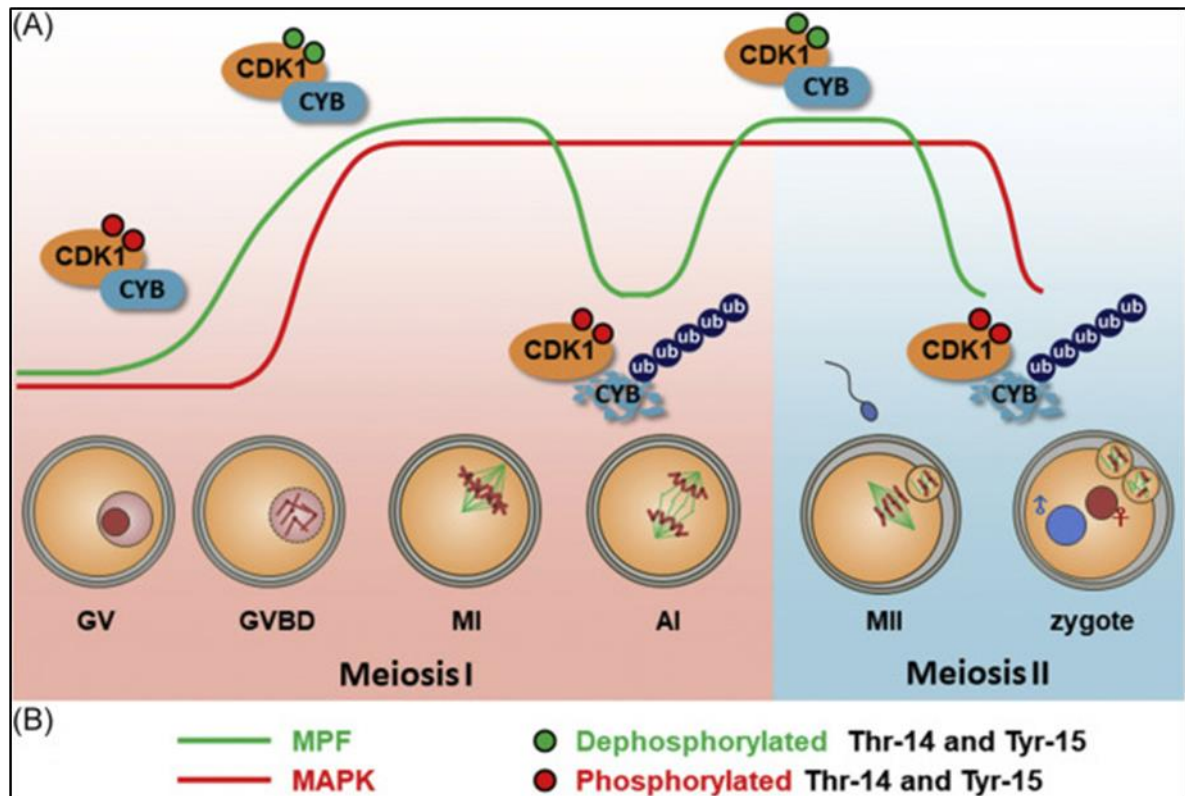
1.5 Πρόκληση βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων: Αίτια και Αποτελέσματα

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό πως η διατήρηση της ακεραιότητας της δομής και της οργάνωσης του γονιδιώματος είναι εξέχουσας σημασίας για τη διατήρηση της λειτουργίας και την επιβίωση των οργανισμών, δεδομένης της συχνότητας δημιουργίας μεταλλάξεων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού έχουν εξελικτικά δημιουργηθεί πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί ανίχνευσης και επιδιόρθωσης των βλαβών που αφορούν τόσο σημειακές μεταλλάξεις, όσο και δομικές και αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη μελέτη και τη κατανόηση των στοιχείων απόκρισης σε βλάβες του DNA στα σωματικά κύτταρα, υπάρχουν έως και σήμερα μεγάλα κενά και διχογνωμίες στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με την δυνατότητα απόκρισης και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των γαμετών και πιο ειδικά στο DNA των ωοκυττάρων των θηλαστικών. Η δυσκολία στη μελέτη έγκειται κυρίως στην πολύπλοκη φύση του κύκλου ζωής των ωοκυττάρων, ο οποίος άρχεται κατά την εμβρυϊκή φάση της ανάπτυξης και μπορεί να ολοκληρωθεί μέρες, μήνες ή και πολλά χρόνια αργότερα κατά την ενηλικίωση και την αναπαραγωγική ωρίμανση των θήλεων ατόμων (García-Rodríguez et al., 2019). Στις σημαντικές αυτές δυσκολίες έρχεται να προστεθεί και η δυσκολία μελέτης των μηχανισμών αυτών στα ανθρώπινα ωοκύτταρα, δεδομένου πως αποτελούν βιολογικό υλικό που τίθεται δύσκολα προς διάθεση για έρευνα, καθώς αυτά μπορούν να ανακτηθούν κυρίως στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Παρά τις δυσκολίες αυτές, η διερεύνηση των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων είναι μείζονος σημασίας τόσο σε επίπεδο βασικής, όσο και σε επίπεδο κλινικής έρευνας, δεδομένου πως βλάβες στο γενετικό υλικό των ωοκυττάρων μπορούν να μεταφερθούν στα έμβρυα και άρα στις επόμενες γενιές, ενώ οι βλάβες αυτές μπορούν να αποτελέσουν αυτές καθαυτές αίτια υπογονιμότητας, αλλά και αποτυχίας εμφύτευσης, επαναλαμβανόμενων αποβολών και ανωμαλιών στα έμβρυα (García-Rodríguez et al., 2019).

1.5.1 Μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων

Η διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της πιστότητας της γενετικής πληροφορίας κατά την ωογένεση είναι μείζονος σημασίας για την υγεία του εμβρύου. Οι ανωμαλίες στο γονιδίωμα των ωοκυττάρων που μπορούν να απειλήσουν άμεσα το

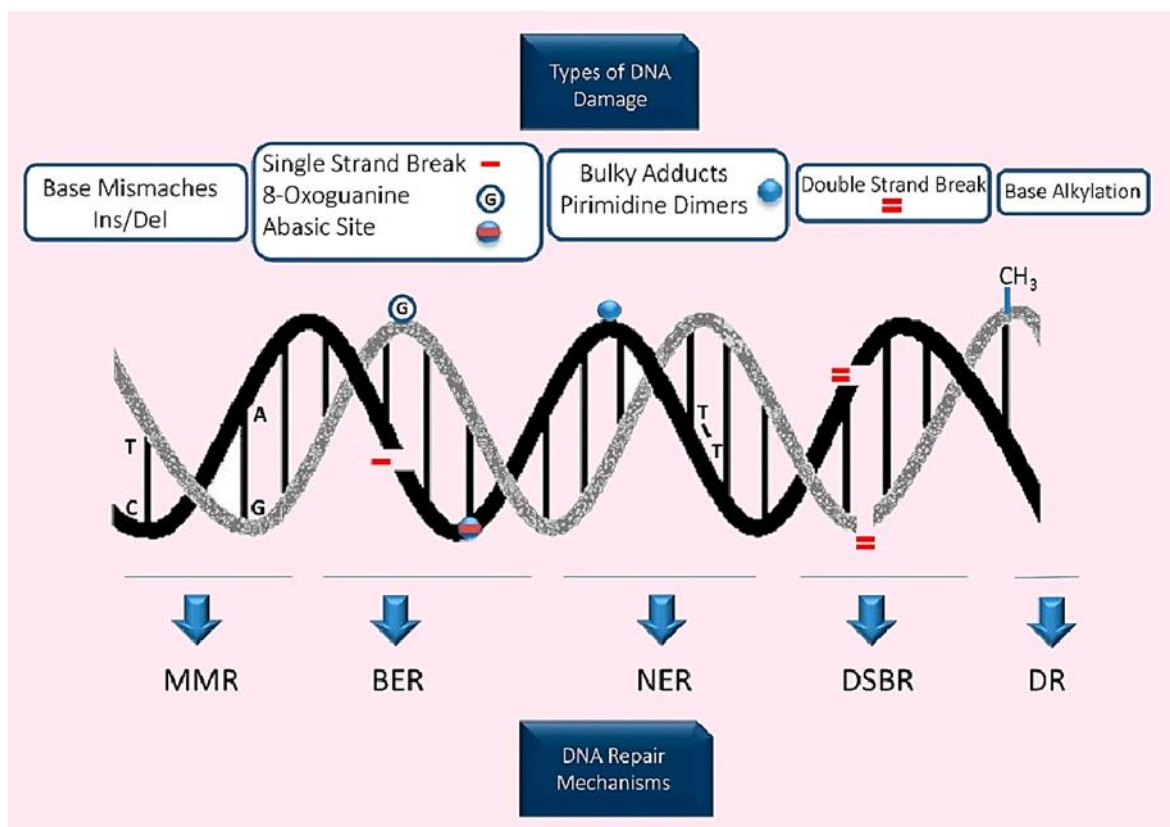
αναπαραγωγικό δυναμικό περιλαμβάνουν την ανευπλοειδία, δηλαδή την απώλεια ή την προσθήκη ολόκληρων χρωμοσωμάτων, καθώς και τις βλάβες στο επίπεδο του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε μεταλλάξεις. Οι βλάβες θεωρούνται ιδιαίτερα επικίνδυνες στην τελική φάση της ωογένεσης, όπου τα ωοκύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV) ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση και υφίσταται διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle breakdown, GVBD), ενώ παράλληλα και μέσω της λειτουργίας της μειωτικής ατράκτου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ομολόγων χρωμοσωμάτων μεταξύ του 1^{ου} πολικού σωματίου (polar body extrusion, PBE) και του ωοκυττάρου το οποίο και εισέρχεται άμεσα στην δεύτερη μειωτική διαίρεση και χαρακτηρίζεται ως ωάριο μετάφασης II (metaphase II, MII) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της μειωτικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων των θηλαστικών, με ταυτόχρονη απεικόνιση του διαγράμματος της ενεργοποίησης δύο εκ των σημαντικότερων ρυθμιστών της μειωτικής ωρίμανσης, του παράγοντα προώθησης της ωρίμανσης (maturation promoting factor, MPF) και της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποίησης της μίτωσης (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Η ενεργότητα του MPF καθορίζεται από την ενεργοποίηση της CDK1, η οποία και αποτελεί σημαντικό κομμάτι του συμπλόκου MPF. Κατά τη διάρκεια της ανάφασης I και II παρατηρείται απενεργοποίηση της CDK1 μέσω επανα-φωσφορυλίωσης και πρωτεολυτική αποδόμηση της κυκλίνης B, η οποία και αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο του MPF, με αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης του MPF.

Δεδομένου του αντίκτυπου των βλαβών στην φάση αυτή της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, είναι ιδιαίτερα σημαντική η κατανόηση και η περιγραφή των μηχανισμών πρόκλησης των βλαβών, αλλά και των μηχανισμών μέσω των οποίων τα ωοκύτταρα μπορούν να ανιχνεύσουν και να επιδιορθώσουν τόσο τις αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όσο και τις βλάβες του DNA, με απώτερο σκοπό την κατανόηση του “πώς” σχηματίζονται εν τέλει τα “υγιή” ωοκύτταρα (Rémillard-Labrosse et al., 2020).

Πιο αναλυτικά και εστιάζοντας στις βλάβες του DNA των ωοκυττάρων, οι οποίες αποτελούν και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι γνωστό πως ποικίλες βλάβες στο DNA παρατηρούνται σε όλα τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των ωοκυττάρων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Οι βασικές κατηγορίες βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων και οι αντίστοιχη μηχανισμοί επιδιόρθωσης (τροποποιημένο από: García-Rodríguez et al., 2019).

Όπως παρουσιάστηκε στα προηγούμενα κεφάλαια οι βλάβες αυτές είναι αποτέλεσμα της επίδρασης τόσο ενδογενών, όσο και εξωγενών παραγόντων και χαρακτηρίζονται από ποικίλες αλλαγές στην διπλή έλικα του DNA, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι

σημειακές μεταλλάξεις, τα DSBs και τα SSBs, οι τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων και πολλές άλλες. Αναφορικά με τα ωάρια, η μελέτη των μηχανισμών πρόκλησης βλαβών στο DNA καθίσταται δύσκολη και τα δεδομένα είναι σχετικά περιορισμένα, δεδομένου πως η χρήση ωαρίων για ερευνητικούς σκοπούς καθίσταται δύσκολη και ακόμα πιο δύσκολη σε επίπεδο *in vivo* έρευνας. Είναι όμως πλέον κοινώς αποδεκτό πως υπάρχουν ειδικές φάσεις του κύκλου ζωής, όπου τα ωάρια καθίσταται ιδιαίτερα ευαίσθητα σε βλάβες του DNA, ειδικά από εξωγενείς παράγοντες, όπου στις φάσεις αυτές παρατηρείται και η μεγαλύτερη συσσώρευση βλαβών στο DNA. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως τα ωάρια είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στις βλάβες του DNA, όταν ο μηχανισμός των μειωτικών διαιρέσεων είναι ενεργός. Αυτό συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ζωή, όταν τα πρώιμα ωάρια των αρχέγονων ωοθυλακίων εισέρχονται στην πρόφαση I και κατά τη διάρκεια της ενήλικου ζωής, όταν τα ωάρια υφίσταται τη τελική μειωτική τους ωρίμανση, κατά τη διάρκεια της προ-ωοθηλακιορρηκτικής φάσης του έμμηνου κύκλου (Zenzes, 2000).

Αναγνωρίζοντας τη σημασία των παραπάνω, είναι σημαντικό να επισημάνουμε τους βασικούς μηχανισμούς και τα κυριότερα αίτια πρόκλησης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων. Μία από τις σημαντικότερες και πιο αναγνωρισμένες πηγές βλαβών είναι το οξειδωτικό stress. Όπως παρουσιάστηκε εκτενώς στην υποενότητα 1.2.1, οι ROS μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη ποιότητα και το δυναμικό ανάπτυξης των ωαρίων, επιδρώντας μεταξύ των άλλων και στο επίπεδο του DNA, μέσω της πρόκλησης κατακερματισμού και DSBs. Ως αποτέλεσμα, δύνανται να επηρεαστεί αρνητικά το αναπαραγωγικό δυναμικό, με αρνητικό αντίκτυπο τόσο στην επίτευξη φυσικών συλλήψεων, όσο και της επιτυχούς έκβασης της IVF. Τα ωάρια κατά τη διάρκεια της ζωής τους εκτίθενται σε ποικίλες πηγές ROS μέσα στις ωοθήκες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα παρεγχυματικά στεροειδή κύτταρα και τα μακροφάγα που επιτελούν την φαγοκυττάρωση παθογόνων μικροοργανισμών αποτελούν τις κύριες πηγές ROS στις ωοθήκες (Krisher, 2013). Παρά την γενική άποψη πως η παρουσία των ROS στο μικροπεριβάλλον των ωοθηκών είναι αρνητική, σήμερα γνωρίζουμε πως η παρουσία τους σε συγκεκριμένα ρυθμιζόμενα επίπεδα είναι απαραίτητη για την επιτέλεση βασικών φυσιολογικών διεργασιών εντός των ωοθηκών, όπως είναι η ωοθυλακιογένεση, η ωρίμανση των ωαρίων, η ωοθυλακιορρηξία και η λειτουργία του ωχρού σωματίου (García-Rodríguez et al., 2019). Το γεγονός αυτό δεν πρέπει να μας προκαλεί έκπληξη, δεδομένου πως όλες οι διεργασίες που προαναφέρθηκαν, εμπλέκουν φλεγμονώδεις μηχανισμούς ρύθμισης για την επιτέλεσή τους και ως αποτέλεσμα αυτές καθαυτές αποτελούν πηγές ROS (Espey, 1994; Richards et

al., 2002). Επιπρόσθετα, οι ROS εμπλέκονται στην φυσιολογική λειτουργία των σαλπίνγων, ενώ τα επίπεδά τους παρουσιάζουν αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια των αλλαγών που υφίσταται το ενδομήτριο στο πλαίσιο του καταμήνιου κύκλου (Agarwal et al., 2005). Λόγω της φυσιολογικής τους έκθεσης σε ROS, τα ωοκύτταρα έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστασίας, η παρουσία των οποίων γίνεται ιδιαίτερα έντονη κατά τη φάση της ωοθυλακιορρηξίας, όπου τα ωάρια εκτίθενται ολοκληρωτικά στο μικροπεριβάλλον των ωοθηκών, όπως φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών παραγόντων που υπάρχουν στο ωοθυλακικό υγρό (Carbone et al., 2003; Guérin et al., 2001; Revelli et al., 2009). Φαίνεται λοιπόν πως τα ωάρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανοχής, που επιτρέπουν τη διατήρηση της ποιότητάς και του δυναμικού τους, όταν τα επίπεδα των ROS βρίσκονται εντός φυσιολογικού εύρους.

Ωστόσο, διάφοροι παράμετροι όπως ο τρόπος ζωής (life style), το κάπνισμα, η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η γήρανση, αλλά και παθολογικές καταστάσεις που εν δυνάμει οδηγούν σε υπογονιμότητα, όπως είναι η ενδομητρίωση, μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία αυτή, οδηγώντας σε εξεζητημένη αύξηση των επιπέδων των ROS εντός του μικροπεριβάλλοντος των ωοθηκών (García-Rodríguez et al., 2019; Simopoulou et al., 2021). Στις περιπτώσεις αυτές, όπου παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση των ROS στις ωοθήκες, καταρρέουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί προστασίας των ωοκυττάρων με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται σημαντικά η ποιότητα, το δυναμικό και η γονιμοποιητική ικανότητα των ωαρίων, τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* (Behrman et al., 2001; Jozwik et al., 1999; Krisher, 2013; Simopoulou et al., 2021). Πέραν της επίδρασης των ROS στο DNA των ωοκυττάρων, έχει περιγραφεί πως οι ROS μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού και των μικροσωληνίσκων, αυξάνοντας σημαντικά τη συχνότητα λαθών κατά των διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στις μειωτικές διαιρέσεις, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ανευπλοειδίας στα έμβρυα (du Plessis et al., 2008). Επιπρόσθετα, τα αυξημένα επίπεδα ROS στις σάλπιγγες και στο μικροπεριβάλλον της περιτοναϊκής κοιλότητας μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τους γαμέτες και το δυναμικό τους για αλληλεπίδραση και συγγαμία εντός των σαλπίνγων, οδηγώντας σε αποτυχία γονιμοποίησης. Οι γνώσεις αυτές, πέραν της σημασίας τους στην κατανόηση των μηχανισμών που ενέχονται στην πρόκληση βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, έχουν και άμεση κλινική σημασία. Έχει καταδειχθεί πως η χρήση αντιοξειδωτικών μέσων, όπως είναι η μελατονίνη, η L-carnitine, το σελίνιο και η N-ακετυλ-κυστεΐνη, ως επικουρικά θεραπευτικά σκευάσματα και ως μέσα εμπλουτισμού των

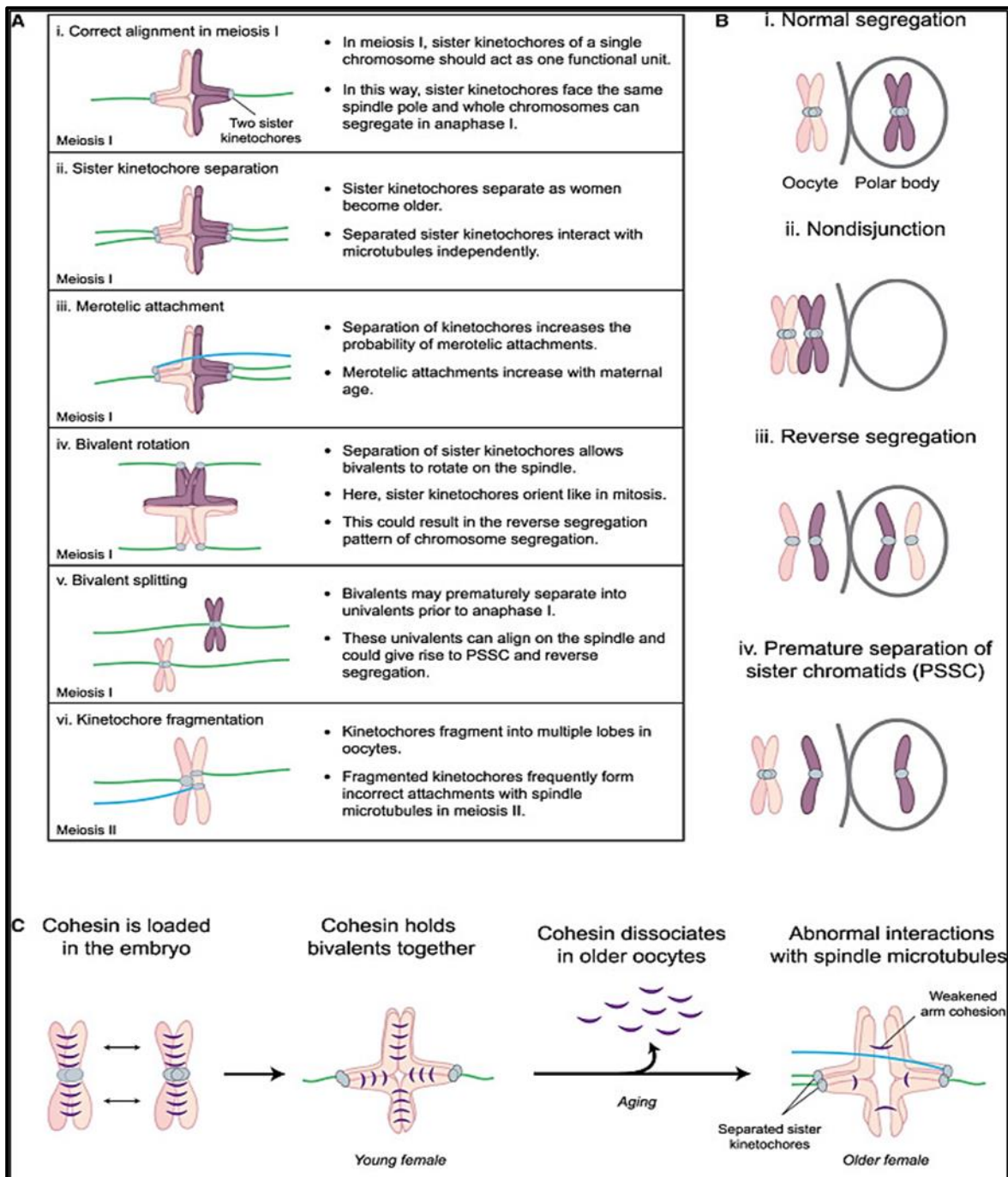
καλλιεργητικών υλικών, μπορεί να περιορίσει σημαντικά τις βλαπτικές επιδράσεις των ROS, βελτιώνοντας σημαντικά τη ποιότητα των ωαρίων και συνεπώς τα ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης (Agarwal et al., 2014).

Πέραν του οξειδωτικού stress και των ROS που αποτελούν ίσως τους βασικότερους μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, φαίνεται πως και οι *de novo* μεταλλάξεις (*de novo* mutations, DNMs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Πρόκειται για "νέες", μη κληρονομικές αλλαγές στο γενετικό υλικό, οι οποίες είναι παρούσες στο DNA των ατόμων που τις φέρουν, αλλά απουσιάζουν από τα σωματικά κύτταρα των γονέων τους. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να προκύψουν κατά την γαμετογένεση, μετα-ζυγωτικά ή κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής φάσης της ανάπτυξης (postnatal life), ωστόσο μόνον αυτές που είναι παρούσες στην αρχέγονη γαμετική σειρά (germ cells) θα μεταβιβαστούν στην επόμενη γενιά (Lynch, 2010). Μεταξύ των DNMs περιλαμβάνονται τα single nucleotide variants (SNVs), οι μικρές ενθέσεις (insertions) ή απαλοιφές (deletions) βάσεων (indels <1000 bp) και τα large copy-number variants (CNVs). Οι DNMs μπορούν να προκύψουν μέσω πολλαπλών μοριακών μηχανισμών, όπως είναι τα λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, η επίδραση διαφόρων ενδογενών και εξωγενών μεταλλαξογόνων παραγόντων, ή μπορεί να είναι αποτέλεσμα λαθών που συμβαίνουν κατά την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA και κυρίως κατά την επιδιόρθωση των DSBs, αλλά και των SSBs (Ségurel et al., 2014). Η συχνότητα εμφάνισης DNMs ποικίλει ανάλογα με τον τύπο και υπολογίζεται πως ανά νέα γενιά σχηματίζονται περίπου 74 νέα SNVs, 3 ενθέσεις ή απαλοιφές βάσεων (indels) και 0.02 CNVs (Veltman and Brunner, 2012). Η μελέτη των DNMs παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου πως όλο και περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα που προέρχονται από μελέτες στις οποίες εφαρμόζονται οι πλέον εξελιγμένες τεχνικές αλληλούχισης του γονιδιώματος, καταδεικνύουν την άρρηκτη σχέση τους με την εμφάνιση σοβαρών παθολογικών καταστάσεων πρώιμης εμφάνισης, όπως είναι οι αναπτυξιακές διαταραχές, ο αυτισμός και η νοητική υστέρηση (Iossifov et al., 2014; Vissers et al., 2010). Επίσης, μελέτες δείχνουν πως οι DNMs παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση ασθενειών της παιδιατρικής ηλικίας, όπως είναι οι συγγενείς καρδιοπάθειες, ενώ η παρουσία τους φαίνεται πως σχετίζεται ισχυρά και με την εμφάνιση ασθενειών και νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών όψιμης έναρξης, όπως είναι η νόσος του Parkinson, η σχιζοφρένεια και η διπολική διαταραχή (Geschwind and Flint, 2015; Homsey et al., 2015; Pamphlett et al., 2011). Αναφορικά με την Αναπαραγωγική Ιατρική, πληθαίνουν ολοένα και περισσότερο οι αναφορές που συσχετίζουν τα DNMs τόσο με γυναικεία, όσο

και με την ανδρική υπογονιμότητα, αλλά και με την επιτυχία των μεθόδων ART, καθώς και με την πιθανότητα μεταβίβασης DNMs στους απογόνους, όταν η σύλληψη επιτυγχάνεται μέσω ART (Caperton et al., 2007; Peters et al., 2015; Steuerwald et al., 2014; Wang et al., 2021; Xavier et al., 2021). Ως εκ τούτου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης DNMs στα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Αρχικά, η συχνότητα εμφάνισης DNMs διαφέρει μεταξύ των σωματικών κυττάρων και των κυττάρων της αρχέγονης γαμετικής σειράς, με τα πρώτα να υφίσταται DNMs με μεγαλύτερη συχνότητα (Goriely, 2016). Αναφορικά με τα κύτταρα της αρχέγονης γαμετικής σειράς (primordial germ cells, PGCs), έχει βρεθεί πως ο ρυθμός δημιουργίας DNMs είναι ίδιος μεταξύ των δύο φύλων, τόσο κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των PGCs (0.2-0.6 μεταλλάξεις ανά απλοειδές γονιδίωμα ανά κυτταρική διαίρεση), όσο και κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των PGCs για τον σχηματισμό των σπερματογόνιων και των ωογόνιων, αντίστοιχα (0.5-0.7 μεταλλάξεις ανά απλοειδές γονιδίωμα ανά κυτταρικό κύκλο) (Rahbari et al., 2016). Ωστόσο, στα τελικά στάδια της γαμετογένεσης, παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης DNMs μεταξύ των δύο φύλων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως ενώ τα ωογόνα υφίσταται μόνο έναν κύκλο αντιγραφής του DNA, τα σπερματογόνα μπορεί να διαιρεθούν μέσω μιτωτικών διαιρέσεων εκατοντάδες φορές κατά τη διάρκεια ζωής ενός άντρα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση DNMs στα σπερματοζώαρια λόγω λαθών στην αντιγραφή του DNA και ως εκ τούτου στους απογόνους. Υπολογίζεται πως για κάθε επιπλέον χρόνο πατρικής ηλικίας εισάγονται 1-3 DNMs στο γονιδίωμα των απογόνων, ενώ για κάθε χρόνο μητρικής ηλικίας εισάγονται μόλις 0.24 DNMs (Acuna-Hidalgo et al., 2016; Gao et al., 2016; Goldmann et al., 2016; Kong et al., 2012). Πέρα της συχνότητας, σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται και στον τύπο των DNMs που συσσωρεύονται μεταξύ των γαμετών των δύο φύλων. Μη-επαναλαμβανόμενα *de novo* SNVs και CNVs παρουσιάζουν ισχυρή, ηλικιακά εξαρτώμενη, πατρική συσχέτιση, η οποία οφείλεται στα λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των πολλαπλών κύκλων μιτωτικών διαιρέσεων που υφίσταται τα σπερματογόνα. Αντιθέτως, ισχυρή μητρική συσχέτιση παρουσιάζουν τα επαναλαμβανόμενα CNVs, τα οποία εμφανίζονται με υψηλότερη συχνότητα σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος των ωαρίων και ειδικά στις περιοχές που λαμβάνει χώρα με υψηλότερη συχνότητα ο ανασυνδυασμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση (Acuna-Hidalgo et al., 2016; Gao et al., 2016; Goldmann et al., 2016; Kong et al., 2012). Συνοψίζοντας, οι DNMs αποτελούν βασική κατηγορία βλαβών στο γονιδίωμα των γαμετών και ειδικά των σπερματοζωαρίων,

χωρίς ωστόσο αυτό να σημαίνει πως οι εν λόγω βλάβες δεν επηρεάζουν και τα ωάρια. Μάλιστα, υπάρχει μία εξαρτώμενη με την ηλικία αύξηση της συχνότητας εμφάνισης DNMs τόσο στα ωάρια, όσο και στα σπερματοζωάρια, κάτι που έχει άμεσο αντίκτυπο τόσο στις φυσικές συλλήψεις, όσο και στις κηήσεις που επιτυγχάνονται μέσω ART.

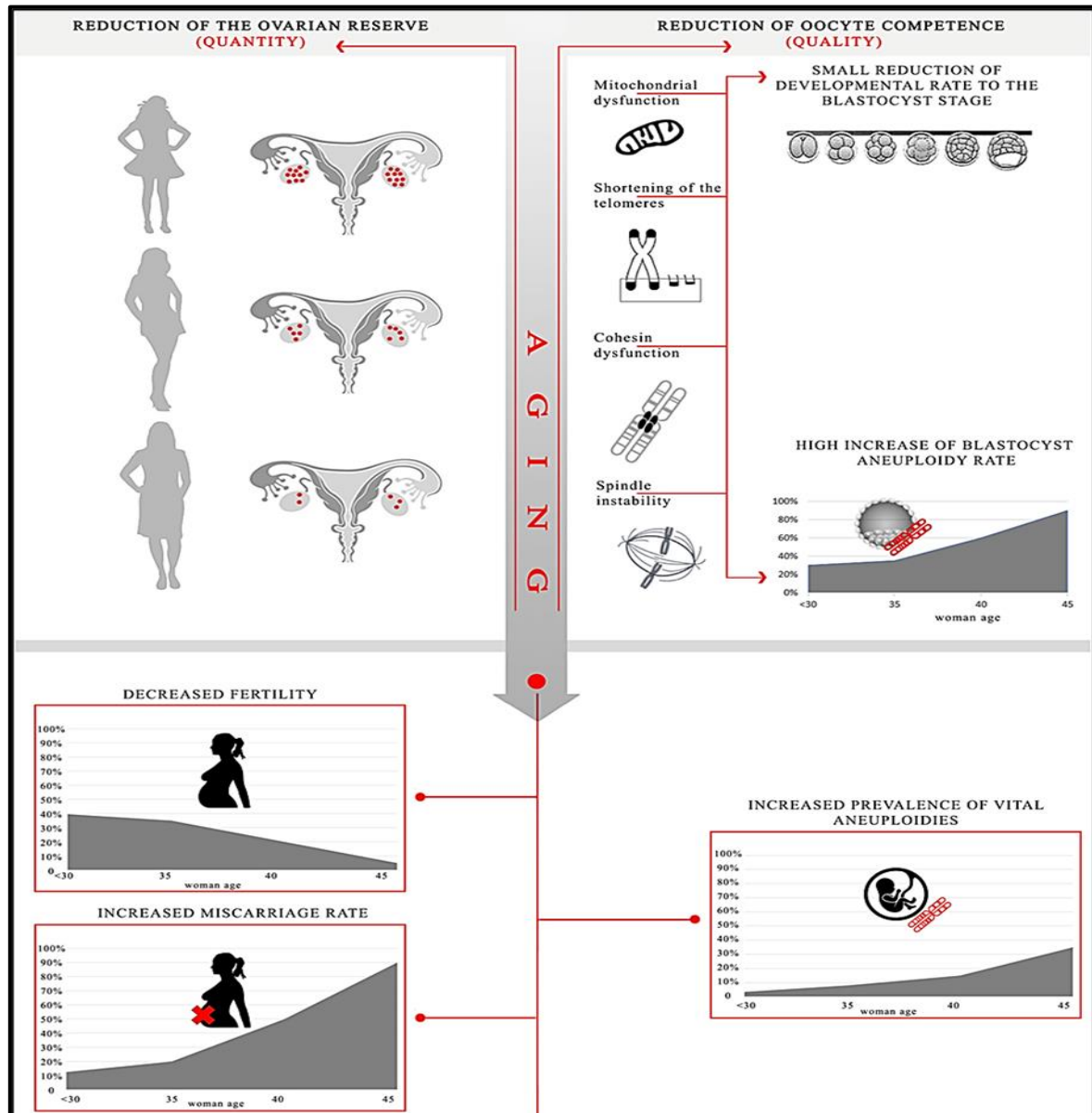
Εκτός από τις παραπάνω περιπτώσεις βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, όλες οι κατηγορίες βλαβών και τα αίτια πρόκλησης αυτών, όπως παρουσιάστηκαν εκτενώς στο Κεφάλαιο 1.2, μπορούν εν δυνάμει να διαταράξουν την σωστή δομή και αρχιτεκτονική του γονιδιώματος των ωοκυττάρων, υποβαθμίζοντας την ποιότητα και το δυναμικό ανάπτυξης τους σε υγιή έμβρυα, με ταυτόχρονη αύξηση του κινδύνου επαναλαμβανόμενων αποβολών, επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων κύκλων ART, καθώς και του κινδύνου εμφάνισης γενετικών συνδρόμων και διαταραχών, αλλά και χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα έμβρυα. Εκτός όμως από τους μηχανισμούς πρόκλησης άμεσων βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης πολυάριθμων έμμεσων βλαβών σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση των ωοκυττάρων και με την “ασυνέπεια” μεταξύ χρονολογικής και βιολογικής-αναπαραγωγικής ηλικίας (Ma et al., 2020; Thomas et al., 2021). Η επίδραση της κυτταρικής “γήρανσης” στην ποιότητα και το δυναμικό των ωαρίων είναι άμεση, ενώ εδώ και δεκαετίες έχει συσχετιστεί η προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας (advanced maternal age, AMA) με την αύξηση του κινδύνου αποβολών και εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα έμβρυα. Αν και η συσχέτιση αυτή είναι γνωστή και καλά καθορισμένη, η μοριακή βάση του φαινομένου, σε όλη της την έκταση, αποτελούσε και αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας και μελέτης, ενώ μόλις την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στο εν λόγω επιστημονικό πεδίο (Ma et al., 2020; Thomas et al., 2021) (Εικόνα 23). Αν και σποραδικά φαινόμενα ανευπλοειδίας στα ωάρια είναι σχετικά συχνά, υπάρχει μία ξεκάθαρη αύξηση της συχνότητας με την πρόοδο της ηλικίας της γυναίκας. Στην δεκαετία των 30', η οποία θεωρείται ως η δεκαετία στην οποία η γυναίκα παρουσιάζει το βέλτιστο αναπαραγωγικό δυναμικό και τη βέλτιστη ποιότητα ωαρίων, το ποσοστό ανευπλοειδίας στα ωοκύτταρα στον γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 10% - 25%. Το αντίστοιχο ποσοστό μετά τα 40 έτη ξεπερνά το 50%. Η εντυπωσιακή αυτή αύξηση φαίνεται πως οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αρχιτεκτονική της μειωτικής ατράκτου και στα πολλαπλά λάθη που συμβαίνουν κατά τον διαχωρισμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων (1^η μειωτική διαίρεση) ή/και κατά τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (2^η μειωτική διαίρεση) (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση των εξαρτώμενων από την ηλικία της γυναίκας βλαβών στην αρχιτεκτονική της μειωτικής ατράκτου (τροποποιημένο από Thomas et al., 2021).

Πιο αναλυτικά, οι βλάβες εντοπίζονται σε πολλά επίπεδα, όπως είναι η πολικότητα και ο προσανατολισμός της ατράκτου, η λανθασμένη πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων και τα πολλαπλά λάθη που συμβαίνουν κατά τον σχηματισμό των χιασμάτων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό DSBs και SSBs έως και τις πολλαπλές θραύσεις σε μεγάλα τμήματα των χρωμοσωμάτων. Επιπρόσθετα,

παρατηρούνται φαινόμενα δυσλειτουργίας των κοχρεσινών, ανώμαλα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και ακετυλίωσης των πρωτεϊνών και υπολειτουργία των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ενδογενών μηχανισμών προστασίας από το οξειδωτικό stress και τα ROS και επακόλουθη πρόκληση πολυάριθμων βλαβών στο DNA, με σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα των εμβρύων και στην έκβαση των κυήσεων (Cimadomo et al., 2018; Ma et al., 2020; Thomas et al., 2021) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Διαγραμματική απεικόνιση των μηχανισμών μέσω των οποίων η σχετιζόμενη με την αυξημένη αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας μείωση του αποθέματος και της ποιότητας των ωαρίων οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας των εμβρύων και σε δυσμενή έκβαση των κυήσεων (τροποποιημένο από: Cimadomo et al., 2018).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω καθίσταται σαφές πως ένα πλήθος ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, αλλά και παραγόντων που σχετίζονται με τα φυσικά χαρακτηριστικά των ατόμων, όπως η ηλικία, αλλά και τον τρόπο ζωής (life-style), μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες βλάβες στο DNA μέσω πολλαπλών άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Επιδημιολογικά και πέραν της αναπαραγωγικής ηλικίας έχει βρεθεί πως η ανευπλοειδία και οι βλάβες στο DNA των ωαρίων σχετίζονται με τη παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο, την ιονίζουσα ακτινοβολία και φυσικά με τη λήψη αντικαρκινικών φαρμάκων με γοναδοτοξική δράση (Ma et al., 2020). Ωστόσο, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν διαθέσιμα αναφορικά με την ιατρογενή επίδραση των χειρισμών που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της IVF στο επίπεδο του DNA των ωοκυττάρων. Για παράδειγμα, είναι γνωστό πως στο μικροπεριβάλλον ανάπτυξης των ωαρίων αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα ROS, όταν τα ωάρια εκτίθενται σε συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός, καθώς και όταν διαταράσσεται η εξισορρόπηση των αερίων εντός των κλιβάνων (Agarwal et al., 2006). Μάλιστα, στο πλαίσιο της IVF, η επίδραση των ROS στη φυσιολογία των ωαρίων εντείνεται, καθώς τα ωάρια καλλιεργούνται απομονωόμενα από το φυσικό περιβάλλον των ωοθηκών και των σαλπίνγων, καθώς και από το ωοθυλακικό υγρό, τα οποία όπως τονίσαμε παραπάνω παρέχουν σημαντική αντιοξειδωτική προστασία μέσω των ενζυμικών και μη μηχανισμών εξουδετέρωσης των ROS που διαθέτουν. Πέραν αυτών, στην καθ' ημέρα κλινική πρακτική της IVF, τα ωάρια υφίσταται ποικίλες πρόσθετες παρεμβάσεις, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την ενζυμική και μηχανική "απογύμνωσή" (denudation) τους από τα κοκκιώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός ωριμότητάς τους, την μικρογονιμοποίηση (ICSI), την κρυσταλλοποίηση και απόψυξη, αλλά και πιο ειδικές παρεμβάσεις, όπως είναι η *in vitro* ωρίμανση (*in vitro* maturation, IVM).

Εστιάζοντας στην τελευταία, μέσω της IVM επιτυγχάνεται η πλήρης εργαστηριακή ωρίμανση ωοκυττάρων GV σε ώριμα, ικανά προς γονιμοποίηση, ωάρια σταδίου MII. Η μέθοδος IVM έχει προταθεί ως τεχνική διαχείρισης κύκλων IVF, όπου είναι αναγκαία η εφαρμογή πρωτοκόλλων ήπιας διέγερσης ή/και φυσικών κύκλων. Στις κατηγορίες αυτές συγκαταλέγονται ογκολογικοί ασθενείς που υποβάλλονται σε άμεση διατήρηση γονιμότητας, για τις οποίες αντενδείκνυται η εφαρμογή πρωτοκόλλων πλήρους διέγερσης, καθώς και οι γυναίκες που έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης συνδρόμου OHSS, όπως είναι οι γυναίκες με σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (Hatirnaz et al., 2018; Shirasawa and Terada, 2017). Αν και τα εργαστηριακά πρωτόκολλα IVF έχουν εξελιχθεί

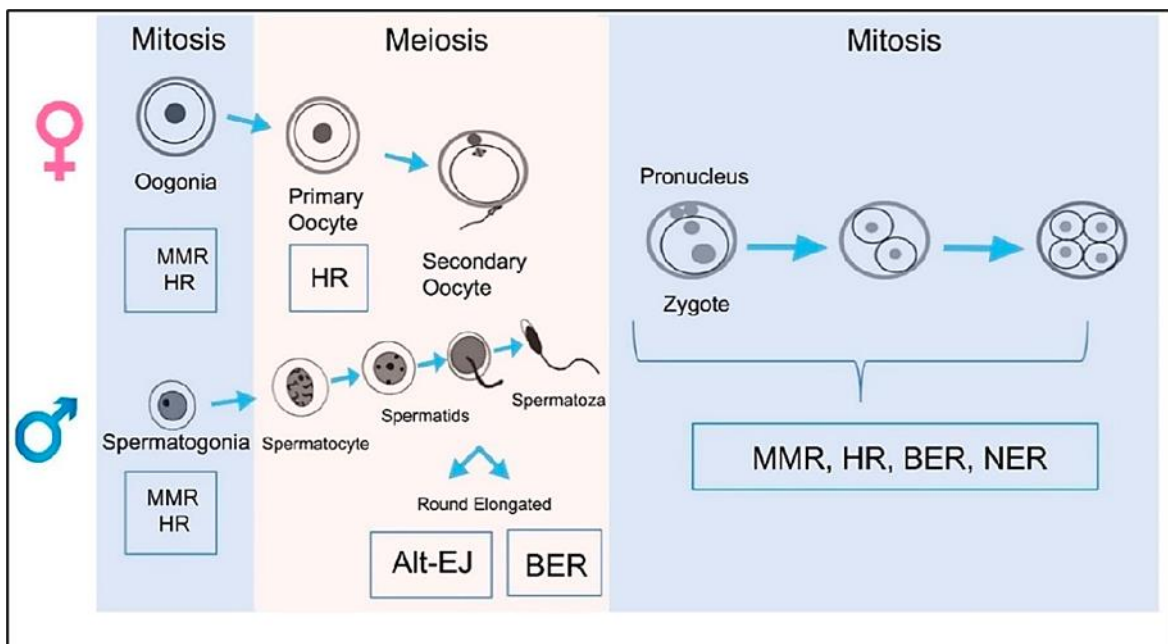
σημαντικά, παραμένει αδιευκρίνιστη η ακριβής επίδραση όλων αυτών των παρεμβάσεων στο DNA των ωοκυττάρων (Koreika et al., 2015). Για τους λόγους αυτούς, η εις βάθος διερεύνηση των επιδράσεων αυτών τόσο σε επίπεδο βασικής, όσο και σε επίπεδο κλινικής και μεταφραστικής έρευνας, είναι απαραίτητη, ώστε να διασφαλιστεί τόσο η επιτυχής διαχείριση της υπογονιμότητας, όσο και η υγεία των απογόνων. Η κατανόηση λοιπόν των μηχανισμών πρόκλησης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, των μηχανισμών αντιμετώπισης και επιδιόρθωσής τους, αλλά και η διερεύνηση της επίδρασής τους στην φυσιολογία και την ανάπτυξη του ωαρίου, βρίσκονται σήμερα στην "αιχμή" της έρευνας που πραγματοποιείται στο επιστημονικό πεδίο της Βιολογίας της Αναπαραγωγής.

1.5.2 Επίδραση των βλαβών του DNA στην φυσιολογία και ανάπτυξη των ωοκυττάρων

Η κατανόηση της επίδρασης των βλαβών του DNA στην ανάπτυξη και το δυναμικό των ωοκυττάρων προϋποθέτει τη διερεύνηση και τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών, καθώς και τον εντοπισμό "των ορίων ανοχής" των ωοκυττάρων στην βλάβη. Η μελέτη των μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων είναι πολύ δύσκολη και απαιτητική, δεδομένου του ότι τα ωάρια παρουσιάζουν έναν μοναδικό κύκλο ζωής, ο οποίος μπορεί να έχει πολύ μεγάλη διάρκεια και βλάβες μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε φάση αυτού του κύκλου. Επιπρόσθετα, η *in vivo* μελέτη των ωοκυττάρων είναι εξαιρετικά δύσκολη, ενώ ακόμα και η *in vitro* έρευνα στον άνθρωπο παρουσιάζει πολλούς περιορισμούς, κυρίως βιοηθικών και νομικών προεκτάσεων, δεδομένης της φύσης των κυττάρων αυτών.

Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν πως οι ποικίλες βλάβες στο DNA μπορούν να έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης στο οποίο συμβαίνουν. Η γαμετογένεση στα θηλαστικά περιλαμβάνει μία περίοδο όπου τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα αρχικά διαιρούνται μέσω μιτωτικών διαιρέσεων αυξάνοντας έτσι τον πληθυσμό τους και στη συνέχεια διαφοροποιούνται μέσω της μείωσης και σχηματίζουν τους απλοειδείς γαμέτες. Ως εκ τούτου, καθ' όλη τη διάρκεια της γαμετογένεσης, το γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων θα πρέπει να παρουσιάζει μία "πλαστικότητα", δηλαδή θα πρέπει να δημιουργηθεί μία πολύπλοκη ισορροπία μεταξύ "σταθερότητας" και "αστάθειας" του γονιδιώματος. Η σταθερότητα απαιτείται για την ορθή διαίωξη της γενετικής πληροφορίας στις επόμενες γενιές και η "αστάθεια" απαιτείται για να διασφαλιστεί η γενετική ποικιλομορφία, η οποία είναι απαραίτητη για

την προσαρμογή, την εξέλιξη και τη διαίωσιση των ειδών. Η πολύπλοκη αυτή ισορροπία επιτυγχάνεται μέσω σύνθετων μοριακών μονοπατιών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης βλάβης στο DNA, τους οποίους και διαθέτουν τα γαμετικά κύτταρα (Εικόνα 25). Πράγματι, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (germ cells) διαθέτουν όλα εκείνα τα μοριακά στοιχεία που τους επιτρέπουν να επιδιορθώνουν μία τεράστια ποικιλία βλαβών στο DNA, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης μέσω εξαίρεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair, NER) και εξαίρεσης βάσεων (base excision repair, BER), οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (mismatch repair, MMR) και φυσικά ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination, HR) και η μη-ομόλογη σύνδεση άκρων (non-homologous end joining, NHEJ) (βλέπε Κεφάλαιο 1.2). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός πως, στα διάφορα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων, κυριαρχούν διαφορετικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης, ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων βλαβών στα διάφορα στάδια (Εικόνα 25) (García-Rodríguez et al., 2019).



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση των βασικών μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA στα διάφορα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των γαμετών και των εμβρύων (τροποποιημένο από: (García-Rodríguez et al., 2019)).

Ειδικότερα και όσον αφορά τα ωάρια, η μελέτη της απόκρισης στις βλάβες του DNA, αλλά και της επίδρασης αυτών στην ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, δεδομένου πως τα ωάρια είναι ίσως τα "μακροβιότερα" κύτταρα

στα θηλαστικά (Nouspikel and Hanawalt, 2002). Θα μπορούσαμε λοιπόν να διακρίνουμε την πορεία διαφοροποίησης των ωοκυττάρων σε τρεις διακριτές φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, τα PGCs διαφοροποιούνται στα αρχέγονα προδρομικά κύτταρα των ωαρίων, τα οποία καλούνται ωογόνια και αυτό συμβαίνει νωρίς κατά την μετα-εμφυτευτική φάση ανάπτυξης του εμβρύου. Στη δεύτερη φάση, τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται μέσω μιτωτικών διαιρέσεων για να αυξήσουν αρχικά τον πληθυσμό τους και στην συνέχεια εισέρχονται στη μείωση I, η οποία και διακόπτεται στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης I. Στη τρίτη και τελική φάση, τα ωάρια ωριμάζουν πλήρως και ολοκληρώνουν την 1^η μειωτική διαίρεση κατά την ωορρηξία και εισέρχονται άμεσα στην 2^η μειωτική διαίρεση, η οποία διακόπτεται εκ νέου και ολοκληρώνεται αν και μόνον αν υπάρξει γονιμοποίηση (García-Rodríguez et al., 2019; Hajkova et al., 2002). Αναγνωρίζοντας τα στάδια διαφοροποίησης των ωοκυττάρων και λαμβάνοντας υπόψιν πως το DNA τους παρουσιάζει "υψηλότερη" ευαισθησία σε βλάβες όταν αυτά διαιρούνται μέσω μείωσης, γίνεται αντιληπτό ότι η σταθερότητα του γονιδιώματος των ωαρίων διακυβεύεται κυρίως σε δύο φάσεις. Η πρώτη αφορά την εμβρυϊκή ζωή και πιο συγκεκριμένα τον μειωτικό ανασυνδυασμό που λαμβάνει χώρα όταν τα ωογόνια εισέρχονται στη μείωση I και η δεύτερη την μακροχρόνια φάση, από την γέννηση έως και την εκάστοτε ωορρηξία, όπου τα ωάρια παραμένουν στη μείωση I (meiotic arrest), μέχρι να ενεργοποιηθεί ξανά ο μηχανισμός της μείωσης (García-Rodríguez et al., 2019).

Αναφορικά με τις διάφορες κατηγορίες βλαβών στο DNA των ωαρίων, η επιστημονική κοινότητα έχει εστιάσει στη μελέτη των DSBs, τα οποία και αποτελούν αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Ο λόγος είναι πως τα DSBs αποτελούν μία από τις πιο συχνές βλάβες στο DNA τόσο των σωματικών, όσο και των γαμετικών κυττάρων, είναι υψηλής κλινικής σημασίας βλάβες και δημιουργούνται τόσο από την επίδραση εξωγενών, όσο και ενδογενών παραγόντων, αλλά και ως αποτέλεσμα της ίδιας της κυτταρικής διαίρεσης. Επιπρόσθετα, DSBs μπορούν εύκολα να παραχθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον με τη χρήση χημικών παραγόντων, όπως είναι η ετοποσίδη, αλλά και ακτινοβολίας, όπως είναι η γ-ακτινοβολία. Επομένως, τα DSBs αποτελούν έναν πολύ καλό μοντέλο μελέτης της απόκρισης των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA.

Πιο αναλυτικά, DSBs δημιουργούνται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, κυρίως ως αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού που λαμβάνει χώρα κατά τη μείωση στην εμβρυϊκή φάση της ζωής. Ωστόσο, τα DSBs στη φάση αυτή ανιχνεύονται και

επιδιορθώνονται στο σύνολό τους, στο τέλος της πρόφασης I μέσω του μηχανισμού HR (Ashwood-Smith and Edwards, 1996; Martin et al., 2019). Στη φάση αυτή, σε περίπτωση αποτυχίας επιδιόρθωσης της βλάβης που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό, ενεργοποιούνται άμεσα τα σημεία ελέγχου της μείωσης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται το σημείο ελέγχου της ακεραιότητας της μειωτικής ατράκτου (spindle assembly checkpoint, SAC) και ενεργοποιείται η απόπτωση του αρχέγονου ωοκυττάρου που φέρει την μη-επιδιορθωμένη βλάβη (Cohen et al., 2006).

Αναφορικά με τη παρατεταμένη μεταγεννητική φάση κατά την οποία τα ωάρια παραμένουν στη μείωση I έως την ωοθυλακιορρηξία, όπου η μείωση άρχεται εκ νέου, τα βιβλιογραφικά δεδομένα, αναφορικά με την ικανότητα των ωαρίων να επιδιορθώνουν τις βλάβες στο DNA, είναι περιορισμένα και πολλές φορές αλληλοσυγκρουόμενα και πολλά ερωτηματικά παραμένουν αναπάντητα. Κατά τη φάση αυτή και λόγω της μεγάλης της διάρκειας, τα ωοκύτταρα όπως είναι λογικό, υφίσταται την επίδραση πολλών εξωγενών και ενδογενών παραγόντων, με αποτέλεσμα την πρόκληση μίας μεγάλης ποικιλίας βλαβών στο DNA, οι οποίες επιδρούν στην ποιότητα και το δυναμικό των ωαρίων και ως εκ τούτου στο αναπαραγωγικό δυναμικό (Hanoux et al., 2007; Lenormand et al., 2016; Mira, 1998). Πολλές μελέτες καταδεικνύουν πως τα ωοκύτταρα σε όλες τις αναπτυξιακές τους φάσεις, από τα πρωταρχικά ωοθυλάκια (primordial follicles) έως και τα πλήρως ώριμα MII ωοκύτταρα, διαθέτουν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για να επιδιορθώνουν τις βλάβες στο DNA τους, με σκοπό να διατηρήσουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος (Stringer et al., 2018). Κατά την διάρκεια της ωογένεσης, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα στοιχεία των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης βλάβης στο DNA εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα και τα mRNAs, αλλά και οι πρωτεΐνες των παραγόντων αυτών συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των ωαρίων (Menezo et al., 2007). Messenger RNAs όλων των μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως αυτοί παρουσιάζονται στην εικόνα 25, έχουν βρεθεί στα ωοκύτταρα των ποντικών, των πιθήκων, αλλά και του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των πλήρως ώριμων ωοκυττάρων σταδίου MII, αλλά και των κυττάρων του πρώιμου προ-εμφυτευτικού εμβρύου (Boroviak et al., 2018; Jaroudi et al., 2009; Menezo et al., 2007; Zeng et al., 2004; Zheng et al., 2005). Τα μετάγραφα αυτά διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικούς ρόλους, τόσο όσον αφορά την δυναμική επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων αυτών καθ'αυτών, όσο και για την επίτευξη της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και την διατήρηση της ακεραιότητας του

γονιδιώματος, κατά την γονιμοποίηση και τη δημιουργία του ζυγωτού. Παράλληλα, τα μετάγραφα αυτά μεταβιβάζονται από τα ωάρια στους ζυγώτες και στα πρώιμα έμβρυα, ώστε το έμβρυο να έχει την δυνατότητα επιδιόρθωσης ενδεχόμενων βλαβών στο DNA του, έως ότου να ενεργοποιηθεί το εμβρυϊκό γονιδίωμα και το έμβρυο να εκφράζει πλέον τις δικές του πρωτεΐνες επιδιόρθωσης, φαινόμενο που λαμβάνει χώρα περί την 3^η – 4^η ημέρα της ανάπτυξης, συχνότερα στο στάδιο του μοριδίου (Boroniak et al., 2018; Jaroudi et al., 2009; Menezo et al., 2007; Zeng et al., 2004; Zheng et al., 2005).

Οι γνώσεις αναφορικά με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωαρίων συνεχώς και αυξάνονται και αυτό είναι αποτέλεσμα της εντατικής έρευνας και της εξέλιξης της τεχνολογίας των ‘‘omics’’. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μία σχετικώς πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, η οποία έδειξε για πρώτη φορά, πως τα ωοκύτταρα σταδίου MII διαθέτουν την ικανότητα επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA μέσω του μονοπατιού NHEJ (Martin et al., 2018). Παρά τα δεδομένα αυτά, πληθαίνουν ολοένα και περισσότερο τα στοιχεία που δείχνουν πως η ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών στο DNA των ωαρίων σταδίου GV και MII παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών. Πειράματα με εφαρμογή της τεχνολογίας μαζικής αλληλούχησης των RNA (RNA-seq) έδειξαν πως, σε ωάρια GV και MII, τα μετάγραφα των στοιχείων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DSBs εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα ποντίκια σε σύγκριση με τα πρωτεύοντα θηλαστικά (Wang et al., 2017). Με βάση τα δεδομένα αυτά, φαίνεται πως τα ωοκύτταρα των τρωκτικών διαθέτουν ισχυρότερους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DSBs σε σύγκριση με τα ωοκύτταρα των πρωτευόντων θηλαστικών, κάτι που δημιουργεί μεγάλους προβληματισμούς αναφορικά με το εάν οι γνώσεις που έχουμε αποκτήσει από τα πειραματικά μοντέλα μπορούν να θεωρηθούν ισχύουσες και στον άνθρωπο. Ο προβληματισμός αναφορικά με τη δυναμική επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωαρίων που βρίσκονται στο τελικό στάδιο της ωρίμανσής της, γίνεται ακόμα πιο έντονος, καθώς υπάρχουν ισχυρά δεδομένα για να θεωρήσουμε πως η δυναμική αυτή μειώνεται με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας, της αποτυπώνεται στην πτώση των επιπέδων των mRNAs των επιδιορθωτικών στοιχείων και στην δυσλειτουργία των αντίστοιχων μηχανισμών επιδιόρθωσης (Hamatani et al., 2004; Marangos et al., 2015). Έτσι, η πρόοδος της αναπαραγωγικής ηλικίας δεν σχετίζεται μόνο με αύξηση της συχνότητας πρόκλησης μεταλλάξεων, βλαβών στο DNA και ανευπλοειδίας, αλλά και με σημαντική υποβάθμιση των μηχανισμών ανίχνευσης και επιδιόρθωσης των βλαβών.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, φαίνεται πως η ικανότητα επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε τελικό στάδιο ωρίμανσης (GV – MI – MII), ποικίλει μεταξύ των ειδών, με τα ωοκύτταρα των πρωτεύοντων θηλαστικών να παρουσιάζουν την πιο περιορισμένη ικανότητα. Μάλιστα, η ικανότητα αυτή μειώνεται περαιτέρω με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας. Παρουσιάζει λοιπόν ιδιαίτερη σημασία, όχι μόνο το είδος της βλάβης, αλλά και το στάδιο ωριμότητας του ωαρίου στο οποίο συμβαίνει, καθώς και η “ηλικία” του ωαρίου αυτού όταν συμβαίνει η βλάβη. Το βασικό ερώτημα ωστόσο δεν φαίνεται να είναι εάν επιδιορθώνεται ή όχι η βλάβη, αλλά ποια είναι η τύχη του ωοκυττάρου αυτού, που βρίσκεται σε τελικό στάδιο διαφοροποίησης και υφίσταται μία βλάβη στο DNA, η οποία ενδέχεται να παραμείνει αδιόρθωτη. Κάτι τέτοιο είναι ύψιστης σημασίας δεδομένου πως εάν το ωάριο αυτό ολοκληρώσει επιτυχώς την ωρίμανσή του και δεν οδηγηθεί σε απόπτωση, τότε η βλάβη θα κληρονομηθεί στο έμβρυο, υποβαθμίζοντας την ποιότητά του, κάτι που μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη κύηση ή/και στην υγεία των απογόνων.

Στο σημείο αυτό και εστιάζοντας σε αυτό το πολύ σημαντικό ερώτημα, αξίζει να σημειωθεί ο ρόλος του σημείου ελέγχου της ακεραιότητας της μειωτικής ατράκτου (spindle assembly checkpoint, SAC), το οποίο αποτελεί τον βασικό κυτταρικό μηχανισμό των ωοκυττάρων για την αποτροπή λαθών κατά των διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και κατά επέκταση για την δημιουργία ανευπλοειδίας στα έμβρυα. Κάθε κινητοχώρος ο οποίος παραμένει μη-συνδεδεμένος με μικροσωληνίσκους, ενεργοποιεί το SAC, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί έναν καταρράκτη ανασταλτικών σημάτων που παρεμποδίζουν την πρόοδο της ανάφασης, μέχρι την επιδιόρθωση της βλάβης (Lara-Gonzalez et al., 2012; Musacchio, 2015). Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως στα ωοκύτταρα των θηλαστικών και κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες το SAC δεν είναι αποτελεσματικό (Greaney et al., 2018; Mihajlović and FitzHarris, 2018). Πιο αναλυτικά, όταν οι βλάβες στη μειωτική άτρακτο είναι εκτεταμένες, η ενεργοποίηση του SAC παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της μείωσης και το σχηματισμό του πολικού σωματίου, ενώ η απομάκρυνση των στοιχείων του SAC καταλήγει σε συντόμευση της ολοκλήρωσης της μείωσης και επιδείνωση των βλαβών κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Homer et al., 2005; McGuinness et al., 2009). Ωστόσο, μέτριες διαταραχές στην αρχιτεκτονική της ατράκτου δεν ενεργοποιούν το SAC και την επακόλουθη διακοπή της μείωσης I (SAC-mediated meiosis I arrest), με αποτέλεσμα την πρόοδο της μείωσης στην ανάφαση και τον διαχωρισμό των λανθασμένα συζευγμένων χρωμοσωμάτων, κάτι που μπορεί να οδηγήσει

σε ανευπλοειδίες (Gui and Homer, 2012; Kolano et al., 2012; Lane et al., 2012; Sebestova et al., 2012). Ως εκ τούτου, τουλάχιστον στα ωοκύτταρα των ποντικών, φαίνεται ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων το SAC δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικό στο να ανιχνεύει βλάβες στη μειωτική άτρακτο (Mihajlović and FitzHarris, 2018).

Πρόσφατες μελέτες, στις οποίες διερευνήθηκε η επίδραση πειραματικά επαγόμενων βλαβών στο DNA στο δυναμικό ωρίμανσης των ωοκυττάρων, ρίχνουν φως στο παράδοξο της σχετικής αδυναμίας του SAC στο να ανιχνεύει βλάβες στην μειωτική άτρακτο των ωοκυττάρων. Από τις ερευνητικές εργασίες φάνηκε πως τα ωοκύτταρα τα οποία υφίσταται βλάβες επιτυγχάνουν GVBD, αλλά στη συνέχεια η μείωση διακόπτεται στο στάδιο MI, χωρίς να σχηματίζεται το 1^ο πολικό σωματίο (Collins et al., 2015; Collins and Jones, 2016; Lane et al., 2017; Marangos et al., 2015; Marangos and Carroll, 2012). Τα αποτελέσματα αυτά προκάλεσαν εντύπωση στην επιστημονική κοινότητα, δεδομένου πως η πρόκληση αντίστοιχων βλαβών στα σωματικά κύτταρα πριν αυτά εισέλθουν στη μίτωση (κατά αναλογία πριν το GVBD) οδηγεί σε διακοπή της μίτωσης και συγκεκριμένα διακοπή της διάλυσης του πυρηνικού φακέλου (nuclear envelope breakdown), αλλά οι βλάβες οι οποίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μίτωσης δεν παρεμποδίζουν την πρόοδο της ανάφασης (βλέπε υποκεφάλαιο 1.1.2) (Giunta et al., 2010; Rieder and Cole, 1998). Πρόσθετα πειράματα σε ωοκύτταρα ποντικών κατέδειξαν πως η προκαλούμενη από της βλάβες του DNA διακοπή της ωρίμανσης στη φάση MI μπορεί να προσπελαστεί όταν το SAC είναι ανενεργό (Collins et al., 2015; Lane et al., 2017; Marangos and Carroll, 2012). Μία πιθανή ερμηνεία των παραπάνω μηχανισμών είναι πως τα ωοκύτταρα των θηλαστικών έχουν εξελιχθεί στο να "διερευνούν" περισσότερο την ύπαρξη πιθανών βλαβών στο DNA, παρά την ακεραιότητα της μειωτικής ατράκτου. Η υπόθεση αυτή παρουσιάζει εξαιρετικό κλινικό ενδιαφέρον, καθώς υποστηρίζει πως τα ωοκύτταρα των θηλαστικών διαθέτουν έναν πολύ ειδικό μοριακό μηχανισμό, ο οποίος αποτρέπει τα ωάρια που υφίστανται βλάβες στο DNA κατά την τελική φάση της ωογένεσης, της παραδείγματος χάριν συμβαίνει κατά την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας και στο πλαίσιο του IVM, να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ωρίμανσή τους σε πλήρως ώριμα MII ωάρια, εξασφαλίζοντας έτσι να μην γονιμοποιηθούν ωάρια που φέρουν βλάβες στο DNA και ως εκ τούτου να αποτραπεί η δημιουργία εμβρύων που φέρουν βλάβες και μεταλλάξεις στο γενετικό της υλικό (Rémillard-Labrosse et al., 2020). Το κατά πόσο οι βλάβες στο DNA παρεμποδίζουν την ολοκλήρωση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων του ανθρώπου παραμένει ακόμα αναπάντητο και υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα διαθέσιμα.

1.6 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Συνοψίζοντας τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 1.5 αναφορικά με την επίδραση των βλαβών στο DNA στην δυναμική ωρίμανσης των ωοκυττάρων, φαίνεται πως η επίδραση αυτή ποικίλει σημαντικά και εξαρτάται από τη φάση της ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα η βλάβη, από την "ηλικία" των ωοκυττάρων και κυρίως από το είδος του θηλαστικού, όπου μελετάται η επίδραση αυτή. Φαίνεται λοιπόν πως οι βλάβες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είτε αντιμετωπίζονται επιτυχώς, είτε το ωοκύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Αντιθέτως, όταν η βλάβη λαμβάνει χώρα στα τελικά στάδια ωρίμανσης, δηλαδή κατά την φυσική ή προκλητή ωοθυλακιορρηξία και κατά την IVM, η επίδρασή της μπορεί να ποικίλει σημαντικά, ενώ ταυτόχρονα η επιδιορθωτική δυναμική των ωοκυττάρων ποικίλει μεταξύ των ειδών, αυξάνοντας περαιτέρω την πολυπλοκότητα της μελέτης του ήδη σύνθετου και πολύπλευρου αυτού φαινομένου.

Στην συνολική πολυπλοκότητα έρχεται να προστεθεί και η επίδραση της αναπαραγωγικής ηλικίας, με την πρόοδο της οποίας αυξάνεται η συχνότητα πρόκλησης βλαβών, ενώ ταυτόχρονα υποβαθμίζονται οι μηχανισμοί ανίχνευσης, επιδιόρθωσης και αναχαίτησης της ωρίμανσης των ωοκυττάρων που φέρουν βλάβες, οδηγώντας τελικά στα υψηλά ποσοστά ανευπλοειδίας που παρατηρούνται σε γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπρόσθετα, αν και τα τρωκτικά αποτελούν ένα εξαιρετικό υλικό προσομοίωσης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, φαίνεται πως τουλάχιστον αναφορικά με τη φυσιολογία των ωοκυττάρων στο πλαίσιο της μελέτης της επίδρασης των βλαβών στο DNA, τα πράγματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τρωκτικών και πρωτεύοντων θηλαστικών, με τα δεύτερα να παρουσιάζουν περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης και επιδιόρθωσης βλαβών. Φαίνεται πως στα ωοκύτταρα των τρωκτικών είναι πολύ πιο σημαντικό ένα GV ωάριο με βλάβη στο DNA να μην προχωρήσει στην μείωση και να γίνει MII, παρά να καταβληθεί οποιαδήποτε προσπάθεια επιδιόρθωσης της βλάβης, δεδομένου πως τα GV και τα MI ωάρια δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν. Το βασικό ερώτημα είναι εάν ισχύει το ίδιο και για τα ωοκύτταρα του ανθρώπου.

Για την προσέγγιση του εν λόγω σημαντικού κενού στην διεθνή βιβλιογραφία σχεδιάστηκε η παρούσα διδακτορική διατριβή με σκοπό τη διερεύνηση της απόκρισης ανθρώπινων ωοκυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV) σε βλάβες του DNA και συγκεκριμένα σε βλάβες της κατηγορίας των DSBs. Απώτερος σκοπός ήταν η διερεύνηση της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου για βλάβες

του DNA κατά τα διάφορα στάδια της μείωσης, η διερεύνηση του εάν και τα πόσον τα ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA μπορούν να ολοκληρώσουν την μείωση έχοντας βλάβες, η διερεύνηση του δυναμικού επιδιόρθωσης της βλάβης κατά τη μείωση και η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της βλάβης στα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά των ωοκυττάρων στο πλαίσιο της *in vitro* ωρίμανσής τους.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, ανθρώπινα ωοκύτταρα σταδίου GV, τα οποία προήλθαν από γυναίκες που δώρισαν τα ωάρια τους στο πλαίσιο κύκλων δωρεάς ωαρίων, εκτέθηκαν στον χημειοτοξικό παράγοντα ετοποσίδη και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα. Στην πειραματική ομάδα (experimental group) ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV επώαστηκαν για μία ώρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης, η οποία προκαλεί έμμεσα βλάβες στο DNA και πιο συγκεκριμένα DSBs. Αντίθετα, στην ομάδα ελέγχου (control group) ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV καλλιεργήθηκαν άμεσα, χωρίς να επωαστούν προηγουμένως σε ετοποσίδη. Και στις δύο ομάδες τα ωοκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε απλά καλλιεργητικά μέσα για 24 ώρες και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με κατάλληλα πρωτόκολλα. Η καλλιέργεια των ωοκυττάρων και των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε σε εξελιγμένα συστήματα καλλιέργειας time-lapse, με σκοπό να καταστεί δυνατή η ανάλυση όλων των μορφοκινητικών δεδομένων κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων και τη μετάβασή τους από το στάδιο GV στο στάδιο MII. Στα ωοκύτταρα και των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ανίχνευση ενδεχόμενων βλαβών στο DNA μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας και πιο συγκεκριμένα μέσω ανοσοφθορισμού για την ιστόνη γ -H2AX, η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστικό στοιχείο των μοριακών μηχανισμών επιδιόρθωσης των DSBs (βλέπε υποκεφάλαιο 1.2.5). Η παρούσα μελέτη δεν παρουσιάζει μόνο ερευνητικό ενδιαφέρον αλλά και κλινικό, καθώς, μία πλειάδα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA των ωοκυττάρων. Καθίσταται λοιπόν σημαντική η διερεύνηση της συμπεριφοράς των ανθρώπινων ωοκυττάρων όταν υποστούν βλάβες στην τελική φάση της ανάπτυξής τους, καθώς αυτές μπορεί να προκύψουν στο πλαίσιο των πρωτοκόλλων διέγερσης των ωοθηκών, αλλά και ως αποτέλεσμα των συνθηκών καλλιέργειας και γενικότερα του εργαστηριακού περιβάλλοντος, καθώς μπορούν μέσω διάφορων μηχανισμών να αποτελέσουν εν δυνάμει πηγές βλαβών του γενετικού υλικού των ωοκυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ερευνητικός Σχεδιασμός και Πληθυσμός της Μελέτης

2.1.1 Έγκριση Ερευνητικού Πρωτοκόλλου

Το Ερευνητικό Πρωτόκολλο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής εφαρμόστηκε κατόπιν άδειας από την Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Αρ. Απόφασης 443/31.7.2018) σύμφωνα με τα προβλεπόμενα του άρθρου 11 του Ν.3305/2005, καθώς και από το Επιστημονικό Συμβούλιο της Ιδιωτικής Γενικής Μαιευτικής – Γυναικολογικής & Παιδιατρικής Κλινικής “ΙΑΣΩ” (συνεδρίαση 20/11/2018). Ο ορισμός της Τριμελούς Επιτροπής της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε από τη Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στην Υπ. Αριθμ. 231/24-03-2016 απόφαση της Συνέλευσης με Αριθμό Πρωτοκόλλου 458. Ακολούθησε αλλαγή του Θέματος και της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, όπου και τελικώς καθορίστηκαν στην Υπ. Αριθμ. 279/15-06-2020 Συνεδρία της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η ένταξη των συμμετεχόντων στη μελέτη πραγματοποιήθηκε εθελοντικά, κατόπιν προφορικής και έγγραφης συγκατάθεσης (Εικόνα 26). Πιο αναλυτικά, ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από δότριες ωαρίων, οι οποίες υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών. Πριν την ένταξη και την έναρξη οποιασδήποτε ιατρικής πράξης, οι συμμετέχουσες ενημερώθηκαν εκτενώς για το σκοπό και το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης, όπου και ζητήθηκε η εθελοντική συμμετοχή τους για την προσφορά ανώριμων ωοκυττάρων για τους ερευνητικούς μελέτης που δεν οδηγεί σε εγκυμοσύνη, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία. Οι συμμετέχουσες ενημερώθηκαν με σαφήνεια πως η συμμετοχή τους στη μελέτη δεν θα επηρεάσει με κανένα τρόπο και σε κανένα βαθμό τις ιατρικές υπηρεσίες και τα πρωτόκολλα που θα λάμβαναν εάν δεν συμμετείχαν στη μελέτη και πως τα ανώριμα ωοκύτταρα δεν διαθέτουν γονιμοποιητική ικανότητα, οπότε και αποτελούν πλεονάζων βιολογικό υλικό που δεν χρησιμοποιείται για κλινικούς σκοπούς. Στο πλαίσιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε απομόνωση και στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των συμμετεχόντων σε ανώνυμη και κωδικοποιημένη βάση δεδομένων, σύμφωνα με την Αρχή της Ανωνυμίας και στο πλαίσιο του Γενικού Κανονισμού για την Προστασία των Δεδομένων (General Data Protection Regulation, GDPR).

ΕΙΤΡΑΦΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ - ΔΩΡΕΑΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ « INSTITUTE OF LIFE ΙΑΣΩ».

E.Δ. IVF.580.48a

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι σύζυγοι-σύντροφοι: α)
και β).....
.....
κάτοικοι.....

δηλώνουμε, με την παρούσα, ότι συναινούμε να διαθέσουμε - δωρίσουμε τα μη γονιμοποιημένα/ανώριμα ωάρια τα οποία προέρχονται από τον κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης που έλαβε χώρα στην Μ.Ι.Υ.Α με την επωνυμία «INSTITUTE OF LIFE-ΙΑΣΩ » (στο εξής, «Μονάδα»), κατά την από (ημ/νία ωοληψίας) ωοληψία, δυνάμει της από [...] Σύμβασής μας με την Μονάδα, προκειμένου να διατεθούν σε ερευνητικό πρόγραμμα της τελευταίας, που αφορά σε θέματα υπογονιμότητας. Η εν λόγω δυνατότητα παρέχεται από τις κείμενες διατάξεις του άρθρου 11 του Ν.3305/2005 (Ερευνα που δεν οδηγεί σε εγκυμοσύνη).

Το ερευνητικό αυτό πρόγραμμα διεξάγεται στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής σε συνεργασία με το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με θέμα «Μελέτη της συμπεριφοράς και της ανάπτυξης ανθρώπινων ωόκυττάρων και προ-εμφυτευτικών εμβρύων σε εξωμήτριο περιβάλλον».

Έχουμε λάβει γνώση και έχουμε κατανοήσει τις λεπτομέρειες του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος κατόπιν ενημέρωσής μας από το προσωπικό της Μονάδας και είμαστε σύμφωνοι στο να συμβάλλουμε στην πρόοδό του, μέσω της εκ μέρους μας δωρεάς των ως άνω αναφερόμενων ωαρίων.

Έχουμε ενημερωθεί πως, στο πλαίσιο του ανωτέρω ερευνητικού προγράμματος, θα λάβει χώρα επεξεργασία προσωπικών δεδομένων μας αποκλειστικά και μόνο στον βαθμό και για το χρονικό διάστημα που είναι απολύτως αναγκαία για τους σκοπούς της προόδου του εν λόγω προγράμματος. Έχουμε επίσης ενημερωθεί πως κάθε πράξη αποθήκευσης και επεξεργασίας των συλλεγόμενων προσωπικών δεδομένων μας δυνάμει της παρούσας, ιδίως, δε, η τυχόν καταγραφή τους στο οικείο κομμάτι της κάποιου ιατρικού άρθρου/διδακτορικής διατριβής και η παρουσίασή τους οπουδήποτε αυτή απαιτηθεί, θα λαμβάνουν χώρα κατόπιν πλήρους ανωνυμοποίησης των δεδομένων αυτών, ούτως ώστε να αποφεύγεται η με οποιονδήποτε τρόπο ταυτοποίησή τους με το πρόσωπό μας.

Τέλος, έχουμε ενημερωθεί πως σχετικά με τα προσωπικά δεδομένα μας που συλλέγονται δυνάμει της παρούσας, μπορούμε να ασκήσουμε ανά πάσα στιγμή τα δικαιώματα ενημέρωσης, πρόσβασης, διόρθωσης, διαγραφής ή περιορισμού της επεξεργασίας, εναντίωσης, φορητότητας, καθώς και υποβολής καταγγελίας στην Αρχή Προστασίας Δεδομένων Προσωπικού Χαρακτήρα, όπως τα εν λόγω δικαιώματα περιγράφονται αναλυτικά στην Πολιτική Προστασίας Προσωπικών Δεδομένων της Μονάδας, που είναι διαθέσιμη στον ακόλουθο σύνδεσμο: <https://www.iolife.eu/el/nea/gdpr-el/politiki-prostasias-prosopikon-dedomenon/>.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

Ο ΔΗΛΩΝ /Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Εικόνα 26. Υπόδειγμα έντυπης έγγραφης ενημερωμένης συγκατάθεσης για τη συμμετοχή στη μελέτη της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η προφορική και έγγραφη συγκατάθεση ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την εθελοντική συμμετοχή στη μελέτη.

2.1.2 Στρατολόγηση Συμμετεχόντων στη Μελέτη

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε *in vitro* διερεύνηση της απόκρισης ανώριμων ωαρίων σε βλάβες του DNA. Τα ανώριμα ωάρια συλλέχθηκαν στο πλαίσιο κύκλων δωρεάς ωαρίων από δότριες των οποίων η ηλικία βάση νομοθετικού πλαισίου (3305/2005) δεν υπερβαίνει τα 35 έτη. Οι δότριες υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών και τα ανώριμα ωάρια που συλλέχθηκαν μετά τη διέγερση αποτέλεσαν το πειραματικό υλικό. Η συλλογή των ανώριμων ωαρίων και το *in vitro* πειραματικό μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις της αδειοδοτημένης, από την Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Μονάδας Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής “Institute of Life” που εδρεύει στο Μαιευτήριο ΙΑΣΩ. Επιπρόσθετα, η μελέτη της απόκρισης των ανώριμων ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, το οποίο και διαθέτει Μονάδα Συνεστιακής Μικροσκοπίας Φθορισμού (confocal microscopy), υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή και Προέδρου του Τμήματος κ. Πέτρου Μαραγκού.

2.1.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός της διδακτορικής διατριβής υλοποιήθηκε ως εξής:

- Αρχικά, τα ανώριμα ωοκύτταρα GV που συλλέχθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε δυο μεγάλες ομάδες ανάλογα με το εάν επώαστηκαν παρουσία ετοποσίδης (Etop) ή όχι. Όπως εκτενώς παρουσιάστηκε στο υποκεφάλαιο 1.2.1, η ετοποσίδη είναι ένας χημικός παράγοντας ο οποίος προκαλεί έμμεσα βλάβες στο DNA και πιο συγκεκριμένα DSBs. Τα ανώριμα ωοκύτταρα που εκτέθηκαν στην ετοποσίδη αποτέλεσαν την πειραματική ομάδα (experimental group Etop), ενώ τα αντίστοιχα που δεν εκτέθηκαν στον παράγοντα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group).
- Μερικά από τα ανώριμα ωάρια της ομάδας ελέγχου μονιμοποιήθηκαν άμεσα μετά τη συλλογή τους με τη χρήση παραφολμαδεϋδης (PF) (Control PF), προκειμένου να μελετηθεί η ύπαρξη βλαβών στο DNA και η ακεραιότητα του γενετικού τους υλικού μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Τα υπόλοιπα ανώριμα ωάρια της ομάδας ελέγχου καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο time-lapse (TL) (Control TL), εφαρμόζοντας

πρωτόκολλο IVM, με σκοπό τη διερεύνηση του ποσοστού ωρίμανσης των ωοκυττάρων, αλλά και την ανάλυση των μορφοκινητικών δεδομένων και της αναπτυξιακής πορείας των ωοκυττάρων κατά την ωρίμανσή τους.

- Τα ανώριμα ωοκύτταρα της πειραματικής ομάδας επώαστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης (Etop) σε θερμοκρασία 37 °C για μία ώρα, με σκοπό να διερευνηθεί το μέγεθος της βλάβης που προκαλείται από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις και η πιθανή επιδιορθωτική ικανότητα των ωοκυττάρων.
- Στη συνέχεια, και σε αναλογία με την ομάδα ελέγχου, μέρος των ανώριμων ωοκυττάρων που επώαστηκαν σε ετοποσίδα μονιμοποιήθηκαν άμεσα (Etop PF), με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της ετοποσίδης στην πρόκληση βλαβών στο DNA και στην ακεραιότητα του γενετικού υλικού, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Συμπεράσματα αναφορικά με τα παραπάνω εξήχθησαν μέσω άμεσης σύγκρισης με την ομάδα Control PF. Τα υπόλοιπα ανώριμα ωάρια της πειραματικής ομάδας καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο time-lapse (Etop TL), εφαρμόζοντας πρωτόκολλο IVM, με σκοπό τη διερεύνηση του εάν και κατά πόσον η επίδραση της ετοποσίδης μπορεί να επηρεάσει το ποσοστό ωρίμανσης των ωαρίων, αλλά και τα μορφοκινητικά δεδομένα της αναπτυξιακής τους πορείας κατά την ωρίμανση, μέσω άμεσης σύγκρισης με την ομάδα control TL.
- Και στις δύο ομάδες της μελέτης και όσον αφορά τις υποομάδες ανώριμων ωοκυττάρων που καλλιεργήθηκαν στον κλίβανο time-lapse με σκοπό την IVM, η καλλιέργεια ξεκίνησε μετά την επώαση με ετοποσίδα (για την ομάδα Etop TL) και πέντε (5) ώρες μετά την ωοληγία (τόσο για τα Control TL, όσο και για τα Etop TL) με συνολική διάρκεια 24 ώρες. Τόσο τα ανώριμα ωοκύτταρα Control TL, όσο και τα Etop TL, τοποθετήθηκαν, η κάθε ομάδα σε διαφορετικό τρυβλίο καλλιέργειας Micro Well (Vitrolife), σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό Global for Fertilization (Lifeglobal) με επικάλυψη λαδιού Fertiguard Mineral oil (Lifeglobal). Τα τρυβλία αυτά είναι ειδικά για επώαση με τη χρήση του συστήματος καλλιέργειας time-lapse Primo Vision (TK Biotech, Vitrolife) μέσα σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες καλλιέργειας 37.5° C, 6.5% CO₂ και 6% O₂. Όπως τονίστηκε και παραπάνω, μέσω της τεχνολογίας time-lapse είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας ωρίμανσης των ωοκυττάρων σε πραγματικό χρόνο και πιο συγκεκριμένα του χρόνου πραγματοποίησης του GVBD (στάδιο μετάβασης από GV σε MI) και της εξόδου του πρώτου πολικού σωματίου του ωοκυττάρου (στάδιο

μετάβασης από ΜΙ σε ΜΙΙ). Το συγκεκριμένο σύστημα time-lapse Primo Vision (TK Biotech, Vitrolife), που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, πραγματοποιεί φωτογραφικές λήψεις των καλλιεργούμενων ωαρίων κάθε δέκα λεπτά (ανά δέκα λεπτά σε κάθε well του τρυβλίου όπου πραγματοποιήθηκε μεμονωμένη καλλιέργεια των ανώριμων ωαρίων) και στη συνέχεια ειδικό λογισμικό ενώνει τις φωτογραφικές λήψεις δημιουργώντας ένα video time-lapse πραγματικού χρόνου.

- Τόσο τα ανώριμα ωοκύτταρα της ομάδας Control TL, όσο και αυτά της ομάδας Etop TL μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας μονιμοποιήθηκαν, ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσής τους, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη βλαβών στο DNA και η ακεραιότητα του γενετικού υλικού, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Στόχος ήταν να μελετηθεί το ποσοστό των ανώριμων ωοκυττάρων Etop TL που παρέμειναν στο στάδιο GV, που ωρίμασαν έως το στάδιο ΜΙ και που ωρίμασαν έως το στάδιο ΜΙΙ σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου Control TL. Επιπρόσθετα, στόχος ήταν να καταδειχθεί το εάν τα ωάρια της κατηγορίας Etop TL που ολοκλήρωσαν την ωρίμανσή τους κατάφεραν να επιδιορθώσουν τις βλάβες που προκάλεσε η επώαση με ετοποσίδη προκειμένου να μεταβούν από το ένα στάδιο ωρίμανσης στο άλλο.

Συνοπτικά, οι πειραματικές ομάδες και το πρωτόκολλο καθορίστηκε ως εξής:

- Ανώριμα ωοκύτταρα-ομάδα ελέγχου-> απευθείας μονιμοποίηση (Control PF)
- Ανώριμα ωοκύτταρα-επώαση με ετοποσίδη-> απευθείας μονιμοποίηση (Etop PF)
- Ανώριμα ωοκύτταρα-ομάδα ελέγχου-> καλλιέργεια για IVM σε κλίβανο time-lapse -> μονιμοποίηση μετά από 24 ώρες καλλιέργειας (Control TL)
- Ανώριμα ωοκύτταρα-επώαση με ετοποσίδη-> καλλιέργεια για IVM σε κλίβανο time-lapse-> μονιμοποίηση μετά από 24 ώρες καλλιέργειας (Etop TL)

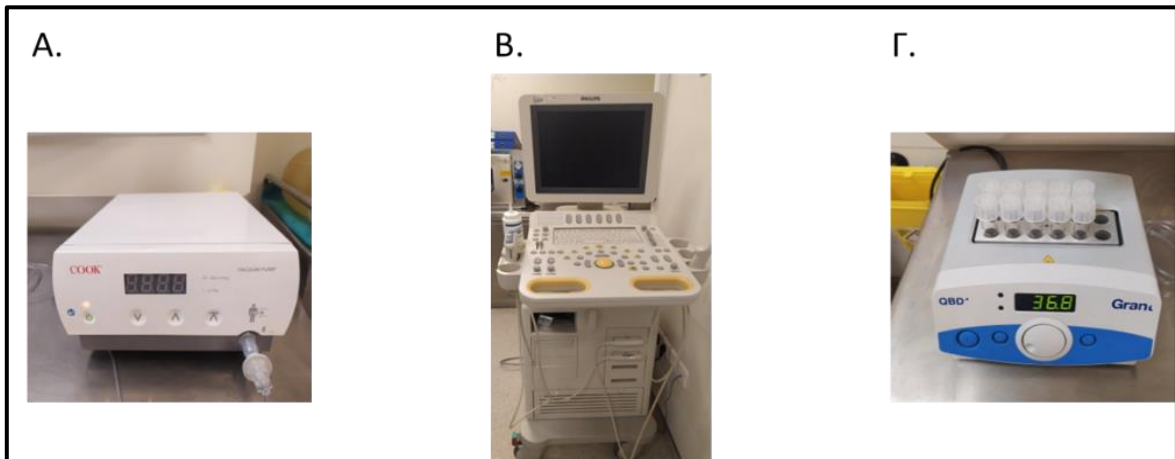
2.2 Πρωτόκολλο Ελεγχόμενης Διέγερσης των Ωοθηκών

Οι δότριες ωαρίων που συμμετείχαν στη μελέτη έλαβαν το ίδιο πρωτόκολλο ελεγχόμενης διέγερσης των ωοθηκών, προκειμένου να εξαλειφθεί αυτός ο πιθανός συγχυτικός παράγοντας (confounder). Το πρωτόκολλο επιλογής ήταν το βραχύ πρωτόκολλο του ανταγωνιστή της GnRH (short GnRH-antagonist protocol). Πιο αναλυτικά, το πρωτόκολλο περιελάμβανε χορήγηση γοναδοτροπινών (Gonal F, Merck/ Puregon, MSD/ Menopur,

Ferring) από την 2^η – 3^η ημέρα του καταμήνιου κύκλου. Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου διέγερσης και μεταξύ των άλλων, αξιολογήθηκαν δείκτες του ωοθηκικού αποθέματος μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα επίπεδα της AMH στο περιφερικό αίμα και ο αριθμός AFC, ο οποίος αξιολογήθηκε μέσω διακολπικής υπερηχογραφίας των ωοθηκών. Η ημερήσια χορηγούμενη δόσολογία των γοναδοτροπινών ήταν κατά μέσο όρο 225 IU/ημέρα και η διάρκεια της διέγερσης κατά μέσο όρο 12 – 14 ημέρες, ανάλογα με την ανταπόκριση της εκάστοτε δότριας. Η ανταπόκριση στη διέγερση αξιολογούταν τακτικά μέσω υπερηχογραφικής αξιολόγησης της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και μέσω καταγραφής των επιπέδων της οιστραδιόλης στο περιφερικό αίμα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων συνήθως από την 7^η ημέρα και όταν η διάμετρος των κυρίαρχων ωοθυλακίων ήταν 12 – 13 mm ξεκινούσε η συγχορήγηση γοναδοτροπινών και ανταγωνιστών της GnRH (Cetrotide, Merck/ Orgalutran, MSD), προκειμένου να αποφευχθεί η πρόωγη εκκριτική αιχμή της LH. Όταν η διάμετρος των κυρίαρχων ωοθυλακίων έφτανε τα 18 – 20 mm πραγματοποιούταν χορήγηση 0.2 IU αγωνιστή της GnRH (Arvecap, Ipsen) για την πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας και την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων. Η λήψη των ωαρίων, ή αλλιώς ωοληψία, πραγματοποιούταν 35 – 36 ώρες μετά τη φαρμακευτική πρόκληση της ωοθυλακιόρρηξιας.

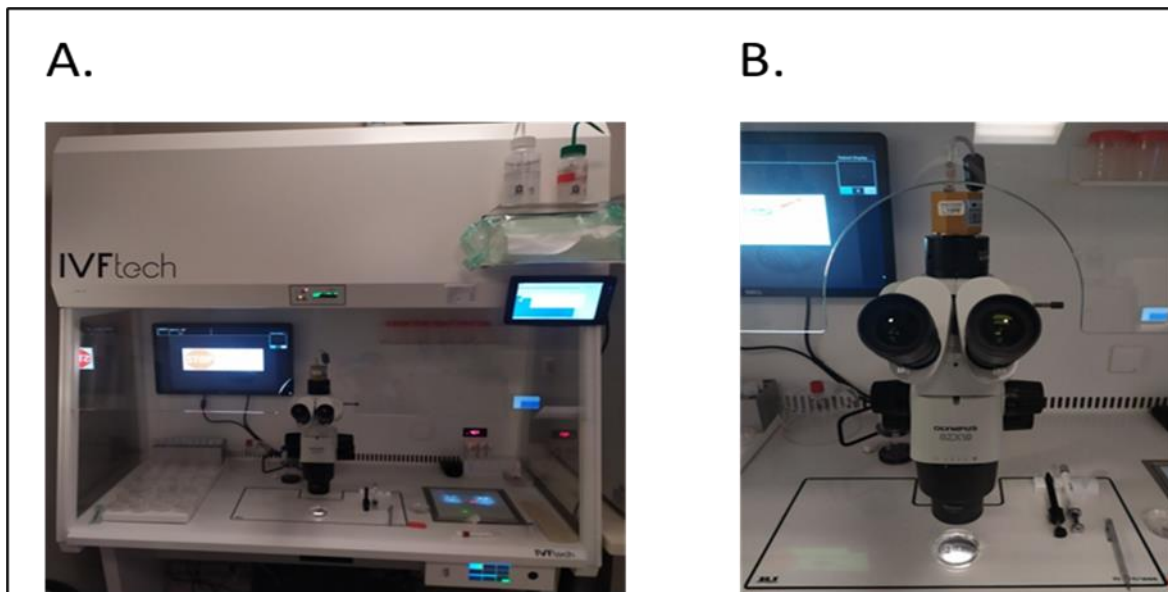
2.3 Ωοληψία

Η ωοληψία πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο χειρουργικό περιβάλλον σε θέση λιθοτομής, υπό ήπια αναισθησία, μέσω διακολπικής παρακέντησης των ωοθυλακίων υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση. Η αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού πραγματοποιήθηκε με χρήση βελόνας μονού αυλού (Kitazato OPU Needle 17-G), συνδεδεμένη με αντλία ελεγχόμενης αναρρόφησης (Cook K-MAR-5200), ενσωματωμένη στην κεφαλή διακολπικού υπερήχου (HD7 Diagnostic Ultrasound System, Philips). Το ωοθυλακικό υγρό συλλέχθηκε, σε προ-θερμασμένα στους 37 °C, σωληνάρια συλλογής ωοθυλακικού υγρού των 14 ml με στρογγυλό πυθμένα (150268, Thermo, Nunc), τα οποία και τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο block στους 37 °C (QBD test tube heater, Grand), ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία (Εικόνα 27).



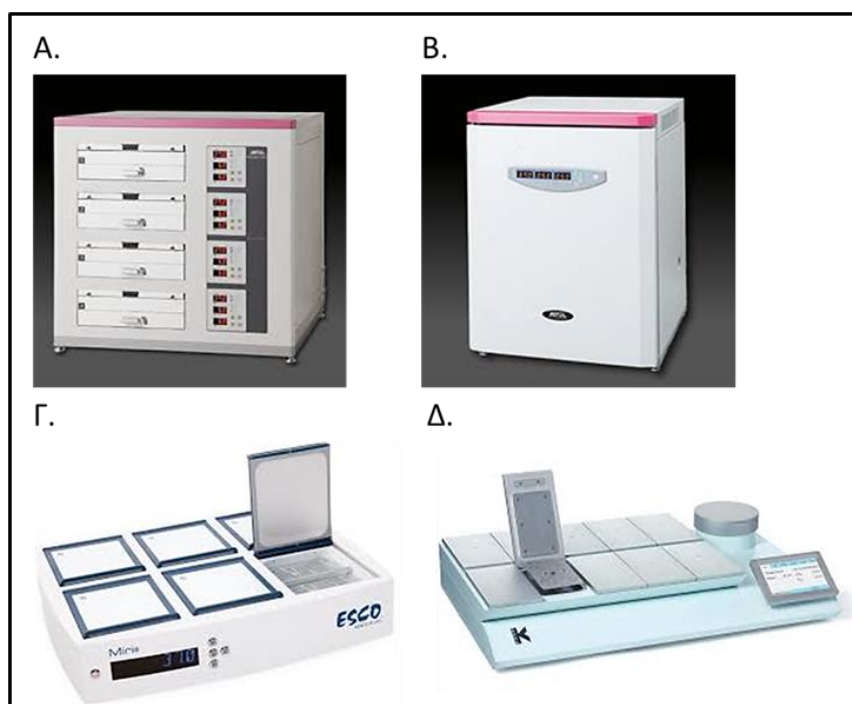
Εικόνα 27. (Α) Αντλία αναρρόφησης ωοθυλακικού υγρού, (Β) υπέρηχος για την διακολπική παρακέντηση των ωοθυλακίων και Γ) θερμαινόμενο block για την προσωρινή τοποθέτηση των σωληναρίων που περιέχουν το ωοθυλακικό υγρό (MIYA Institute of Life, ΙΑΣΩ).

Ακολούθως, τα σωληνάκια που περιείχαν το ωοθυλακικό υγρό μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εμβρυολογίας με σκοπό την ανεύρεση, απομόνωση, συλλογή και έκπλυση των συμπλεγμάτων ωοκυττάρων-κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (cumulus-oocyte complexes, COCs). Πιο αναλυτικά, τα ωοθυλακικά υγρά τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία ωοληψίας, πάνω σε θερμαινόμενη επιφάνεια στερεοσκοπίου υψηλής διακριτικής ικανότητας (Olympus SZX10), το οποίο φέρει ενσωματωμένη θερμαινόμενη επιφάνεια (RI witness). Η στερεοσκοπική παρατήρηση και όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (IVF TECH) (Εικόνα 28). Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής, τα COCs ξεπλύθηκαν επιμελώς με την χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur από τυχόν υπολείμματα ωοθυλακικού υγρού και αίμα και τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία καλλιέργειας 60 x 15 mm (Nunc IVF dish, ThermoScientific), σε μικρο-σταγόνες καλλιεργητικού υλικού Global for Fertilization (Lifeglobal) με επικάλυψη ελαίου Fertiguard Mineral oil (Lifeglobal). Η επικάλυψη με έλαιο εξυπηρετεί σημαντικά στην διατήρηση σταθερών συνθηκών εντός της μικρο-σταγόνας του καλλιεργητικού υλικού, παρεμποδίζοντας την εξάτμιση και άρα την αλλαγή της σύστασης των καλλιεργητικών υλικών, η οποία είναι μείζονος σημασίας για την επιβίωση των ωαρίων και των εμβρύων, ειδικά όσον αφορά τη διατήρηση σταθερού pH.



Εικόνα 28. Α) Θάλαμος νηματικής ροής με ενσωματωμένο στερεοσκόπιο και θερμαινόμενη επιφάνεια και Β) στερεοσκόπιο με ενσωματωμένη κάμερα και θερμαινόμενη επιφάνεια (MIYA Institute of Life, ΙΑΣΩ).

Στην συνέχεια, τα τρυβλία που περιείχαν τα απομονωμένα COCs μεταφέρθηκαν και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες καλλιέργειας 37.5 °C, 6.5% CO₂ και 6% O₂. Εκεί παρέμειναν για περίπου τέσσερις ώρες έως την διαδικασία του καθαρισμού και απογύμνωσης των ωαρίων από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (denudation), με σκοπό την αξιολόγηση του βαθμού της ωρίμανσής τους (Εικόνα 29).



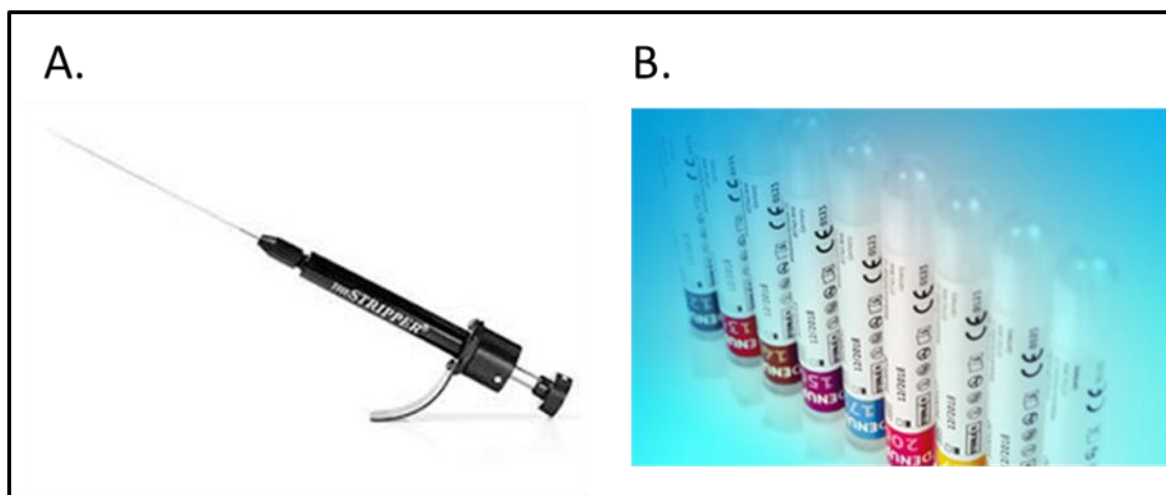
Εικόνα 29. Διάφοροι τύποι κλιβάνων που απαιτούνται για την καλλιέργεια γαμετών και εμβρύων στο εργαστήριο εμβρυολογίας.

2.4 Απογύμνωση ωοκυττάρων (denudation) και αξιολόγηση της μορφολογίας και του βαθμού ωρίμανσης

Η απογύμνωση (denudation) των ωοκυττάρων από τα κοκκιώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (corona radiata), που από κοινού αποτελούν τα COCs που συλλέγονται κατά την ωοληψία, είναι απαραίτητη σε κύκλους δωρεάς ωαρίων προκειμένου να αξιολογηθεί ο βαθμός ωριμότητας και διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ωαρίων, ώστε τα ώριμα ΜΠ ωάρια να χρησιμοποιηθούν για τους κλινικούς σκοπούς των κύκλων και τα ανώριμα ή/και ανώμαλα ωάρια να απορρίπτονται. Η διαδικασία της απογύμνωσης εφαρμόζεται, εκτός από τους κύκλους δωρεάς ωαρίων και σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης, σε κύκλους κρυοσυντήρησης ωαρίων, σε κύκλους που θα πραγματοποιηθεί προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος, αλλά και σε άλλες περιπτώσεις. Αναφορικά με τη παρούσα μελέτη, μέσω της απογύμνωσης αναγνωρίστηκαν τα ώριμα ΜΠ ωάρια των συμμετεχόντων, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν για τους κλινικούς σκοπούς των κύκλων δωρεάς ωαρίων, αλλά και τα ανώριμα ωάρια σταδίου GV, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης.

Η απογύμνωση των ωαρίων (denudation) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων και μέσω μηχανικής διάσπασης των ισχυρών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των ωοκυττάρων και των κοκκιωδών κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου. Πιο αναλυτικά, 40 ώρες μετά την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας (4 ώρες κατά μέσο όρο μετά την ωοληψία), τα συμπλέγματα COCs τοποθετήθηκαν σε σταγόνα που περιείχε διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης του ενζύμου υαλουρονιδάση (hyaluronidase, FertiPro) για μερικά δευτερόλεπτα. Η επώαση με υαλουρονιδάση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και για μικρό χρόνο αποσκοπεί στην “αποδυνάμωση” των ισχυρών διακυτταρικών συνδέσεων, ενώ ταυτόχρονα η έκθεση αυτή δεν φαίνεται να έχει αρνητικές επιδράσεις στο δυναμικό ανάπτυξης των ωαρίων. Η ολοκλήρωση της απογύμνωσης πραγματοποιήθηκε μέσω μηχανικής ανάδευσης με τη χρήση κατάλληλων πλαστικών μικρο-πιπέτων (strippers) (Vitromed) ολοένα και μικρότερης διαμέτρου. Αρχικά, και όσο η διάμετρος των COCs ήταν σχετικά μεγάλη, χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες διαμέτρου 200 μm. Στη συνέχεια και με τη μείωση της διαμέτρου των COCs χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες διαμέτρου 175 μm και 140 μm, έως την ολοκληρωτική απογύμνωση των ωοκυττάρων (Εικόνα 30). Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν εντός θαλάμου νηματικής ροής υπό στερεοσκοπική παρατήρηση, όπως περιεγράφηκε στο

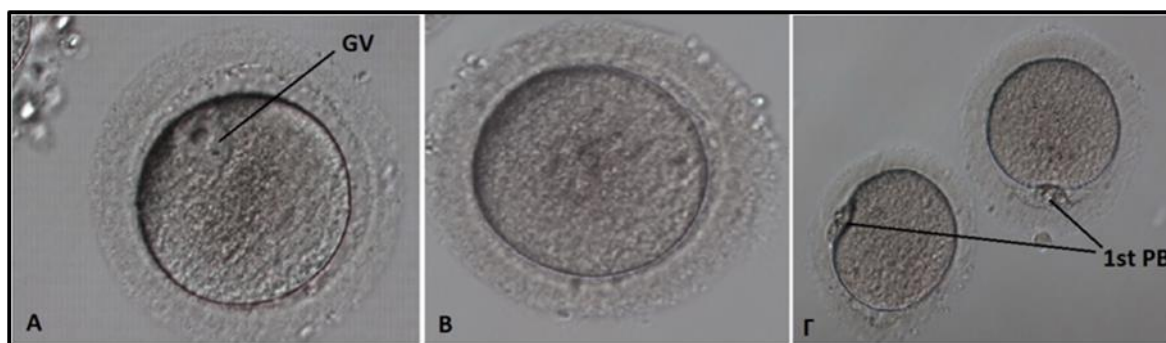
Κεφάλαιο 2.3. Η επιτυχής ολοκλήρωση της απογύμνωσης επιβεβαιώθηκε με στερεοσκοπική παρατήρηση, όταν τα ωάρια αποτυπώθηκαν στο οπτικό πεδίο ως μονάδες, χωρίς να περιβάλλονται από τα κοκκιώδη κύτταρα.



Εικόνα 30. Μικροπιπέτες που χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων για τη μηχανική αφαίρεση των κοκκιωδών κυττάρων και των κυττάρων ακτινωτού στεφάνου από τα ωοκύτταρα.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απογύμνωσης των ωαρίων από τα κοκκιώδη κύτταρα, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση των ωαρίων σε ανάστροφο μικροσκόπιο υψηλής ευκρίνειας για την αξιολόγηση του βαθμού της πυρηνικής της ωρίμανσης, αλλά και των μορφολογικών χαρακτηριστικών της, τα οποία και αποτελούν δείκτες ποιότητας (π.χ. μέγεθος, σύσταση κυτταροπλάσματος, μέγεθος διαφανούς ζώνης, χαρακτηριστικά πολικού σωματίου κ.α). Όσον αφορά το βαθμό ωρίμανσης τα ωάρια διακρίνονται σε ανώριμα GV ωοκύτταρα, σε ανώριμα MI ωοκύτταρα και σε ώριμα ωάρια MII (Εικόνα 31). Της παρουσιάστηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια, τα ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV είναι σε γενικές γραμμές μικρότερα σε μέγεθος και χαρακτηρίζονται από την παρουσία του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle, GV) στο κυτταρόπλασμά της, ενώ δεν απεικονίζεται πολικό σωματίο, καθώς στα ανώριμα αυτά ωάρια η 1^η μειωτική διαίρεση βρίσκεται ακόμα στα αρχικά στάδιά της και δεν έχει πραγματοποιηθεί GVBD, ούτε φυσικά ο σχηματισμός του 1^{ου} πολικού σωματίου (Εικόνα 31 A). Στα ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου MI η μειωτική διαίρεση έχει προχωρήσει με αποτέλεσμα να έχει πραγματοποιηθεί GVBD αλλά δεν έχει ολοκληρωθεί, οπότε και δεν έχει σχηματιστεί το 1^ο πολικό σωματίο. Ως εκ τούτου δεν απεικονίζεται το βλαστικό κυστίδιο, αφού έχει υποστεί διάσπαση, αλλά δεν απεικονίζεται ούτε πολικό σωματίο, αφού δεν έχει ολοκληρωθεί η 1^η μειωτική διαίρεση (Εικόνα 31 B). Τα ώριμα ωάρια σταδίου MII χαρακτηρίζονται από την απουσία του βλαστικού κυστιδίου και

την παρουσία του 1^{ου} πολικού σωματίου (Εικόνα 31 Γ). Τα ωάρια αυτά έχουν ολοκληρώσει τη 1^η μειωτική διαίρεση, κάτι που καταδεικνύεται από την παρουσία του 1^{ου} πολικού σωματίου και εισέρχονται ταχύτατα στη 2^η μειωτική διαίρεση, η οποία και ολοκληρώνεται μετά την γονιμοποίηση. Στα ώριμα ωάρια σταδίου ΜΠ δεν εντοπίζεται πυρήνας, καθώς η άτρακτος της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης έχει σχηματιστεί και βρίσκεται κάτω από το πολικό σωματίο, ωστόσο δεν είναι εμφανής παρά μόνο με παρατήρηση σε πολωτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 31. Αξιολόγηση ωαρίων ανάλογα με το στάδιο της πυρηνικής ωρίμανσης. **Α)** Ανώριμο ωάριο σταδίου GV, όπου γίνεται εμφανής η παρουσία του βλαστικού κυστιδίου (GV). **Β)** Ανώριμο ωάριο σταδίου ΜΙ, όπου έχει πραγματοποιηθεί η διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), χωρίς ωστόσο να έχει σχηματιστεί το 1^ο πολικό σωματίο. **Γ)** Ωριμο ωάριο σταδίου ΜΠ όπου διακρίνεται το 1^ο πολικό σωματίο. Μόνο τα ώριμα ωάρια σταδίου ΜΠ μπορούν να γονιμοποιηθούν. Τα ανώριμα ωάρια σταδίου GV αποτέλεσαν το πειραματικό υλικό της παρούσας διατριβής.

Επιπρόσθετα της πυρηνικής ωρίμανσης, αξιολογήθηκαν και διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ωαρίων, τα οποία και αποτελούν αδρούς δείκτες της ποιότητας και του δυναμικού ανάπτυξης που διαθέτουν. Σε αυτά περιλαμβάνονται το μέγεθος και το σχήμα των ωαρίων, το χρώμα και η "ύφή" του κυτταροπλάσματος, η παρουσία κυστιδίων εντός του κυτταροπλάσματος (vacuoles), το πάχος και η "ύφή" της διάφανης ζώνης, καθώς και το μέγεθος, το σχήμα και η ακεραιότητα των πολικών σωματίων. Σε γενικές γραμμές τα ωάρια πρέπει να χαρακτηρίζονται από ένα διαυγές και ομοιογενές κυτταρόπλασμα, χωρίς την παρουσία κυστιδίων ή άλλων κυτταροπλασματικών σχηματισμών, με ακέραια και στρογγυλά πολικά σωματία και με διάφανη ζώνη συγκεκριμένου πάχους και όχι πυκνής σύστασης. Το σκούρο κυτταρόπλασμα (dark ooplasm) αποτελεί ένδειξη επερχόμενου κυτταρικού θανάτου και αποδόμησης του ωοκυττάρου (degeneration), η παρουσία ενδοκυτταροπλασματικών κυστιδίων καταδεικνύει πιθανή αυξημένη δραστηριότητα των λυσοσωμάτων, τα κατακερματισμένα πολικά σωματία πιθανές βλάβες κατά τις μειωτικές διαιρέσεις, ενώ η πυκνής σύστασης και παχιά διάφανη ζώνη καταδεικνύει πιθανή μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα.

2.5 Επαγωγή Δίκλωνων Θραύσεων στο DNA των GV Ωοκυττάρων

Τόσο τα GV ωοκύτταρα της ομάδας Etop PF, όσο και αυτά της ομάδας Etop TL αμέσως μετά τη συλλογή και την αξιολόγησή τους επώαστηκαν για μία ώρα σε διάλυμα ετοποσίδης, η οποία προκαλεί μέσω έμμεσων μηχανισμών DSBs στο DNA. Πιο αναλυτικά, τα GV ώαρια τοποθετήθηκαν σε μικροσταγόνες καλλιεργητικού υλικού HEPES-buffered medium (Global Hepes + 10% Αλβουμίνη LGPS) εμπλουτισμένου με ετοποσίδα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, όπως παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους του κεφαλαίου. Οι μικροσταγόνες επιστρώθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία καλλιέργειας 60 x 15 mm (Nunc IVF dish, ThermoScientific) και επικαλύφθηκαν με έλαιο (Fertiguard Mineral oil, Lifeglobal). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα στους 37 °C. Μετά το πέρας της μίας ώρας επώασης πραγματοποιήθηκε έκπλυση των ωοκυττάρων από το διάλυμα ετοποσίδης μέσω εμβάπτισης σε μικροσταγόνες καλλιεργητικού υλικού Global For Fertilization + 10% αλβουμίνη LGPS (Lifeglobal). Στη συνέχεια και ανάλογα με την πειραματική ομάδα (Etop PF ή Etop TL), τα ωοκύτταρα είτε μονιμοποιήθηκαν άμεσα (Etop PF), είτε καλλιεργήθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση του αναπτυξιακού τους δυναμικού (Etop TL).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πιλοτικών πειραμάτων με σκοπό να αξιολογηθεί εάν και κατά πόσον ο συγκεκριμένος παράγοντας είναι δυνατόν να προκαλέσει βλάβες στο DNA των ωοκυττάρων, ώστε να διασφαλιστεί η ισχύς του πειραματικού αυτού μοντέλου. Επιπρόσθετα, στόχος της πιλοτικής φάσης της μελέτης ήταν να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση ετοποσίδης, η οποία από την μία θα ήταν αρκετή ώστε να προκαλεί βλάβες στο DNA των ωοκυττάρων και από την άλλη δεν θα ήταν τόσο γενοτοξική, ώστε να προκαλεί άμεσα αναστολή της περαιτέρω ανάπτυξης των ωοκυττάρων. Ο λόγος είναι πως στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του αν και κατά πόσον ωοκύτταρα GV που υφίσταται βλάβες στο DNA μπορούν να προχωρήσουν σε επόμενα στάδια ωρίμανσης και επιπρόσθετα να διερευνηθεί το εάν και κατά πόσον η ικανότητα αυτή οφείλεται στην ικανότητά τους να επιδιορθώνουν τις βλάβες ή εάν ωριμάζουν έχοντας τις βλάβες μη επιδιορθωμένες. Έτσι λοιπόν η συγκέντρωση της ετοποσίδης έπρεπε να κανονικοποιηθεί πριν την πραγματοποίηση της βασικής πειραματικής διαδικασίας.

Έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης για να δοκιμαστούν, αυτές των 10 µg/ml, 20 µg/ml και 100 µg/ml. Όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.1, η συγκέντρωση των 10 µg/ml δεν ήταν επαρκής για να προκαλέσει βλάβες στο DNA, ενώ η συγκέντρωση των 100 µg/ml ήταν εξαιρετικά γενετοξική προκαλώντας ανάσχεση της ωρίμανσης στο σύνολο των ωοκυττάρων που εξετάστηκαν. Τα πιλοτικά πειράματα κατέδειξαν ως βέλτιστη συγκέντρωση ετοποσίδης τα 20 µg/ml.

Προετοιμασία διαλυμάτων Ετοποσίδης

Το αρχικό διάλυμα (stock) της ετοποσίδης είχε συγκέντρωση 100 mg/mL με διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO). Το αρχικό διάλυμα χωρίστηκε σε aliquots των 10 µL μέσα σε σωληνάρια eppendorf. Εν συνεχεία, αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη. Προκειμένου να παρασκευαστούν τα διαλύματα των 10 µg/mL, 20 µg/mL και 100 µg/mL πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού διαλύματος της ετοποσίδης με διάλυμα HEPES-Buffered Medium (Global Hepes + 10% Αλβουμίνη LGPS).

2.6 Μονιμοποίηση ωοκυττάρων

Η μονιμοποίηση των ωοκυττάρων όλων των κατηγοριών, τόσο αυτών που μονιμοποιήθηκαν άμεσα (Control PF και Etop PF), όσο και αυτών που μονιμοποιήθηκαν μετά την IVM, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος παραφολμαδεΰδης (PF 4%).

Πιο αναλυτικά, τα ωοκύτταρα τοποθετήθηκαν σε μικροσταγόνες διαλύματος παραφολμαδεΰδης 4% (PF 4%) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση των ωοκυττάρων σε πέντε σταγόνες με διάλυμα έκπλυσης (washing buffer), για πέντε λεπτά σε κάθε σταγόνα. Μετά την έκπλυση τα ωάρια τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια eppendorf που περιείχαν 500 µL από το διάλυμα έκπλυσης (washing buffer) και διατηρήθηκαν στην ψύξη μέχρι τη μεταφορά της στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπου και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της βλάβης του DNA των ωοκυττάρων μέσω ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας.

Προετοιμασία διαλύματος παραφολμαδεΰδης (PF 4%)

Η παραφορμαλδεΰδη χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση ιστών και κυττάρων. Σχηματίζει δεσμούς με πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης (crosslinking), χωρίς να διαταράσσει τη διάταξη των μακρομορίων εντός των κυττάρων. Αυτό σημαίνει πως η αρχιτεκτονική του κυττάρου παραμένει σε μεγάλο βαθμό αναλλοίωτη, επιτρέποντας έτσι την ανάλυση των ιστών και κυττάρων μέσω πολλών τεχνικών, όπως είναι η ιστοχημική χρώση και ο ανοσοφθορισμός. Για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής εφαρμόστηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού, η οποία περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο. Το διάλυμα παραφολμαδεΰδης 4% (PF 4%) που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της μελέτης παρασκευάστηκε με προσθήκη 0.4 gr σκόνης παραφολμαδεΰδης (Sigma) σε 10 mL διαλύματος phosphate buffer saline (PBS). Η παρασκευή του διαλύματος ολοκληρώθηκε μέσω μαγνητικής ανάδευσης υπό θέρμανση (περίπου 120 °C) μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

Διάλυμα phosphate buffer saline (PBS)

Αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα όπου στις περισσότερες συνθέσεις του αποτελείται από χλωριούχο και φωσφορικό νάτριο. Κάποιες φορές μπορεί να περιέχει χλωριούχο κάλιο και φωσφορικό νάτριο. Αποτελεί ισοτονικό μη τοξικό διάλυμα και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοϊατρική έρευνα ως συστατικό των καλλιεργητικών υλικών σε καλλιέργειες κυττάρων ή ως διαλύτης για την παρασκευή ποικίλων διαλυμάτων. Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε έτοιμο παρασκευασμένο διάλυμα PBS (Sigma) των 100 mL.

Προετοιμασία διαλύματος έκπλυσης (washing buffer 0.5% w/v)

Το διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιείται ως επί των πλείστων για την απομάκρυνση της περίσσειας διαφόρων αντιδραστηρίων και χημικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο των πειραμάτων, όπως για παράδειγμα για την απομάκρυνση της περίσσειας της παραφολμαδεΰδης κατά την μονιμοποίηση των κυττάρων ή κατά τον ανοσοφθορισμό για την απομάκρυνση της περίσσειας των 1^ο και των 2^ο γενών αντισωμάτων. Το διάλυμα έκπλυσης παρασκευάστηκε με διάλυση 0.25 gr Human Serum Albumin (HSA, Irvine) σε 50 mL διαλύματος PBS. Η συντήρηση του διαλύματος πραγματοποιήθηκε στους 4°C.

2.7 Ανίχνευση DSBs μέσω πρωτοκόλλου έμμεσου ανοσοφθορισμού της ιστόνης γ -H2AX

Η διερεύνηση της επίδρασης της ετοποσίδης στο DNA των GV ωοκυττάρων, για τον εντοπισμό ενδεχόμενων βλαβών τύπου DSBs, πραγματοποιήθηκε μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας και ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της ιστόνης γ -H2AX, η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστικό στοιχείο των μοριακών μηχανισμών επιδιόρθωσης των DSBs (βλέπε υποκεφάλαιο 1.2.5). Η επιλογή της χρήσης της ιστόνης γ -H2AX ως μάρτυρα (marker) της ύπαρξης DSBs στο DNA των ωοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με γνώμονα τον ειδικό εντοπισμό του συγκεκριμένου μορίου μόνο στα σημεία εκείνα του DNA που έχουν υποστεί τη συγκεκριμένη βλάβη.

2.7.1 Βασικές Αρχές Ανοσοφθορισμού

Ως φθορισμός (fluorescence) ορίζεται το φαινόμενο εκπομπής φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μία ουσία nanoseconds μετά την απορρόφηση φωτός, του οποίου το μήκος κύματος είναι συνήθως μικρότερου εύρους. Η διαφορά του μήκους κύματος μεταξύ της εισερχόμενης και της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας, ιδιότητα που χαρακτηρίζει τις φθορίζουσες ουσίες και είναι γνωστή ως μετατόπιση Stokes (Stokes shift), είναι η ιδιότητα αυτή που καθιστά την μικροσκοπία φθορισμού τόσο ισχυρή. Ο λόγος είναι πως, μέσω του Stoke shift, δίνεται η δυνατότητα πλήρους φιλτραρίσματος της εισερχόμενης ακτινοβολίας (exciting light) χωρίς να “μπλοκάρεται” η εκπεμπόμενη ακτινοβολία (emitted). Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η οπτικοποίηση ακόμα και μικρομορίων μέσα σε ένα κύτταρο, καθώς μόνο τα φθορίζοντα μόρια οπτικοποιούνται, ενώ ταυτόχρονα μηδενίζεται ο “θόρυβος” από το περιβάλλον (background). Με βάση τα παραπάνω καθίσταται προφανές πως η χρήση του φθορισμού, ως μέθοδος ανίχνευσης κυτταρικών και υποκυτταρικών στοιχείων, υπερέχει σημαντικά της μεθόδου της απλής χρώσης, όπου τα δείγματα επεξεργάζονται με χρωστικές ουσίες που απλά απορροφούν φως. Μέσω των τεχνικών απλής χρώσης, η ποσότητα του φωτός που απορροφάται από τα μόρια που μας ενδιαφέρει να αναλύσουμε διακρίνεται μόνο μερικώς από το περιβάλλον, καθώς σε ένα βαθμό και το περιβάλλον χρωματίζεται. Έτσι, μέσω των τεχνικών απλής χρώσης η οπτικοποίηση, ειδικά των μικρομορίων, καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη και εν πολλοίς μη αποτελεσματική. Αντιθέτως, μέσω φθορισμού καθίσταται

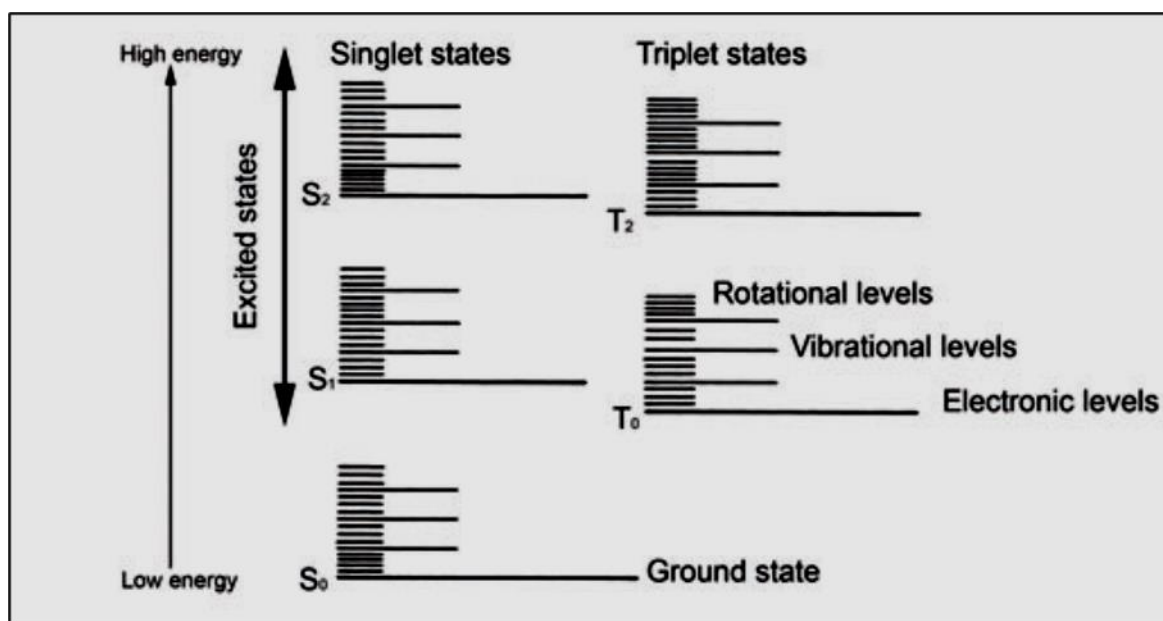
δυνατή η πλήρης και ακριβής οπτικοποίηση ακόμα και ενός μόνο φθορίζοντος μορίου, όταν το περιβάλλον δεν απαρτίζεται από μόρια που αυτό-φωσφορίζουν (Lichtman and Conchello, 2005).

Προκειμένου να γίνουν καλύτερα αντιληπτά τα παραπάνω, αξίζει να δοθούν κάποιες λεπτομέρειες αναφορικά με τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων ο φθορισμός, από ένα φυσικό φαινόμενο, έφτασε να αποτελεί ένα πολύτιμο και ισχυρό εργαλείο μικροσκοπίας στα χέρια των ερευνητών, που διερευνούν τον βιολογικό ρόλο πολλών κυτταρικών και υποκυτταρικών στοιχείων. Την ιδιότητα του φθορισμού την έχουν συγκεκριμένα μόρια-ουσίες, τα οποία ονομάζονται φθοροφόρα (fluorophores). Φθοροφόρες ουσίες απαντώνται στον φυσικό κόσμο, σε πολλούς ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, αλλά και σε μία ποικιλία μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, και μέσω της εξέλιξης της επιστήμης της βιοχημείας και της χημείας, καθίσταται σήμερα δυνατή η εργαστηριακή σύνθεση φθοροφόρων ουσιών. Παρόλο που οι φθοροφόρες ουσίες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από μία ιδιαίτερη και μοναδική ηλεκτρονιακή δομή των ατόμων τους, η οποία και τους προσδίδει την ιδιότητα του φθορισμού.

Πιο αναλυτικά, ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα της κινητικότητας που παρουσιάζουν τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στις εξώτατες (πιο απομακρυσμένες από τον πυρήνα του ατόμου) τροχιές των ατόμων των φθοροφόρων ουσιών. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι μοναδικά για την κάθε φθοροφόρο ουσία και καθορίζουν τόσο την αποτελεσματικότητα εκπομπής φθορισμού, όσο και τα μήκη κύματος του φωτός που χαρακτηρίζουν τα κύματα διέγερσης και εκπομπής. Έτσι, η κάθε φθοροφόρος ουσία παρουσιάζει μία μοναδική “ταυτότητα”, καθώς διεγείρεται από φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, ενώ εκπέμπει φθορισμό πάλι σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (Lichtman and Conchello, 2005).

Η “συμπεριφορά” των ηλεκτρονίων των εξώτατων τροχιών των ατόμων των φθοροφόρων ουσιών, η μελέτη της οποίας οδήγησε στην κατανόηση του φθορισμού, αποτυπώνεται στην Εικόνα 32, η οποία αποτελεί ένα διάγραμμα της κινητικότητας των ηλεκτρονίων των εξώτατων τροχιών των φθοροφόρων μορίων, το οποίο προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Alexander Jablonski στην δεκαετία του 1930. Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, τα άτομα των φθοροφόρων ουσιών, όταν δεν επιδρά σε αυτά ενέργεια υπό την μορφή κύματος φωτός, βρίσκονται σε “κατάσταση ηρεμίας” (ground state, S₀) και δεν εκπέμπουν φθορισμό. Ωστόσο, όταν τα άτομα των φθοροφόρων ουσιών απορροφήσουν

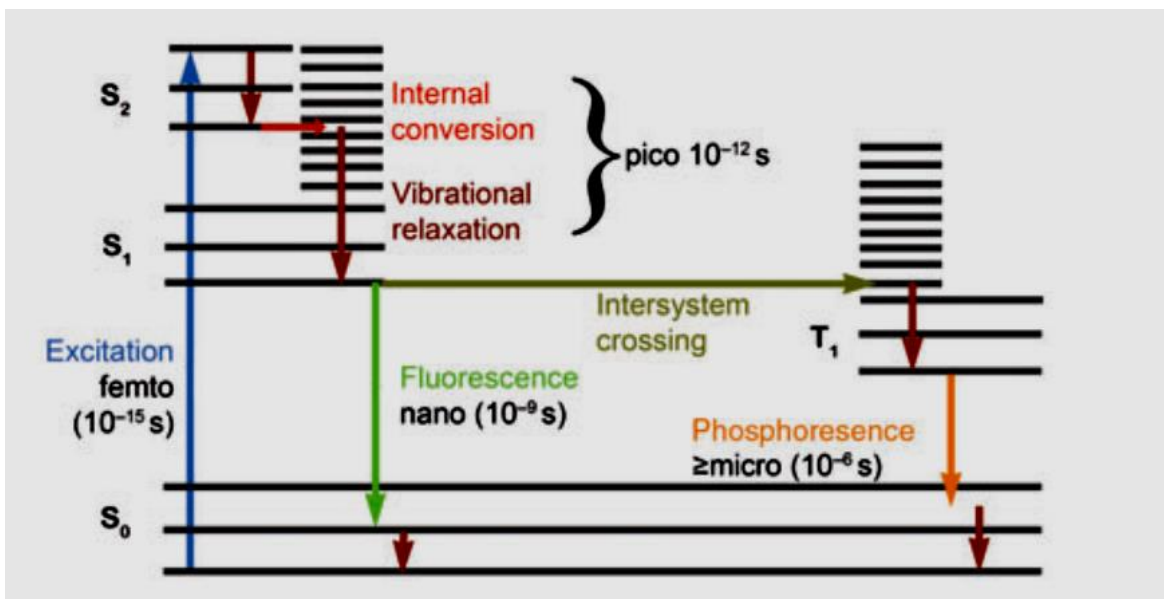
ενέργεια υπό την μορφή φωτονίων, τότε η απορροφούμενη ενέργεια μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στα άτομα, επηρεάζοντας την κατανομή των ηλεκτρονίων στις εξώτατες τροχιές, επιδρώντας στο spin των ηλεκτρονίων ή/και προκαλώντας δονήσεις. Όταν η ενέργεια της εισερχόμενης απορροφούμενης φωτεινής ακτινοβολίας φθάσει ένα κρίσιμο επίπεδο, τότε τα ηλεκτρόνια των εξώτατων στιβάδων ωθούνται από την τροχιά S₀ (ground state, S₀) σε τροχιές υψηλότερης ενέργειας (S₁ και S₂) και τότε η φθοροφόρος ουσία βρίσκεται σε κατάσταση διέγερσης (excited state) (Lichtman and Conchello, 2005).



Εικόνα 32. Διάγραμμα Jablonski, όπου απεικονίζονται οι ενεργειακές στάθμες κατά την κατάσταση ηρεμίας και κατά τα διάφορα στάδια της διέγερσης (Lichtman and Conchello, 2005).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, όταν μία φθοροφόρος ουσία απορροφά ενέργεια υπό τη μορφή φωτεινής ακτινοβολίας, τότε ανάλογα με το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας τα άτομα της ουσίας υφίσταται μεταβολές στις δονήσεις, στο spin και στις τροχιές που κινούνται τα ηλεκτρόνια των εξώτατων στιβάδων. Κατά τη διέγερση όλη η ενέργεια που κατέχει ένα φωτόνιο μεταφέρεται στο φθοροφόρο. Η ενέργεια αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος του φωτονίου, σύμφωνα με την εξίσωση $E = h \times c / \lambda$ όπου h είναι η σταθερά του Planck και c και λ είναι η ταχύτητα του φωτός και το μήκος κύματος, αντίστοιχα. Αν η απορροφούμενη ενέργεια του φωτονίου είναι μεγαλύτερη από την απολύτως απαραίτητη για τη μετάπτωση του ηλεκτρονίου από την κατάσταση ηρεμίας στην κατάσταση διέγερσης S₁, το μόριο θα υποστεί περαιτέρω μεταβολές στη δόνηση και

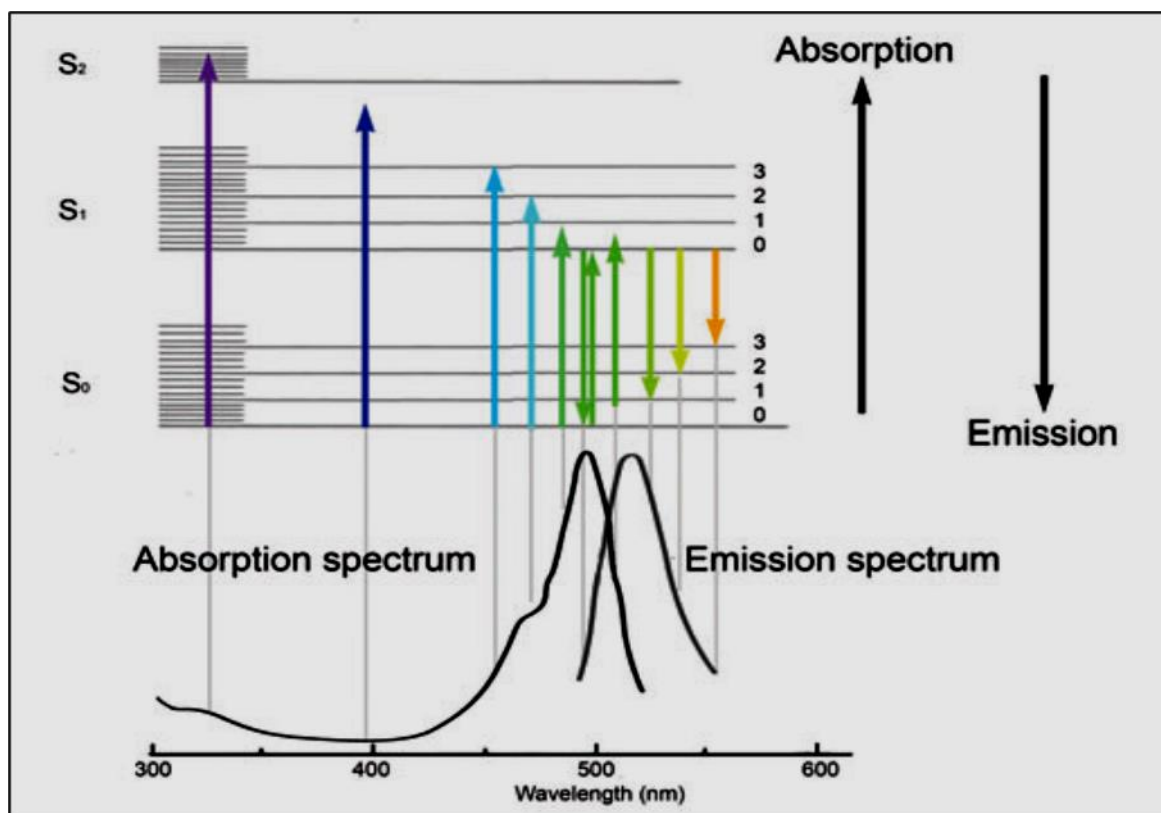
στην περιστροφή του και στην περίπτωση που η ενέργεια δεν απορροφηθεί ολόκληρη, τα ηλεκτρόνια θα κινηθούν στην τροχιά με την αμέσως υψηλότερη ενέργεια (S₂). Οι μεταπτώσεις αυτές είναι ταχύτατες και πραγματοποιούνται femtoseconds μετά την απορρόφηση της ενέργειας (Εικόνα 33). Επομένως, η ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για φθορισμό προέρχεται από ένα φωτόνιο που μπορεί να προκαλέσει τη μετάπτωση των ηλεκτρονίων των ατόμων της φθοροφόρου ουσίας από την τροχιά σε κατάσταση ηρεμίας (S₀) στην τροχιά διέγερσης της επόμενης ενεργειακά μεγαλύτερης ηλεκτρονιακής στάθμης (S₁). Εκμεταλλευόμενοι τον κυματοσωματιδιακό δυϊσμό του φωτός, δηλαδή την ιδιότητα των φωτονίων να συμπεριφέρονται ως κύμα και σωματίδια ταυτόχρονα, μπορούμε να καθορίσουμε την απαιτούμενη αυτή ελάχιστη ενέργεια διέγερσης καθορίζοντας αντιστρόφως ανάλογα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης που εκπέμπεται. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται ασκείται αθροιστικά επί του φθοροφόρου μορίου, οπότε ένα φωτόνιο με ενέργεια X θα έχει την ίδια δυναμική διέγερσης με δύο φωτόνια ενέργειας X/2 (Lichtman and Conchello, 2005).



Εικόνα 33. Χρονικά διαστήματα των παρατηρούμενων αλλαγών που παρατηρούνται στην ηλεκτρονιακή δομή των ατόμων των φθοροφόρων ουσιών κατά της βάσεις διέγερσης και εκπομπής του φθορισμού (Lichtman and Conchello, 2005).

Τα άτομα της φθοροφόρου ουσίας παραμένουν σε κατάσταση διέγερσης για απειροελάχιστο χρόνο, καθώς έχουν την εγγενή τάση να επιστρέφουν άμεσα στην κατάσταση ηρεμίας (S₀), όπου και έχουν την ελάχιστη ενέργεια που απαιτείται για να

διατηρηθούν ως σταθερές μοριακές δομές. Η απορροφούμενη λοιπόν ενέργεια σταδιακά αποδίδεται στο σύνολό της στο περιβάλλον μέσω πολλαπλών μηχανισμών, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται εσωτερική μετατροπή (internal conversion). Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση όπου η απορροφούμενη ενέργεια είχε σαν αποτέλεσμα την μετάβαση των ηλεκτρονίων της εξώτατης στιβάδας στην διεγερμένη κατάσταση S_2 , τότε η μετάβαση από την S_2 στην S_1 πραγματοποιείται μέσω της ισο-ενεργειακής μετάβασης, από το επίπεδο υψηλότερης ενέργειας και χαμηλότερου δυναμικού δονήσεων (vibrational mode), δηλαδή από το επίπεδο S_2 , στο επίπεδο χαμηλότερης ενέργειας και υψηλότερου δυναμικού δονήσεων, δηλαδή στο επίπεδο S_1 . Η αύξηση που παρατηρείται στο δυναμικό των δονήσεων των ατόμων κατά τη μετάβαση αυτή εν τέλει εκτονώνεται (vibrational relaxation) με τη μεταφορά της ενέργειας των δονήσεων στα γειτονικά μόρια μέσω άμεσης επαφής. Στα υδατικά διαλύματα τα μόρια του νερού είναι οι τελικοί αποδέκτες της ενέργειας της. Η μετάβαση από την S_2 στην κατώτατη ενεργειακή στιβάδα S_1 , η οποία πραγματοποιείται μέσω της εσωτερικής μετατροπής και της εκτόνωσης της ενέργειας των δονήσεων, λαμβάνει χώρα μέσα σε picoseconds, ενώ δεν συνοδεύεται από εκπομπή φωτός (Εικόνα 34) (Lichtman and Conchello, 2005).



Εικόνα 34. Φάσματα εισερχόμενης και εκπεμπόμενης ακτινοβολίας των φθοροφόρων μορίων (Lichtman and Conchello, 2005).

Στις φθοροφόρες ουσίες η τελική ενεργειακή μετάβαση από την κατάσταση διέγερσης S1 στην κατάσταση ηρεμίας S0 πραγματοποιείται με την απόδοση ενέργειας υπό την μορφή της φωτονίου, δηλαδή μέσω φθορισμού. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, μέρος της ενέργειας της απορροφούμενης ακτινοβολίας που οδήγησε στη διέγερση χάνεται λόγω της εσωτερικής μετατροπής και της εκτόνωσης της ενέργειας των δονήσεων κατά την μετάβαση από την στάθμη διέγερσης S2 στην χαμηλότερη στάθμη διέγερσης S1. Επομένως, η ενέργεια που εκπέμπεται υπό την μορφή φθορισμού, κατά τη μετάβαση από την χαμηλότερη στάθμη διέγερσης (S1) στην κατάσταση ηρεμίας (S0), είναι μικρότερη από αυτή που απορροφήθηκε αρχικά και διεγείρει το φθοροφόρο από την S0 στην S2. Κατά συνέπεια, το μήκος κύματος του φωτός εκπομπής (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο του φωτός διέγερσης, καθώς η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος ($E = h \times c / \lambda$) (Lichtman and Conchello, 2005). Συνοψίζοντας, κατά τον φθορισμό, η ακτινοβολία διέγερσης είναι μεγαλύτερης ενέργειας και μικρότερου μήκους κύματος, ενώ η ακτινοβολία εκπομπής είναι μικρότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η μελέτη των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής οδήγησε στην ταυτοποίηση πληθώρας φθορίζουσών ουσιών και έφερε επανάσταση στην μικροσκοπία στο πλαίσιο της βιοϊατρικής έρευνας.

Στο σημείο αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιαστούν τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των ουσιών που παρουσιάζουν ιδιότητες φθορισμού. Ενώ έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμες οργανικές ουσίες που παρουσιάζουν εγγενείς ιδιότητες φθορισμού (αυτοφθορισμός), λίγες εξ αυτών χρησιμοποιούνται για την σήμανση διαφόρων στοιχείων των βιολογικών συστημάτων. Η τυπική προσέγγιση στην μικροσκοπία φθορισμού είναι η χρήση συνθετικών φθορίζουσών στοιχείων, τα οποία στο σύνολό τους φέρουν συζευγμένους διπλούς δεσμούς. Η αρχιτεκτονική των στοιχείων αυτών συνήθως χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων με πi δεσμούς, τα ηλεκτρόνια των εξώτατων στοιβάδων των οποίων διασπείρονται σε πολλαπλές στάθμες μετά από διέγερση. Τα στοιχεία αυτά είναι ιδανικά για την μικροσκοπία φθορισμού, καθώς η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της στάθμης ηρεμίας (S0) και των διεγερμένων τροχιών (S1 και S2) είναι μικρή. Ως εκ τούτου, ακόμα και φωτόνια μικρής ενέργειας και μήκους κύματος στο ορατό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορούν να διεγείρουν τα ηλεκτρόνια των εξώτατων στοιβάδων και να επάγουν τον φθορισμό. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να πούμε πως, όσο περισσότερους συζευγμένους διπλούς δεσμούς έχει μία φθορίζουσα ουσία στα μόριά της, τόσο χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος (προς το κόκκινο) ενέργεια διέγερσης απαιτείται για να επάγει τον φθορισμό της ουσίας. Κατά αναλογία, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία

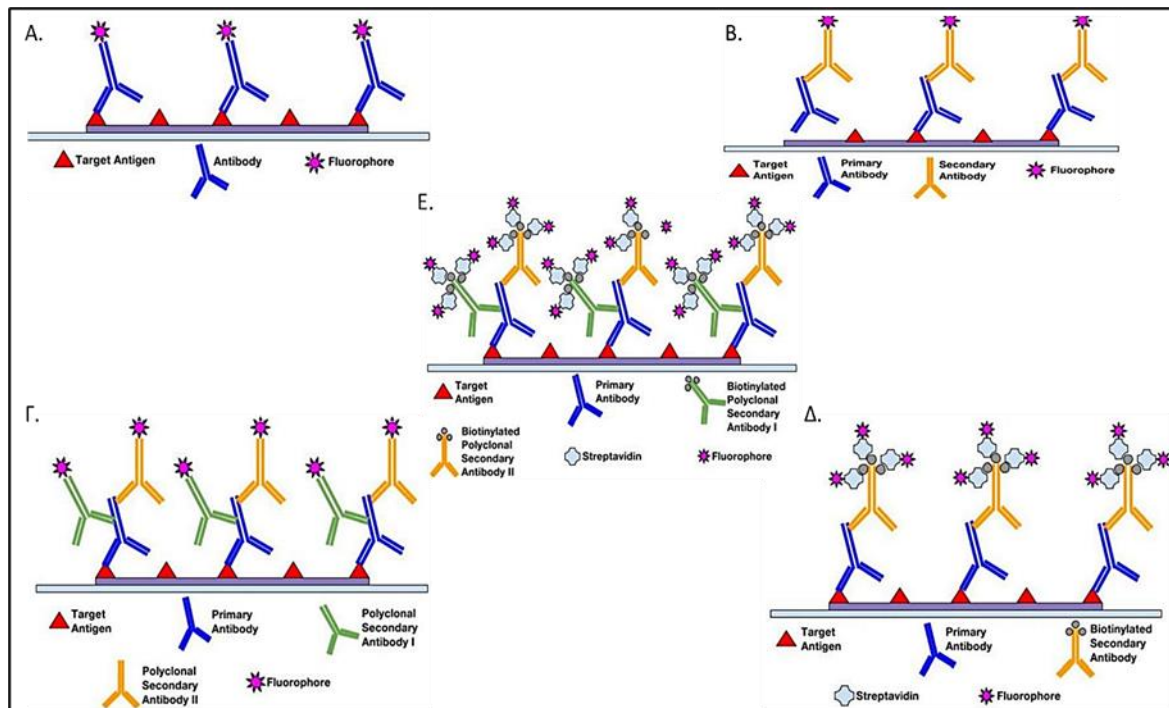
(φθορισμός) είναι ακόμα μικρότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος (πιο κόκκινη από την ακτινοβολία διέγερσης). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως η αποτελεσματικότητα (efficiency) του φθορισμού, η οποία υπολογίζεται με την κβαντική απόδοση παραγωγής φθορισμού (fluorescent quantum yield), αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του αριθμού των πi δεσμών στα μόρια των φθορίζουσών ουσιών (Lichtman and Conchello, 2005).

Ένα από τα πλέον γνωστά και ευρέως διαδεδομένα μόρια που χρησιμοποιούνται στην μικροσκοπία φθορισμού, για την σήμανση βιολογικών μορίων, είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), το γονίδιο της οποίας απομονώθηκε από την μέδουσα *Aequorea victoria*. Η GFP διεγείρεται από ιώδη ακτινοβολία και εκπέμπει στο πράσινο, όπως καταδεικνύει και το όνομά της. Μέσω της βιοτεχνολογίας η GFP έχει αποτελέσει τη βάση της δημιουργίας μίας μεγάλης ποικιλίας άλλων φθορίζουσών ουσιών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (yellow fluorescent protein, YFP). Η YFP είναι αποτέλεσμα της εισαγωγής μεταλλάξεων στη δομή “δακτυλίου” (ring structure) της GFP, η οποία δομή είναι αυτή που ουσιαστικά αποτελεί το φθορίζον στοιχείο. Μέσω των μεταλλάξεων αυτών εισήχθησαν περισσότεροι συζευγμένοι πi δεσμοί στο μόριο της GFP, με αποτέλεσμα να μετατοπιστούν τόσα τα φάσματα διέγερσης, όσο και τα φάσματα εκπομπής της GFP σε ακτινοβολίες μικρότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος. Με αυτόν τον τρόπο προέκυψε η YFP. Σε γενικές γραμμές, οι συνθετικές φθορίζουσες πρωτεΐνες έχουν πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος από τα αντίστοιχα οργανικά φθοροφόρα μόρια (περίπου 25.000 Dalton έναντι 1.000 Dalton). Σήμερα, έχουν δημιουργηθεί πολυάριθμοι φθορίζοντες ανιχνευτές, ο αριθμός των οποίων ξεπερνά της 3.000, οι οποίοι αποτελούν το μέσο σήμανσης πολλών στοιχείων των βιολογικών συστημάτων. Το μεγάλο εύρος φάσματος διέγερσης και εκπομπής των σύγχρονων φθοροφόρων ανιχνευτών επιτρέπει την ταυτόχρονη παρατήρηση διαφορετικών κυτταρικών και υποκυτταρικών ή ακόμα και μοριακών συστατικών. Οι εξαιρετικές αυτές ιδιότητες των φθοροφόρων ανιχνευτών έχουν καταστήσει τη μικροσκοπία φθορισμού ένα από τα πιο βασικά εργαλεία για τη μελέτη και την κατανόηση πολλών βιολογικών μηχανισμών, όπως είναι η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, η μελέτη της εντόπισης και της δράσης των πρωτεϊνών και η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων και της κυτταρικής δυναμικής (FRAP, FLIM και FRET) (De Los Santos et al., 2015).

Όπως τονίστηκε και παραπάνω, η μεγάλη πλειονότητα των κυτταρικών και υποκυτταρικών στοιχείων δεν παρουσιάζουν ιδιότητες φθορισμού, οπότε αναπτύχθηκαν μέθοδοι για τη σήμανση των βιολογικών στοιχείων με φθορίζοντα μόρια, προκειμένου να

καταστεί δυνατή η παρατήρησή τους μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι σήμανσης βιολογικών στοιχείων με φθορίζοντα μόρια είναι η μέθοδος της δημιουργίας χμαιοικών πρωτεϊνών και η μέθοδος του ανοσοφθορισμού (immunofluorescence staining) (Im et al., 2019; Snapp, 2005). Αναφορικά με τη μέθοδο της δημιουργίας χμαιοικών πρωτεϊνών, με την χρήση ειδικών ενζύμων περιορισμού είναι δυνατή η δημιουργία υβριδικών μορίων mRNA, τα οποία αποτελούνται από το mRNA της πρωτεΐνης που θέλουμε να παρατηρήσουμε και από το mRNA της πρωτεΐνης που έχει ιδιότητες φθορισμού, όπως είναι η GFP. Στη συνέχεια ακολουθεί διαμόλυνση (transfection) των κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το υβριδικό mRNA. Το υβριδικό mRNA μεταφράζεται και έτσι δημιουργείται η χμαιοική πρωτεΐνη, η οποία από την μία διατηρεί τις ιδιότητες του υπό μελέτη μορίου και από την άλλη εκπέμπει φθορισμό. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η ανίχνευση, ο εντοπισμός και η μελέτη της δυναμικής και της κινητικότητας κυτταρικών και υποκυτταρικών στοιχείων, ακόμα και σε ζώντα κύτταρα και οργανισμούς (Snapp, 2005).

Αναφορικά με τον ανοσοφθορισμό (immunofluorescence staining), ο οποίος αποτελεί και τη μέθοδο εκλογής για την παρούσα διατριβή, φαίνεται πως αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδο σήμανσης βιολογικών στοιχείων. Ο ανοσοφθορισμός, όπως καταδεικνύει και η ονοματολογία, βασίζεται στην πολύ ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιγόνων και των αντισωμάτων και έτσι δίνει την δυνατότητα εκλεκτικής μελέτης συγκεκριμένων κυτταρικών και υποκυτταρικών στοιχείων (Im et al., 2019). Πιο αναλυτικά, αποτελεί μία σημαντική ανοσοχημική μέθοδο, η οποία σε συνδυασμό με τη χρήση κατάλληλων συστημάτων μικροσκοπίας φθορισμού, επιτρέπει την ανίχνευση και την εντόπιση μίας ποικιλίας αντιγόνων σε πολλά δείγματα ιστών και κυτταρικών τύπων. Ο ανοσοφθορισμός χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς σε αντίθεση με την απλή ανοσοϊστοχημεία, δίνει την δυνατότητα σημαντικής ενίσχυσης του σήματος (στην προκειμένη περίπτωση του φθορισμού), ενώ ταυτόχρονα μπορεί να ενσωματωθεί σε μία μεγάλη ποικιλία συστημάτων μικροσκοπίας. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να πούμε πως υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι ανοσοφθορισμού, η επιλογή των οποίων βασίζεται στο είδος και τις ιδιότητες των υπό μελέτη μορίων, αλλά και στο είδος των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται. Οι μέθοδοι αυτοί είναι ο πρωτογενής ή άμεσος ανοσοφθορισμός (direct or primary) και ο έμμεσος ή δευτερογενής ανοσοφθορισμός (secondary) (Εικόνα 35) (Im et al., 2019).



Εικόνα 35. Διαφορετικές μέθοδοι ανοσοφθορισμού. **A)** Άμεσος ή πρωτογενής ανοσοφθορισμός. **B), Γ), Δ)** και **E)** διαφορετικές κατηγορίες έμμεσου ή δευτερογενούς ανοσοφθορισμού με γραφική απεικόνιση των διαθέσιμων τεχνικών για την ενίσχυση του σήματος (τροποποιημένο από (Im et al., 2019)).

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, το πρώτο και πολύ σημαντικό βήμα για την επιτυχία του ανοσοφθορισμού είναι η μονιμοποίηση του δείγματος, είτε πρόκειται για κύτταρα, είτε ακόμα και για ιστούς. Σε κάθε περίπτωση η μονιμοποίηση πρέπει να εξασφαλίζει τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των βιολογικών στοιχείων που μελετώνται, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να εξασφαλίζεται πως η μέθοδος μονιμοποίησης δεν θα επηρεάσει την ειδική σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Ως "αντιγόνο" (antigen) ορίζεται ο παράγοντας που μελετάται (στην παρούσα διατριβή η πρωτεΐνη γ -H2AX) και ως "αντίσωμα" (antibody) το αντίσωμα που από την μία ανιχνεύει ειδικά το αντιγόνο ενδιαφέροντος και από την άλλη φέρει το φθοροφόρο μόριο. Η μέθοδος και το πρωτόκολλο μονιμοποίησης θα πρέπει πάντα λοιπόν να δοκιμάζονται και ελέγχονται πριν την διενέργεια των τελικών πειραμάτων, καθώς η αποτελεσματικότητα της μονιμοποίησης σχετίζεται τόσο με το είδος του αντιγόνου, όσο και με το είδος του ή των αντισωμάτων-ανιχνευτών. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια της μεθόδου του ανοσοφθορισμού (Im et al., 2019).

Το δεύτερο και σημαντικό βήμα είναι η ανάκτηση του αντιγόνου (antigen retrieval), όπως ονομάζεται η διαδικασία που έπεται της μονιμοποίησης και έχει ως στόχο την επαναφορά της αρχιτεκτονικής του υπό μελέτη μορίου με σκοπό να εξασφαλιστεί η

αλληλεπίδραση μεταξύ των επιτόπων του αντιγόνου και των ειδικών αντισωμάτων-ανιχνευτών. Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι ανάκτησης του αντιγόνου και αυτές είναι η επαγόμενη από πρωτεάσες ανάκτηση (protease-induced epitope retrieval, PIER) και η επαγόμενη από την θέρμανση ανάκτηση των επιτόπων (heat-induced epitope retrieval, HIER). Όπως και στη περίπτωση της μονιμοποίησης, έτσι και για το πρωτόκολλο της ανάκτησης του αντιγόνου απαιτείται κανονικοποίηση πριν την εφαρμογή (Im et al., 2019).

Μετά τη μονιμοποίηση και την ανάκτηση του αντιγόνου ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με τα αντισώματα-ανιχνευτές. Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι ανοσοφθορισμού: η άμεση ή πρωτογενής και η έμμεση ή δευτερογενής. Στην άμεση ή πρωτογενή μέθοδο το δείγμα επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το φθοροφόρο μόριο και το οποίο αναγνωρίζει έναν ή περισσότερους επιτόπους του αντιγόνου, δηλαδή του στοιχείου που μελετάται (Εικόνα 35, A) (Im et al., 2019).

Στην έμμεση ή δευτερογενή μέθοδο η σήμανση του υπό διερεύνηση στοιχείου πραγματοποιείται μέσω μία διαδικασίας δύο ή περισσότερων σταδίων. Στο πρώτο στάδιο το δείγμα επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody), το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένους επιτόπους του αντιγόνου. Στο δεύτερο στάδιο το δείγμα επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody), το οποίο είναι συζευγμένο με το φθοροφόρο μόριο και το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένους επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος (Εικόνα 35, B) (Im et al., 2019).

Παρά το γεγονός πως η μέθοδος του άμεσου ανοσοφθορισμού είναι πιο γρήγορη και σχετικά πιο απλή, η έμμεση μέθοδος είναι αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς υπερέχει της πρώτης σε σημαντικά στοιχεία, όπως είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η ενίσχυση του σήματος και η ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών στοιχείων στο ίδιο δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, καθίσταται σαφές πως η επιλογή των κατάλληλων αντισωμάτων είναι εξαιρετικά σημαντική για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού. Με σκοπό την αποφυγή πιθανών διασταυρούμενων αντιδράσεων μεταξύ των δευτερογενών αντισωμάτων και ενδογενών ανοσοσφαιρινών του υπό εξέταση δείγματος, το πρωτογενές αντίσωμα πρέπει να προέρχεται από διαφορετικό είδος οργανισμού σε σχέση με το είδος του οργανισμού από το οποίο προέρχεται το δείγμα. Ως εκ τούτου, το δευτερογενές αντίσωμα πρέπει να προέρχεται από διαφορετικό είδος από το είδος προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Συνήθως, το δευτερογενές

αντίσωμα είναι συζευγμένο με φθοροφόρο ανιχνευτή, ο οποίος εκπέμπει φθορισμό μετά από φωτοδιέγερση. Εκτός από τους φθορίζοντες ανιχνευτές χρησιμοποιούνται και ενζυμικοί ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με τα αντισώματα και καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις, όταν προστίθεται το ειδικό υπόστρωμά τους, παράγοντας χρωμογόνες ενώσεις, η συγκέντρωση των οποίων προσδιορίζεται μέσω χρωματομετρίας. Συνηθέστερα, τα πρωτογενή αντισώματα είναι μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν έναν συγκεκριμένο και πολύ ειδικό επίτοπο του προς διερεύνηση αντιγόνου. Τα δευτερογενή αντισώματα συνήθως είναι πολυκλωνικά αντισώματα ή αντισώματα συζευγμένα με βιοτίνη (Εικόνα 35 Γ, Δ και Ε). Τα πολυκλωνικά δευτερογενή αντισώματα αναγνωρίζουν πολλαπλούς επιτόπους των πρωτογενών αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν περισσότερα του ενός πολυκλωνικά δευτερογενή αντισώματα (Εικόνα 35, Γ) ή εναλλακτικά περισσότερες από μία φθοροφόρες ουσίες (Εικόνα 36, Δ), αλλά και συνδυασμός των παραπάνω (Εικόνα 35, Ε). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται σημαντική ενίσχυση του σήματος, αυξάνοντας την ευαισθησία, την ειδικότητα και την ακρίβεια του ανοσοφθορισμού (Im et al., 2019).

Μεταξύ των σταδίων επώασης με τα πρωτογενή ή/και τα δευτερογενή αντισώματα είναι εξαιρετικά σημαντικό να παρεμβάλλονται στάδια έκπλυσης και επώασης των δειγμάτων με διαλύματα αποκλεισμού (blocking buffers). Ο αποκλεισμός (blocking) στοχεύει στην αποτροπή των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντισωμάτων και των επιτόπων που δεν αποτελούν στόχους. Για την επιλογή του κατάλληλου διαλύματος αποκλεισμού πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πως ιδανικά αυτά πρέπει να παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με μη ειδικούς επιτόπους, χωρίς ωστόσο να δεσμεύονται στους επιτόπους-στόχους των αντισωμάτων, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να διατηρείται η αρχιτεκτονική των κυττάρων. Έως σήμερα δεν υπάρχει κοινώς αποδεκτό πρωτόκολλο αποκλεισμού. Για τον λόγο αυτό, τα πρωτόκολλα αποκλεισμού θα πρέπει να δοκιμάζονται και εμπειρικά να καθορίζονται, σε κάθε περίπτωση, λαμβάνοντας υπόψιν τα επιμέρους συστατικά τους, τη διάρκεια της επώασης και το είδος των αντισωμάτων. Σε γενικές γραμμές, τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα αποκλεισμού αποτελούνται από διαλύματα πρωτεϊνών, ορό (normal serum) και εμπορικός διαθέσιμα διαλύματα που δεν περιέχουν πρωτεΐνες (protein-free commercial buffers). Τα πρωτεϊνικής σύστασης διαλύματα αποκλεισμού αποτελούνται από υψηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται σε όλα τα μη-δεσμευμένα πρωτεϊνικά στοιχεία που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα αποκλεισμού περιορίζουν τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, καθώς τα αντισώματα ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες αποκλεισμού για την

δέσμευση στους ειδικούς επιτόπους που αναγνωρίζουν. Χαρακτηριστικά παραδείγματα διαλυμάτων αποκλεισμού που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών είναι τα διαλύματα αλβουμίνης ορού βοοειδών (bovine serum albumin, BSA), το άπαχο γάλα και τα διαλύματα gelatin (Im et al., 2019).

2.7.2 Πρωτόκολλο δευτερογενούς (έμμεσου) ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της ιστόνης γ -H2AX

Στην παρούσα διατριβή η ανίχνευση της ιστόνης γ -H2AX πραγματοποιήθηκε μέσω δευτερογενούς (έμμεσου) ανοσοφθορισμού. Τα μονομοποιημένα ωκύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν διάλυμα Triton X-100 (0.5% v/v) για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση των ωκυττάρων για μία ώρα σε σταγόνες διαλύματος αποκλεισμού (blocking buffer) BSA/PBS 3% w/v. Στη συνέχεια τα ωκύτταρα μεταφέρθηκαν σε σταγόνες που περιείχαν διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος έναντι της γ -H2AX, όπου και επώαστηκαν ολονύχτια (overnight) στην ψύξη 4 °C. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2, τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ανθρώπινης γ -H2AX, τα οποία προέρχονταν από κουνέλι (anti-human γ -H2AX rabbit monoclonal antibodies, Merck Millipore). Μετά την επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα ακολούθησε έκπλυση των ωκυττάρων σε τρεις σταγόνες με διάλυμα έκπλυσης (washing buffer), για πέντε λεπτά σε κάθε σταγόνα. Ακολούθησε επώαση των ωκυττάρων σε σταγόνες που περιείχαν διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος έναντι των πρωτογενών αντισωμάτων. Η επώαση διήρκησε δύο ώρες και πραγματοποιήθηκε στο σκότος, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυκλωνικά anti-Rabbit αντισώματα σημασμένα με πράσινη φθορίζουσα ουσία (Biotium). Μετά το πέρας των δύο ωρών, τα ωκύτταρα επώαστηκαν σε σταγόνες με διάλυμα Draq7 για την χρώση του DNA. Η επώαση διήρκησε 10 λεπτά και πραγματοποιήθηκε στο σκότος σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολούθησε ένας ακόμα κύκλος έκπλυσης των ωκυττάρων σε σταγόνες διαλύματος έκπλυσης (washing buffer). Μετά την τελευταία έκπλυση τα ωκύτταρα τοποθετήθηκαν σε σταγόνες διαλύματος έκπλυσης (washing buffer) και επιστρώθηκαν σε ειδικά τρυβλία καλλιέργειας (glass bottom culture dishes, 35 mm dish/ 14 mm glass, MatTek), προκειμένου να είναι έτοιμα για παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Σε όλα τα στάδια των επώασεων, με εξαίρεση την φάση της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα, οι μικροσταγόνες με τα διαλύματα καλύφθηκαν με έλαιο.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό της ιστόνης γ -H2AX σε ανθρώπινα ωκύτταρα.

Αντισώματα/ Χρωστικές DNA	Πρωτογενές Αντίσωμα	Δευτερογενές Αντίσωμα	Συγκέντρωση stock		Αραίωση	
			1 ^ο γενές	2 ^ο γενές	1 ^ο γενές	2 ^ο γενές
γ H2AX	anti- γ H2AX (Millipore)	anti-Rabbit green (Biotium)	1 mg/ml	2 mg/ml	1/200	1/200
Draq7 (Biostatus)	-	-	0.3 mM		1/250	

Προετοιμασία διαλύματος Triton X-100 (TX), 0.5% v/v

Το Triton X-100 είναι ένα μη ιονικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται, ώστε να καταστήσει τη μεμβράνη των κυττάρων διαπερατή. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η είσοδος των αντισωμάτων μέσα στα κύτταρα. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με προσθήκη 50 μ L απορρυπαντικού Triton X-100 (Sigma) σε 10 mL PBS. Το διάλυμα αφέθηκε σε θερμομαντική πλάκα (hot-block) στους 37 °C μέχρι την πλήρη διάλυση του απορρυπαντικού.

Προετοιμασία διαλύματος αποκλεισμού (blocking buffer)

Το διάλυμα αποκλεισμού παρασκευάστηκε με προσθήκη 0.3 gr BSA (Biosera) σε 10 mL PBS. Μετά την πλήρη διάλυση του BSA πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10 μ L αζιδίου του νατρίου (sodium azide, NaN₃), το οποίο έχει δράση συντηρητικού. Το διάλυμα μετά την παρασκευή του φυλάχθηκε στους 4°C.

Προετοιμασία διαλύματος αζιδίου του νατρίου (sodium azide, NaN₃)

Το αζίδιο του νατρίου (sodium azide, NaN₃) χρησιμοποιείται ως συντηρητικό για διαλύματα που φυλάσσονται μακροχρόνια και παρουσιάζει αντιμικροβιακές δραστηριότητες, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών και την επιμόλυνση των δειγμάτων. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με προσθήκη ενός γραμμαρίου σκόνης αζιδίου του νατρίου (Fluka/Honeywell) σε 10 mL απιονισμένου νερού. Μετά την διάλυση της σκόνης του αζιδίου του νατρίου, το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα προστέθηκε στα διαλύματα έκπλυσης και αποκλεισμού σε αναλογία 1/1000.

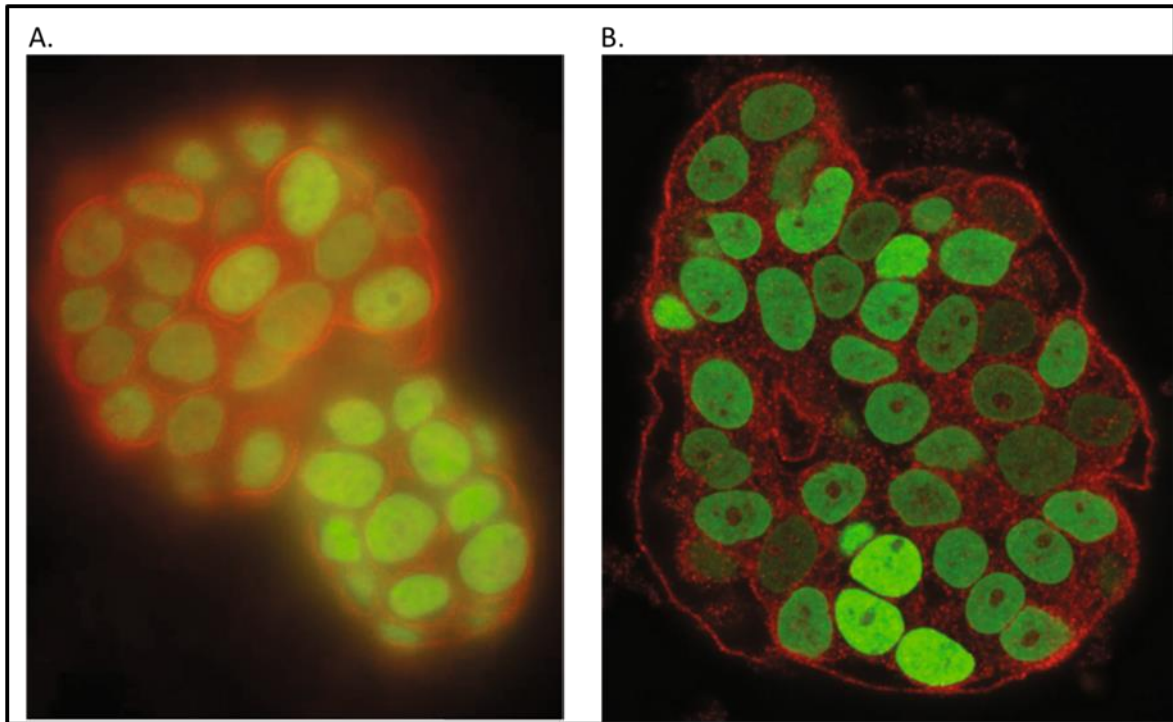
2.8 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των DSBs στα ωοκύτταρα μέσω συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας

Η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του ανοσοφθορισμού της γ -H2AX στα ωοκύτταρα πραγματοποιήθηκε μέσω συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας. Η συγκεκριμένη μέθοδος μικροσκοπίας επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ακρίβεια και διακριτική ικανότητα. Για να γίνει καλύτερα κατανοητό το πώς η συνεστιακή μικροσκοπία συνδράμει στην εξαγωγή βέλτιστων αποτελεσμάτων και άρα συμπερασμάτων και πριν την ανάλυση του πρωτοκόλλου που εφαρμόστηκε, αξίζει να παρουσιαστούν οι βασικές αρχές της συνεστιακής μικροσκοπίας.

2.8.1 Βασικές αρχές συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας

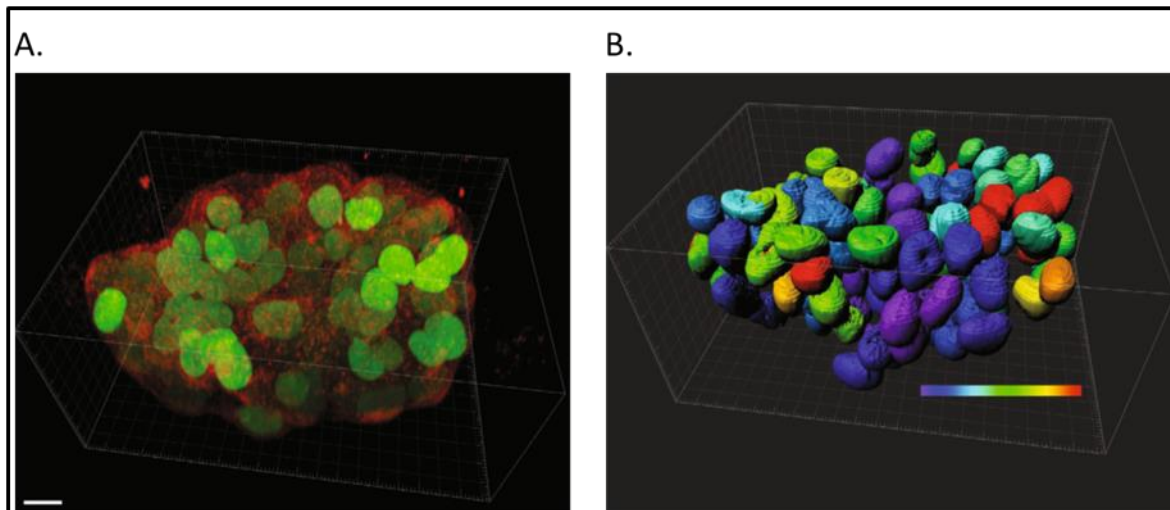
Τα συνεστιακά μικροσκόπια (confocal microscopes) είναι μικροσκόπια που προσφέρουν εικόνες πολύ υψηλότερης ευκρίνειας σε σύγκριση με τα κλασικά μικροσκόπια ευρέως πεδίου (widefield) (οπτικά ή μικροσκόπια φθορισμού), αλλά το μεγαλύτερο πλεονέκτημά τους είναι πως παράγουν εικόνες υψηλής αντίθεσης μεταξύ του αντικειμένου και του περιβάλλοντος μέσω "οπτικών τομών" του δείγματος που αναλύεται. Πιο συγκεκριμένα, όταν η ανάλυση πραγματοποιείται σε μικροσκόπια ευρέως πεδίου, τα οπτικά σήματα που έρχονται από δομές που βρίσκονται εκτός του πεδίου εστίασης δεν μπορούν να απομονωθούν και ως εκ τούτου δημιουργείται "θόρυβος", ο οποίος περιορίζει την διακριτική ικανότητα και την ευκρίνεια και ως εκ τούτου μειώνει σημαντικά την ποιότητα της ανάλυσης. Τα συνεστιακά μικροσκόπια δίνουν την δυνατότητα απομόνωσης των οπτικών σημάτων που προέρχονται από δομές που βρίσκονται εκτός του πεδίου εστίασης και με αυτόν τον τρόπο εκμηδενίζεται σχεδόν ο "θόρυβος", προσφέροντας εικόνες υψηλής αναλυτικής ευκρίνειας μόνο από τα στοιχεία που βρίσκονται εντός του οπτικού πεδίου (Jonkman et al., 2020) (Εικόνα 36, Α και Β).

Η εξαιρετική αναλυτική ικανότητα που παρουσιάζουν τα συνεστιακά μικροσκόπια οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός πως είναι εξοπλισμένα με ειδικούς αντικειμενικούς φακούς υπερ-υψηλής ευκρίνειας, οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν οπτικές τομές σε ένα δείγμα. Το πάχος των τομών μπορεί να είναι μικρότερο του 1 μm , ενώ δεν απαιτείται η δημιουργία φυσικών ή/και μηχανικών τομών, διατηρώντας έτσι αναλλοίωτη την αρχιτεκτονική και τη δομή των βιολογικών δειγμάτων. Μέσω των οπτικών τομών δίνεται η δυνατότητα ενδεδειγμένης απεικόνισης του συνόλου του δείγματος, μέσω φωτογραφιών υψηλής ευκρίνειας με μηδενικό "θόρυβο" (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Παράδειγμα ποιοτικής ανάλυσης εικόνας **A)** με μικροσκόπιο ευρέως πεδίου (widefield) και **B)** με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal). Το δείγμα αποτελείται από μονιμοποιημένα οργανοειδή (organoids). Η πράσινη φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση της πυρηνικής πρωτεΐνης (green: H2B-Venus) και η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των μεμβρανών (red: Dil, Thermo Fisher). Τροποποιημένη από (Jonkman et al., 2020).

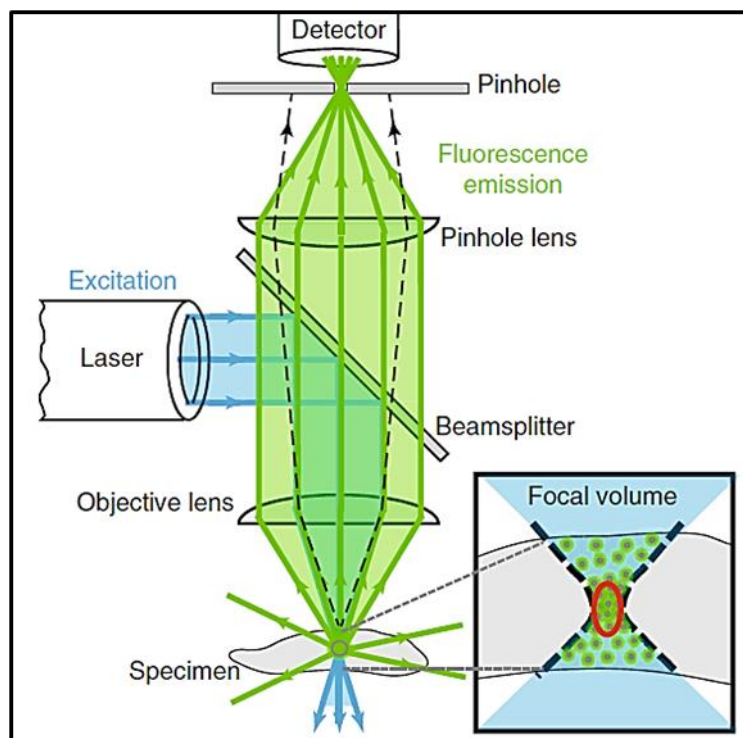
Για τον λόγο αυτό η συνεστιακή μικροσκοπία αποτελεί σήμερα τη μέθοδο εκλογής για τη ποσοτική και ποιοτική διερεύνηση της εντόπισης ή της συν-εντόπισης ενός ή περισσότερων φθορίζοντων στοιχείων σε ένα βιολογικό δείγμα, σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο. Μία απλή οπτική τομή ή αλλιώς οπτικό τεμάχιο (slice) μπορεί να αξιολογηθεί για τη ποσοτική ανάλυση διαφόρων φθορίζοντων μορίων, εφόσον είναι αντιπροσωπευτική του συνόλου του πάχους του δείγματος το οποίο αναλύεται. Στην περίπτωση όπου η οπτική τομή δεν εμπεριέχει το σύνολο του δείγματος, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών τομών σε πολλαπλά επίπεδα εστίασης για τη ποσοτικοποίηση του υπό μελέτη στοιχείου. Στη συνέχεια, τα συνεστιακά μικροσκόπια δίνουν την δυνατότητα υπολογιστικής επεξεργασίας των πολλαπλών αυτών τομών, με σκοπό την τρισδιάστατη (3D) αναδόμηση της αρχιτεκτονικής των δειγμάτων, επιτρέποντας έτσι την ακριβή ποιοτική και ποσοτική ανάλυση στο σύνολο του δείγματος (Jonkman et al., 2020) (Εικόνα 37, A και B).



Εικόνα 37. Απεικόνιση μετά από ανάλυση μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου του δείγματος οργανοειδών που απεικονίστηκε στην Εικόνα 36. **A)** Τρισδιάστατη (3D) αναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής των οργανοειδών μετά από σύνθεση των οπτικών τομών σε διαφορετικά πεδία εστίασης. **B)** Τρισδιάστατη (3D) ποσοτικοποίηση της μέσης πυρηνικής πυκνότητας με χρωματικό κώδικα από 9.000 μετρήσεις (ιώδες) έως και 30.000 μετρήσεις (κόκκινο). Η κλίμακα ορίστηκε στα 10 μm . Τροποποιημένο από (Jonkman et al., 2020).

Αναφορικά με τις βασικές αρχές λειτουργίας και την αρχιτεκτονική του συνεστιακού μικροσκοπίου, παρά τις όποιες διαφορές, όλα αυτά τα μικροσκόπια διαθέτουν μία ή περισσότερες στρατηγικά τοποθετημένες οπές (pinhole apertures). Στην Εικόνα 38 απεικονίζονται διαγραμματικά τα βασικά στοιχεία του συνεστιακού μικροσκοπίου, καθώς και η διαδρομή που ακολουθεί το φως (lightpath) στα κλασικά confocal laser-scanning microscopes (CLSM). Πιο αναλυτικά, μία δέσμη laser, κατάλληλης ενέργειας και μήκους κύματος, στοχεύει το δείγμα που έχει τοποθετηθεί στο μικροσκόπιο. Η ενέργεια και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας διέγερσης καθορίζεται με βάση τα χαρακτηριστικά του φάσματος διέγερσης και εκπομπής του φθοροφόρου ανιχνευτή (ή ανιχνευτών) που έχουν επιλεγεί, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.7. Μόλις η ακτινοβολία διέγερσης (laser) διεγείρει τους φθορίζοντες ανιχνευτές, τότε τα διεγερμένα μόρια, κατά την μετάβασή τους στην σταθερή κατάσταση, εκπέμπουν ακτινοβολία (φθορισμό) σε όλο το εύρος του οπτικού πεδίου (entire cone of illumination). Το φως (φθορισμός) που εκπέμπεται από τα διεγερμένα φθορίζοντα μόρια, συλλέγεται από τους αντικειμενικούς φακούς του μικροσκοπίου και εστιάζεται από ένα δεύτερο σύστημα φακών (second lens), ώστε να διέλθει μέσα από μία ή περισσότερες στρατηγικά τοποθετημένες οπές (pinholes). Η διέλευση του εκπεμπόμενου φθορισμού μέσα από τις οπές διασφαλίζει πως μόνο ο φθορισμός που εκπέμπεται από το συγκεκριμένο οπτικό πεδίο θα φτάσει στον ανιχνευτή φθορισμού (detector), ενώ ο

φθορισμός που εκπέμπεται από ανώτερα ή κατώτερα οπτικά πεδία παρεμποδίζεται. Καθώς τα μικροσκόπια CLSM συλλέγουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από μόνο ένα οπτικό πεδίο, ειδικά κάτοπτρα σάρωσης (scanning mirrors) χρησιμοποιούνται για να εκτρέψουν την ακτινοβολία διέγερσης (laser) σε όλη την έκταση του υπό μελέτη δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα απεικονίζεται με υψηλή ευκρίνεια σε όλη του την έκταση 'pixel by pixel'. Παρά το γεγονός πως η τόσο λεπτομερής απεικόνιση φαίνεται ως μία χρονοβόρος διαδικασία, στην πραγματικότητα τα συστήματα CLSM παρουσιάζουν εξαιρετική δυναμική σάρωσης και απεικόνισης και είναι σε θέση να παρέχουν εικόνες ευκρίνειας 1 megapixel σε ένα μόλις δευτερόλεπτο (Jonkman et al., 2020).



Εικόνα 38. Γραφική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των συστημάτων confocal laser-scanning microscopes. Τροποποιημένο από (Jonkman et al., 2020).

Συνοψίζοντας, η ιδιαιτερότητα της συνεστιακής μικροσκοπίας, η οποία την καθιστά ένα πολυδύναμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών, είναι πως μόνο ο φθορισμός που προέρχεται από ένα συγκεκριμένο οπτικό πεδίο αναλύεται κάθε φορά, ενώ όλη η ακτινοβολία που προέρχεται από άλλα σημεία αποκλείεται από τον ανιχνευτή μέσω μιας οπής (pinhole). Έτσι, το δείγμα σαρώνεται σε όλες τις διαστάσεις του, από άκρη σε άκρη

και σχηματίζονται εικόνες από πολλά διαφορετικά πεδία εστίασης. Οι εικόνες αυτές είναι εξαιρετικά υψηλής ευκρίνειας και ανάλυσης, καθώς εκμηδενίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό ο αντίκτυπος του "θορύβου" (background), με αποτέλεσμα να καθίσταται ιδιαίτερα αποτελεσματική η μελέτη των χαρακτηριστικών των δειγμάτων σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο. Οι εικόνες αυτές μπορούν να ενωθούν και να δημιουργήσουν μια τρισδιάστατη και ακριβή απεικόνιση όλου του δείγματος, επιτρέποντας έτσι την εις βάθος ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των χαρακτηριστικών του συνόλου του δείγματος.

2.8.2 Πρωτόκολλο ανάλυσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας των DSBs σε ανθρώπινα ωοκύτταρα

Για τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε ο φακός 40 X με ελαιοκατάδυση, το Argon laser για την διέγερση της πράσινης χρωστικής (480 nm) και το laser Helio 633 για την χρωστική του DNA. Από κάθε κύτταρο ελήφθησαν 4-8 φωτογραφίες από διαφορετικά πεδία εστίασης με το πρόγραμμα LasAF. Οι εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ελήφθησαν με το πρόγραμμα LasAF της Leica.

2.9 Καλλιέργεια GV ωοκυττάρων σε κλιβάνους time-lapse και *in vitro* ωρίμανση

Τα ανώριμα ωάρια σταδίου GV των ομάδων Etop TL και Control TL καλλιεργήθηκαν με σκοπό την *in vitro* ωρίμανσή τους σε κλιβάνους καλλιέργειας ανθρώπινων γαμετών και εμβρύων, οι οποίοι ήταν εξοπλισμένοι με συστήματα συνεχούς εικονοληψίας (time-lapse). Στόχος ήταν να διερευνηθεί το εάν και κατά πόσον τα ωάρια τα οποία προηγουμένως επώαστηκαν με ετοποσίδη και ως εκ τούτου παρουσίαζαν βλάβες στο DNA τύπου DSBs, έχουν την δυνατότητα ομαλής *in vitro* ωρίμανσης σε σύγκριση με τα GV ωάρια της ομάδας ελέγχου. Πιο αναλυτικά, διερευνήθηκε και συγκρίθηκε μεταξύ των ομάδων το ποσοστό των ωαρίων που πέτυχαν ωρίμανση έως το στάδιο MII, εξετάζοντας ταυτόχρονα και τις επιμέρους μεταβάσεις από το στάδιο GV στο στάδιο MI και από το MI στο στάδιο MII. Η χρήση του συστήματος time-lapse επέτρεψε όχι μόνο την ποιοτική ανάλυση των εν λόγω δεδομένων, αλλά ταυτόχρονα και την ποσοτική ανάλυση των επιμέρους χρονικών διαστημάτων, κατά τη μετάβαση από το ένα στάδιο ωρίμανσης στο άλλο. Αυτό αποτελεί και

τη μεγάλη πρωτοτυπία της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς εισάγει στην διεθνή βιβλιογραφία ακριβή δεδομένα αναφορικά με τη συμπεριφορά, τη δυναμική και την κινητική ανθρώπινων ωαρίων που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA, στο πλαίσιο της ωρίμανσής τους.

2.9.1 Συστήματα time-lapse στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή: Βασικές Αρχές Λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας των συστημάτων συνεχούς εικονοληψίας (time-lapse) της εμβρυϊκής ανάπτυξης βασίζεται στη χρήση συστημάτων μικροσκοπίας ειδικών προδιαγραφών, που επιτρέπουν την ψηφιακή και υψηλής ευκρίνειας φωτογράφιση των γαμετών και των εμβρύων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους εντός των επωαστικών κλιβάνων. Πιο αναλυτικά, μέσω της τεχνολογίας time-lapse λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα υψηλής ανάλυσης ψηφιακές φωτογραφικές λήψεις των αναπτυσσόμενων εμβρύων και γαμετών, η περιοδικότητα των οποίων κυμαίνεται συνήθως από 5 – 15 λεπτά. Με αυτόν τον τρόπο συλλέγονται στιγμιότυπα της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα οποία μέσω ειδικών λογισμικών και υπολογιστικών προγραμμάτων ενώνονται και έτσι σχηματίζονται βίντεο time-lapse, στα οποία αποτυπώνεται συνολικά η ανάπτυξη, από την στιγμή που οι γαμέτες ή/και τα έμβρυα εισάγονται στον κλίβανο για καλλιέργεια έως και την ολοκλήρωση της καλλιέργειας. Την τελευταία δεκαετία η χρήση των συστημάτων time-lapse έχει προκαλέσει επανάσταση στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή και βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας, τόσο για την μελέτη της κλινικής σημασίας που έχουν, όσο και για την βελτιστοποίησή τους.

Η χρήση της τεχνολογίας time-lapse παρουσιάζει κάποια πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Το πρώτο σχετίζεται με το είδος των δεδομένων που προσφέρουν για την αξιολόγηση της ποιότητας των εμβρύων, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχία ενός κύκλου IVF. Παραδοσιακά, η αξιολόγηση της εμβρυϊκής ποιότητας περιλαμβάνει την έξοδο των εμβρύων από τον κλίβανο και την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών αυτών σε μία δεδομένη χρονική στιγμή με τη χρήση αναστροφών μικροσκοπίων υψηλής ευκρίνειας. Η παραδοσιακή αξιολόγηση πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά ορόσημα (milestones), όπως είναι η ημέρα μετά την γονιμοποίηση, η 3^η ημέρα (στάδιο αυλάκωσης) και η 5^η ημέρα (στάδιο της βλαστοκύστης) της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Όπως γίνεται αντιληπτό, μέσω της παραδοσιακής αξιολόγησης ο εμβρυολόγος είναι σε θέση να αναλύσει συγκεκριμένες παραμέτρους που σχετίζονται με το εάν και τα πόσον το έμβρυο αναπτύσσεται με φυσιολογικούς ρυθμούς, καθώς και παραμέτρους που σχετίζονται με

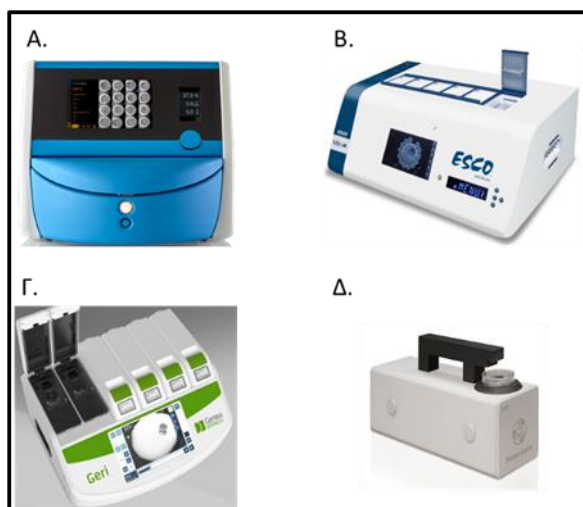
την μορφολογία των εμβρύων, όπως είναι ο αριθμός, το σχήμα και η αρχιτεκτονική των κυττάρων και η ύπαρξη ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών σχηματισμών (π.χ θραύσματα). Ωστόσο, σημαντικά δεδομένα που σχετίζονται με την ποιότητα, το δυναμικό εμφύτευσης και την "κινητικότητα" των εμβρύων, όπως είναι ο ρυθμός και ο προσανατολισμός των κυτταρικών διαιρέσεων, αλλά και οι ακριβείς χρόνοι μεταξύ μετάβασης από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο άλλο, δεν μπορούν να αξιολογηθούν μέσω της συμβατικής "μορφολογικής" αξιολόγησης. Ως εκ τούτου, τα συστήματα time-lapse αποτυπώνουν με ακρίβεια "μορφοκινητικά" χαρακτηριστικά των εμβρύων και των γαμετών, εξασφαλίζοντας την παροχή σημαντικών πληροφοριών στους κλινικούς εμβρυολόγους.

Το δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα που προσφέρουν τα συστήματα time-lapse αφορά τη διατήρηση σταθερών συνθηκών ανάπτυξης κατά την καλλιέργεια των εμβρύων. Κατά τη συμβατική αξιολόγηση της μορφολογίας των εμβρύων απαιτείται η απομάκρυνση των εμβρύων από τις σταθερές συνθήκες καλλιέργειας που επικρατούν εντός των επωαστικών κλιβάνων. Έχει βρεθεί πως η διατάραξη της θερμοκρασίας και του pH, ακόμα και για σύντομο χρονικό διάστημα, μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την εμβρυϊκή ανάπτυξη και το δυναμικό εμφύτευσης. Μέσω των συστημάτων καλλιέργειας time-lapse, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων καινοτόμων καλλιεργητικών υλικών single-step, δίνεται λοιπόν η δυνατότητα της αξιολόγησης της εμβρυϊκής ποιότητας, χωρίς να απαιτείται η απομάκρυνση των εμβρύων από τον κλίβανο.

Το τρίτο και ίσως σημαντικότερο πλεονέκτημα των συστημάτων time-lapse αφορά την αξιοπιστία και την προγνωστική ακρίβεια της αξιολόγησης της εμβρυϊκής ποιότητας αυτής καθαυτής. Πέραν του γεγονότος πως τα συστήματα time-lapse παρέχουν πληροφορίες για δεκάδες πλέον παραμέτρους που αφορούν τα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά των εμβρύων, ο συνδυασμός των πολυάριθμων αυτών δεδομένων με την τεχνητή νοημοσύνη (artificial intelligence, AI) έχει φέρει επανάσταση στην κλινική εμβρυολογία, αναφορικά με την αξιοπιστία και την ακρίβεια της αξιολόγησης της εμβρυϊκής ποιότητας. Αν και για την συμβατική αξιολόγηση έχουν προταθεί πολλά αξιόπιστα συστήματα και αλγόριθμοι ανάλυσης των μορφολογικών χαρακτηριστικών, τόσο για τα έμβρυα στο στάδιο της αυλάκωσης, όσο και για τα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης, η προγνωστική αξία των συστημάτων αυτών παραμένει χαμηλή και αυτό οφείλεται στην υποκειμενικότητα της παρατήρησης μεταξύ των κλινικών εμβρυολόγων. Έτσι είναι δυνατόν δύο έμπειροι κλινικοί εμβρυολόγοι να αξιολογούν διαφορετικά το ίδιο έμβρυο, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει υψηλή ακρίβεια, κάτι που επηρεάζει σημαντικά τις κλινικές αποφάσεις που λαμβάνονται στο πλαίσιο της IVF.

Σήμερα, τα σύγχρονα συστήματα time-lapse εξοπλίζονται συχνά με συστήματα τεχνητής νοημοσύνης, τα οποία αξιολογούν μία πληθώρα παραμέτρων, ιεραρχώντας τα έμβρυα με βάση τη ποιότητα των μορφοκινητικών τους χαρακτηριστικών, μειώνοντας σημαντικά την μεροληψία (bias) που οφείλεται στην υποκειμενικότητα της ανθρώπινης παρατήρησης. Εξελίσσοντας το μοντέλο αυτό, σήμερα υπάρχουν συστήματα time-lapse/AI που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων, για την αξιολόγηση της ποιότητας και του γονιμοποιητικού δυναμικού των σπερματοζωαρίων, αλλά και στο πλαίσιο του μη επεμβατικού προεμφυτευτικού γενετικού ελέγχου με σκοπό την εντόπιση των εμβρύων που φέρουν πιθανώς ανευπλοειδίες, συνδράμοντας σημαντικά το έργο των κλινικών εμβρυολόγων. Επιπρόσθετα, η χρήση της υπολογιστικής νοημοσύνης και των τεχνητών νευρωνικών δικτύων (artificial neural networks), σε συνδυασμό με την τεχνολογία time-lapse, έχει οδηγήσει όχι μόνο στην αποτελεσματική ιεράρχηση των εμβρύων και των γαμετών με βάση τη ποιότητα και το δυναμικό τους, αλλά και στην δημιουργία μοντέλων υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας για την πρόγνωση της έκβασης ενός κύκλου IVF.

Αναφορικά με τα είδη των συστημάτων time-lapse που υπάρχουν σήμερα διαθέσιμα, αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν συστήματα που μπορεί να είναι εκ κατασκευής ενσωματωμένα στον κλίβανο καλλιέργειας ή συστήματα που παρέχονται ως ανεξάρτητες μονάδες και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μία ποικιλία κλιβάνων καλλιέργειας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κλιβάνων καλλιέργειας που εκ κατασκευής φέρουν ενσωματωμένα συστήματα time-lapse είναι οι κλίβανοι EmbryoScope+ (Vitrolife), οι κλίβανοι Esco Miri® TL (Esco Life Sciences), οι κλίβανοι Genea Geri (Genea Biomedx) και άλλοι, ενώ το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα συστήματος time-lapse το οποίο παρέχεται ως μονάδα είναι το Primo Vision (Vitrolife) (Εικόνα 39).



Εικόνα 39. Διαφορετικά συστήματα time-lapse που υπάρχουν σήμερα διαθέσιμα. **Α-Γ** κλίβανοι που φέρουν ενσωματωμένα συστήματα time-lapse. **Α)** Κλίβανος EmbryoScope+ (Vitrolife), **Β)** Κλίβανος Miri® TL (Esco Life Sciences), **Γ)** Κλίβανος Genea Geri (Genea Biomedx) και **Δ)** Σύστημα time-lapse Primo Vision (Vitrolife).

Σχετικά με τα πρωτόκολλα καλλιέργειας που εφαρμόζονται στο πλαίσιο της χρήσης των συστημάτων time-lapse, πρέπει να σημειωθεί πως απαιτείται μεμονωμένη καλλιέργεια εμβρύων και γαμετών και χρήση single step καλλιεργητικών υλικών. Ανάλογα με το σύστημα time-lapse που χρησιμοποιείται θα πρέπει χρησιμοποιούνται και συγκεκριμένα τρυβλία καλλιέργειας, τα οποία και καθορίζει η εκάστοτε κατασκευαστική εταιρεία που προμηθεύει τα συστήματα time-lapse (Εικόνα 40).



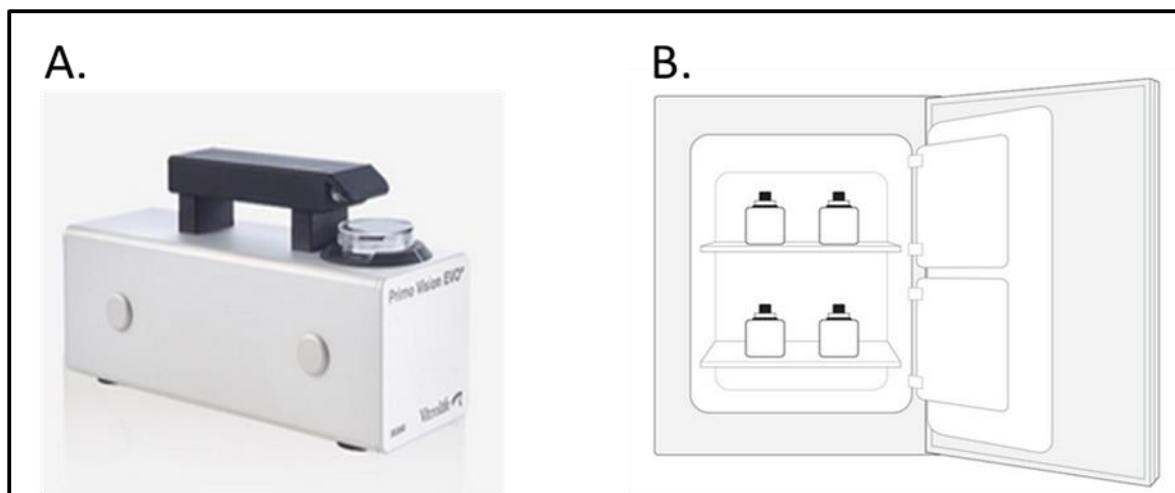
Εικόνα 40. Διαφορετικά τρυβλία καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το σύστημα time-lapse που εφαρμόζεται.

2.9.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας και *in vitro* ωρίμανσης GV ανθρώπινων ωοκυττάρων με χρήση του συστήματος time-lapse Primo Vision

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής για τη μελέτη των μορφοκινητικών χαρακτηριστικών των GV ωαρίων κατά την *in vitro* ωρίμανσή τους χρησιμοποιήθηκε το ψηφιακό ανεστραμμένο μικροσκόπιο τεχνολογίας time-lapse Primo Vision (TK Biotech, Vitrolife). Το Primo Vision είναι ένα φορητό σύστημα time-lapse το οποίο έχει τις προδιαγραφές να ενσωματώνεται σε κλιβάνους καλλιέργειας. Διαθέτει ψηφιακή κάμερα υψηλής ανάλυσης και πραγματοποιεί φωτογραφικές λήψεις των αναπτυσσόμενων εμβρύων/γαμετών με συχνότητα μία λήψη ανά 10 λεπτά. Το σύστημα είναι αξιόπιστο και διαθέτει όλες εκείνες τις προδιαγραφές που εξασφαλίζουν την χρήση του για κλινικούς ή/και ερευνητικούς σκοπούς, καθώς δεν επηρεάζει με κανέναν τρόπο αρνητικά την ανάπτυξη των γαμετών και των εμβρύων.

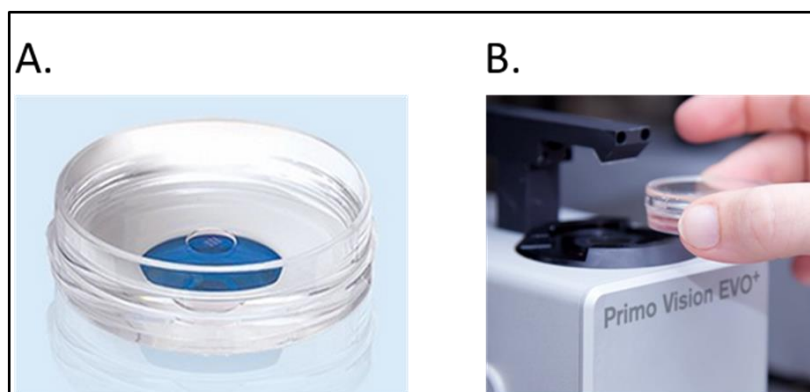
Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, το εν λόγω σύστημα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο επιτραπέζιο κλίβανο Astec Pengium (Astec) σε συνθήκες καλλιέργειας 6.5% CO₂, 5% O₂ και θερμοκρασία 37.5 °C. Για την καλλιέργεια επιστρώθηκαν μικροσταγόνες

καλλιεργητικού υλικού Global For Fertilization (Lifeglobal) με προσθήκη αλβουμίνης LGPS 10 % σε κατάλληλα τρυβλία micro-well (Vitrolife). Οι σταγόνες καλύφθηκαν με έλαιο (heavy mineral oil, Fertiguard oil, Lifeglobal). Στην Εικόνα 41 παρουσιάζεται το σύστημα Primo Vision και η μέθοδος τοποθέτησής του εντός του κλιβάνου.



Εικόνα 41. A) Σύστημα time-lapse Primo Vision και B) μέθοδος τοποθέτησης του συστήματος time-lapse Primo Vision εντός του επωαστικού κλιβάνου.

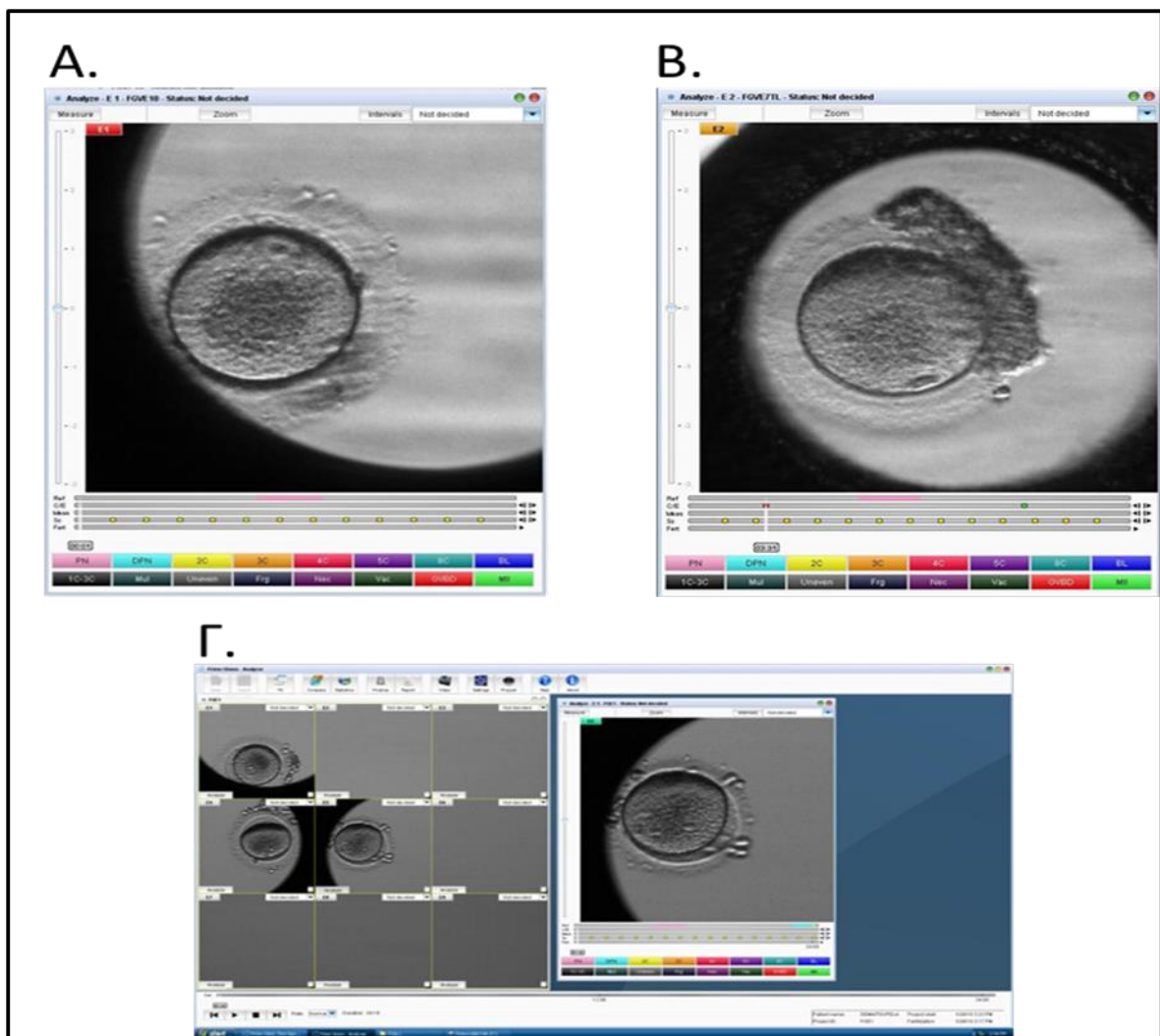
Στην Εικόνα 42 παρουσιάζεται το ειδικό τρυβλίο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε και ο τρόπος τοποθέτησής του στο σύστημα Primo Vision.



Εικόνα 42. A) Ειδικό τρυβλίο για την καλλιέργεια εμβρύων και γαμετών στο πλαίσιο της χρήσης του συστήματος time-lapse Primo Vision. B) Μέθοδος τοποθέτησης των τρυβλίων στο σύστημα Primo Vision.

Η παρακολούθηση της *in vitro* ανάπτυξης των GV ωοκυττάρων και η καταγραφή των μορφοκινητικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού, εξ αποστάσεως μέσω υπολογιστή, χωρίς να προκληθεί διατάραξη των συνθηκών

καλλιέργειας. Ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας ήταν 24 ώρες, καθώς έχει βιβλιογραφικά καταδειχθεί πως μετά τις 24 ώρες η πιθανότητα ωρίμανσης των ωαρίων είναι σχεδόν μηδενική. Το εν λόγω λογισμικό δίνει την δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης της ωρίμανσης έως και 16 ωαρίων σε πραγματικό χρόνο, καθώς και της καταγραφής των μορφοκινητικών δεδομένων με αντίστοιχη καταγραφή του χρόνου. Επιπρόσθετα, δίνει την δυνατότητα σύγχρονης και ασύγχρονης ανάλυσης των δεδομένων αυτών, καθώς τα time-lapse videos αποθηκεύονται εξατομικευμένα για κάθε ωοκύτταρο (Εικόνα 43).



Εικόνα 43. Προβολή του λογισμικού επεξεργασίας του συστήματος time-lapse Primo Vision με δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης των μορφοκινητικών δεδομένων και ανάλυσης της ωρίμανσης όλων των ωαρίων που καλλιεργούνται. **A)** Ωάριο σταδίου GV, **B)** Ωριμο ωάριο MII και **Γ)** προβολή του συνόλου της επιφάνειας εργασίας.

Στο πλαίσιο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα Primo Vision, ώστε να παρακολουθείται ταυτόχρονα η ωρίμανση ωοκυττάρων τόσο από την ομάδα Etop TL, όσο και από την ομάδα Control TL. Πιο αναλυτικά, αμέσως μετά την επώαση με ετοποσίδη, τα ωάρια της ομάδας Etop TL τοποθετήθηκαν σε μικροσταγόνες καλλιεργητικού υλικού στα επιστρωμένα τρυβλία micro-well και αυτά με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στο σύστημα time-lapse Primo Vision εντός του επωαστικού κλιβάνου. Ανάλογες ενέργειες πραγματοποιήθηκαν και για τα GV ωάρια της ομάδας Control TL, χρησιμοποιώντας διαφορετικά τρυβλία micro-well και διαφορετικά συστήματα Primo Vision. Τα ωοκύτταρα και των δύο ομάδων καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες, ταυτόχρονα για 24 ώρες.

Ακολούθησε η ανάλυση των videos και η καταγραφή των μορφοκινητικών δεδομένων κατά την *in vitro* ωρίμανση των ωοκυττάρων. Στο λογισμικό του time-lapse για κάθε ωάριο έγινε καταγραφή των παρακάτω δεδομένων:

1. Επιτυχής ή όχι μετάβαση από το στάδιο GV στο στάδιο MI, η οποία καθορίστηκε από τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle breakdown, GVBD) με καταγραφή του αντίστοιχου χρόνου του GVBD.
2. Επιτυχής ή όχι μετάβαση από το στάδιο MI στο στάδιο MII, η οποία καθορίστηκε από τον σχηματισμό και την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου (polar body extraction, PBE) με καταγραφή του αντίστοιχου χρόνου του PBE.
3. Χαρακτηρισμός και εντόπιση ανώμαλων μορφολογικών χαρακτηριστικών στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων, αλλά και εξωκυτταρικών στοιχείων (π.χ μέγεθος και σχήμα πολικού σωματίου).

Κάθε πείραμα καταχωρήθηκε στα αρχεία του υπολογιστή με την αποθήκευση των σχετικών videos και όλων των χρονικών συμβάντων, με δυνατότητα προβολής και περαιτέρω επεξεργασίας. Αναφορικά με τα GV ωάρια που μετά την εικοσιτετράωρη καλλιέργεια παρέμειναν ανώριμα, δεν σημειώθηκε κάτι στο σχετικό λογισμικό time-lapse. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας και ανεξάρτητα από το βαθμό ωρίμανσης, τα ωοκύτταρα μονιμοποιήθηκαν με σκοπό την πραγματοποίηση αναλύσεων μέσω ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας για τον εντοπισμό βλαβών στο DNA, όπως περιγράφεται στα κεφάλαια 2.6, 2.7 και 2.8.

Στόχος ήταν να διερευνηθεί το εάν και σε τι ποσοστό τα ωοκύτταρα καταφέρνουν καταρχάς να ωριμάσουν παρουσία επιβεβαιωμένης βλάβης στο DNA, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου, καθώς και να διερευνηθεί το εάν και κατά πόσον υπάρχει επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA μεταξύ των ωοκυττάρων της ομάδας Etop TL που κατάφεραν να ωριμάσουν, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ωοκύτταρα της ίδια ομάδας που δεν κατάφεραν να ωριμάσουν, καθώς και με τα ωοκύτταρα της ομάδας Control TL.

2.10 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων

Για την επεξεργασία των εικόνων και τη μέτρηση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ/FIJI. Συγκεκριμένα, με το πρόγραμμα ImageJ/FIJI ενώθηκαν οι εικόνες από τα επιμέρους εστιακά πεδία (stack) και δημιουργήθηκε μια συνολική εικόνα του κυττάρου (z projection). Στην συνέχεια για τα πειράματα μέτρησης φθορισμού, σχεδιάστηκε η περιοχή του DNA (χωρίς τον πυρηνίσκο) και μετρήθηκε η ένταση φθορισμού της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ -H2AX. Οι μονάδες για τη μέτρηση φθορισμού είναι αυθαίρετες και εδώ χρησιμοποιήθηκε η μονάδα RFU (Relative Fluorescence Unit). Από την μέτρηση αυτή αφαιρέθηκε η μέτρηση από μια περιοχή αντίστοιχου μεγέθους του κυτταροπλάσματος (background). Η αριθμητική ανάλυση έγινε με το Microsoft Office Excel 2019. Η μέθοδος κανονικοποίησης των δεδομένων από τις μετρήσεις φθορισμού της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ -H2AX αποσκοπούν στην μείωση των αποκλίσεων του φθορισμού που προκύπτουν από πείραμα σε πείραμα, ώστε να καθίσταται δυνατή η στατιστική σύγκριση. Για την κανονικοποίηση των μετρήσεων (Inormalized), σε κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε, κάθε μέτρηση φθορισμού (I) διαιρέθηκε με την μέγιστη τιμή φθορισμού του συγκεκριμένου πειράματος (Imax) [Inormalized = I/Imax].

Αναφορικά με την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism (έκδοση 8.4.3) και της Γλώσσας Προγραμματισμού R για Στατιστικούς Σκοπούς. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη της κανονικότητας της κατανομής όλων των χαρακτηριστικών με εφαρμογή των δοκιμασιών Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov. Για την περιγραφική στατιστική των συνεχών μεταβλητών που ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation). Για την περιγραφική

στατιστική των μεταβλητών που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε η διάμεσος (median) και το εύρος interquartile (IQR). Ωστόσο, επειδή η πλειονότητα των μεταβλητών ακολουθούσε την κανονική κατανομή, ενώ σε λίγες εκ των μεταβλητών παρατηρήθηκε μη κανονική κατανομή και για λόγους ομοιομορφίας στην παρουσίαση της περιγραφικής στατιστικής, αποφασίστηκε όλα τα περιγραφικά δεδομένα να παρουσιαστούν υπό την μορφή mean και SD. Για την σύγκριση των μέσων όρων στην περίπτωση κανονικής κατανομής χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική δοκιμασία t-test, ενώ για της μη κανονικές μεταβλητές η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Η σύγκριση μεταξύ ποιοτικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Fisher's exact test.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά Μελέτης και Πληθυσμού

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από 24 δότριες ωαρίων, οι οποίες υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών και πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού, όπως αυτά περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2. Οι δότριες δώρισαν ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV, που προέκυψαν κατά τον κύκλο διέγερσης, για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, έπειτα από προφορική και ενυπόγραφη ενημερωμένη συγκατάθεση.

Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της ηλικίας του υπό μελέτη πληθυσμού ήταν 27.59 ± 5.83 έτη. Συνολικά, 158 ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV χρησιμοποιήθηκαν για τους ερευνητικούς σκοπούς της μελέτης. Ο μέσος όρος των ανώριμων ωοκυττάρων ανά δότρια ήταν 6.58. Η κατανομή των ωοκυττάρων στις πειραματικές ομάδες πραγματοποιήθηκε τυχαίοποιημένα και με γνώμονα οι υπό σύγκριση ομάδες να έχουν σχεδόν τον ίδιο αριθμό ωοκυττάρων.

Πιο αναλυτικά, στις ομάδες όπου τα ωοκύτταρα μονιμοποιήθηκαν άμεσα με (Etop PF) ή χωρίς (Control PF) προηγούμενη επώαση σε ετοποσίδη συμπεριελήφθησαν 23 και 18 ωοκύτταρα, αντίστοιχα. Στις ομάδες όπου ακολουθήθηκε καλλιέργεια σε σύστημα time-lapse με σκοπό την *in vitro* ωρίμανση με (Etop TL) ή χωρίς (Control TL) επώαση σε ετοποσίδη συμπεριελήφθησαν 57 και 60 ανώριμα ωοκύτταρα, αντίστοιχα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Γενικά χαρακτηριστικά της μελέτης και του υπό μελέτη πληθυσμού.

Συνολικός Αριθμός Συμμετεχόντων (n)	30
Ηλικία (χρόνια)	27.59 ± 5.83
Απόλυτος αριθμός GV ωοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν	158
Μέσος όρος GV ωοκυττάρων ανά δότρια	5.27
Απόλυτος Αριθμός GV ωοκυττάρων Ομάδα Control PF	23
Απόλυτος Αριθμός GV ωοκυττάρων Ομάδα Etop PF	18
Απόλυτος Αριθμός GV ωοκυττάρων Ομάδα Control TL	57
Απόλυτος Αριθμός GV ωοκυττάρων Ομάδα Etop TL	60

3.2 Μηχανισμός Ελέγχου Πρόφασης 1^{ης} Μειωτικής Διαίρεσης

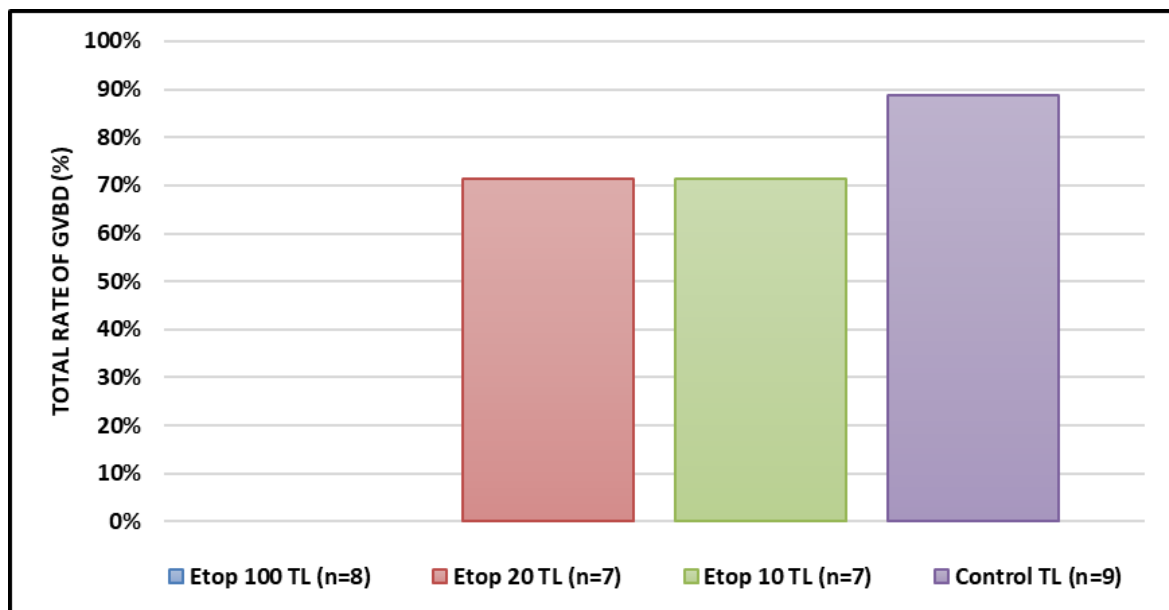
Αρχικά πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με σκοπό να διερευνηθεί η απόκριση των ωοκυττάρων σε διαφορετικά επίπεδα γενotoξικής βλάβης στο DNA τύπου DSBs, με απώτερο σκοπό να εξαχθούν συμπεράσματα αναφορικά με το εάν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (DNA Damage Checkpoints, DDCs) κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης ενεργοποιούνται παρουσία βλάβης και εάν ναι σε τι βαθμό ανάλογα με την έκταση της βλάβης. Πιο αναλυτικά, βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του αν και κατά πόσον ωοκύτταρα GV που υφίσταται βλάβες στο DNA μπορούν να προχωρήσουν σε επόμενα στάδια ωρίμανσης και επιπρόσθετα να διερευνηθεί το εάν και κατά πόσον το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να επιδιορθώνουν τις βλάβες ή εάν ωριμάζουν διατηρώντας τις βλάβες, με απώτερο σκοπό τη μελέτη της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά την μείωση.

Έπειτα από εμπειριστατωμένη ανάλυση της βιβλιογραφίας επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης για να δοκιμαστούν στα πειράματα ελέγχου της ευαισθησίας των DDCs κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι τα 10 µg/ml, 20 µg/ml και 100 µg/ml ετοποσίδης, τα οποία προκαλούν ήπια, μέτρια και έντονη βλάβη στο DNA, αντίστοιχα (Marangos et al., 2015; Marangos and Carroll, 2012; Rémillard-Labrosse et al., 2020). Στο πλαίσιο των πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη μείωση χρησιμοποιήθηκαν ανώριμα GV ωοκύτταρα, τα οποία εκτέθηκαν στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ετοποσίδης για μία ώρα και καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο time-lapse για 24 ώρες προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ετοποσίδης στα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων.

Συνολικά 31 ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο των πειραμάτων αυτών. Οκτώ (8) εξ αυτών επώαστηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 µg/ml (Etop 100 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 20 µg/ml (Etop 20 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 10 µg/ml (Etop 10 TL) και τα υπόλοιπα εννέα (9) δεν επώαστηκαν με ετοποσίδα συνιστώντας την ομάδα ελέγχου (Control TL).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης σε διαφορετικά επίπεδα γενotoξικής βλάβης παρουσιάζονται στην Εικόνα 44. Τα αποτελέσματα έδειξαν

πως η επώαση με ετοποσίδη σε συγκέντρωση 100 mg/ml, η οποία προκαλεί εκτεταμένη γενοτοξική βλάβη, οδηγεί σε πλήρη αναστολή της ωρίμανσης στο 100% των GV ωοκυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση αυτή, καθώς σε κανένα ωοκύτταρο δεν παρατηρήθηκε διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) μετά από την εικοσιτετράωρη καλλιέργεια στο σύστημα time-lapse. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε ζωικά μοντέλα, οι οποίες κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η συγκέντρωση των 100 μg/ml, η οποία προκαλεί εκτεταμένα επίπεδα βλάβης στο DNA, προκαλεί αναστολή της ωρίμανσης των ωοκυττάρων στο στάδιο GV, καθώς ενεργοποιούνται τα DDCs στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (Marangos et al., 2015; Marangos and Carroll, 2012; Rémillard-Labrosse et al., 2020). Κατά αναλογία, τα δεδομένα δείχνουν πως και τα ανθρώπινα ωοκύτταρα σταδίου GV διαθέτουν DDCs, τα οποία παρουσία εκτεταμένης γενοτοξικής βλάβης ενεργοποιούνται, αναστέλλοντας την περαιτέρω ωρίμανση των ωοκυττάρων που έχουν υποστεί τέτοιας έκτασης βλάβης στο DNA.



Εικόνα 44. Αποτελέσματα πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας (titration experiments) των μηχανισμών ελέγχου για βλάβες του DNA στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης.

Σε αντίθεση με τα όσα παρατηρήθηκαν αναφορικά με τα ωοκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 μg/ml, τα ωοκύτταρα τα οποία επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 10 μg/ml και 20 μg/ml παρουσίασαν διάσπαση του

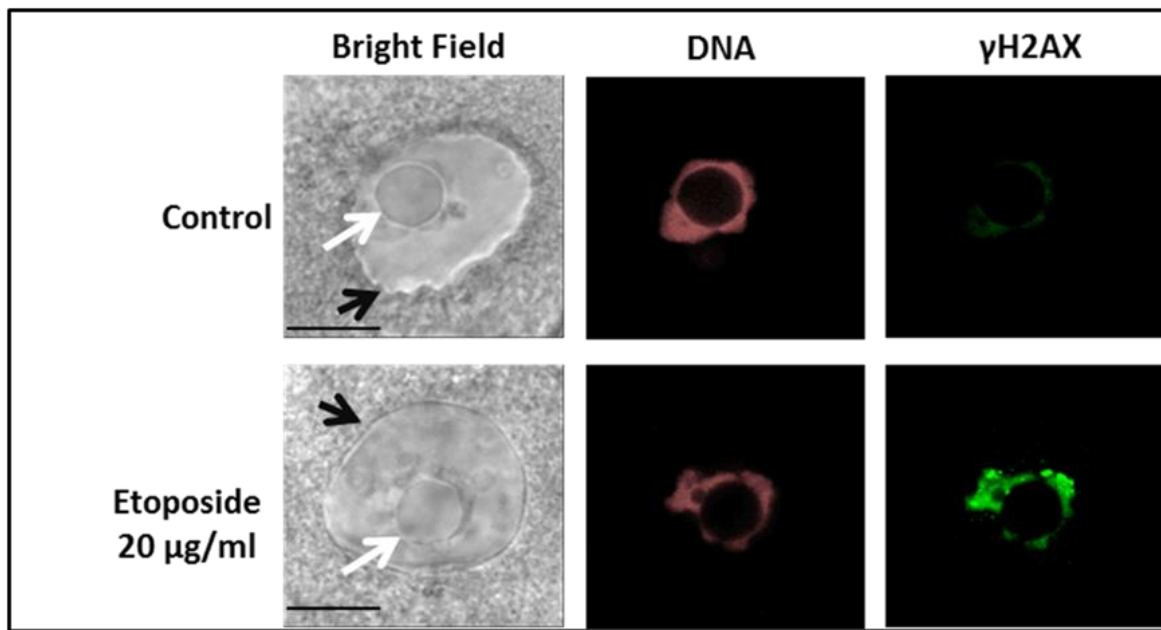
βλαστικού κυστιδίου (GVBD) σε ίδιο ποσοστό της τάξεως του 71.43% (5/7). Το ποσοστό αυτό ήταν παρόμοιο με το αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε για την ομάδα ελέγχου (88.89%) (8/9). Ο πληθυσμός των ωοκυττάρων στις τέσσερις ομάδες ήταν πολύ μικρός και έτσι η πραγματοποίηση στατιστικών δοκιμασιών για την σύγκριση των ομάδων δεν ήταν εφικτή. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά είναι ενδεικτικά για την εξαγωγή κάποιων πολύ χρήσιμων συμπερασμάτων.

Φαίνεται πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα σταδίου GV διαθέτουν μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι και ενεργοποιούνται αναστέλλοντας τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) παρουσία εκτεταμένης βλάβης στο DNA, όπως παρατηρήθηκε για τα ωοκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 µg/ml. Ωστόσο, τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία παρουσία ήπιας ή/και μέτριας βλάβης στο DNA, επιτρέποντας τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και τη συνέχιση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων στο MI στάδιο, ακόμα και παρουσία βλάβης στο DNA, όπως παρατηρήθηκε για τα ωοκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 10 µg/ml και 20 µg/ml.

Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα το παρατηρούμενο φαινόμενο της μειωμένης ευαισθησίας των σημείων ελέγχου κατά τη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης παρουσία ήπιας ή/και μέτριας έκτασης βλάβης στο DNA των ωοκυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μεγαλύτερο αριθμό GV ωοκυττάρων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε καλλιέργεια ανώριμων GV ωοκυττάρων σε κλίβανο time-lapse για 24 ώρες με σκοπό την μελέτη των μορφοκινητικών χαρακτηριστικών των ωοκυττάρων, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους από το στάδιο GV στο στάδιο MI παρουσία ή όχι βλάβης στο DNA.

Στη φάση αυτή αναλύθηκαν δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV επώαστηκαν για μία ώρα σε διάλυμα ετοποσίδης 20 µg/ml και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε κλίβανο time-lapse (Etop TL). Στη δεύτερη ομάδα ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV καλλιεργήθηκαν άμεσα σε κλίβανο time-lapse για 24 ώρες, χωρίς προηγουμένως τα ωοκύτταρα να εκτεθούν σε ετοποσίδη (Control TL). Όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, όλοι οι χειρισμοί και οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν κοινά για τις δύο ομάδες, εξασφαλίζοντας σε μεγάλο βαθμό την εξάλειψη διαφορών συγχυτικών

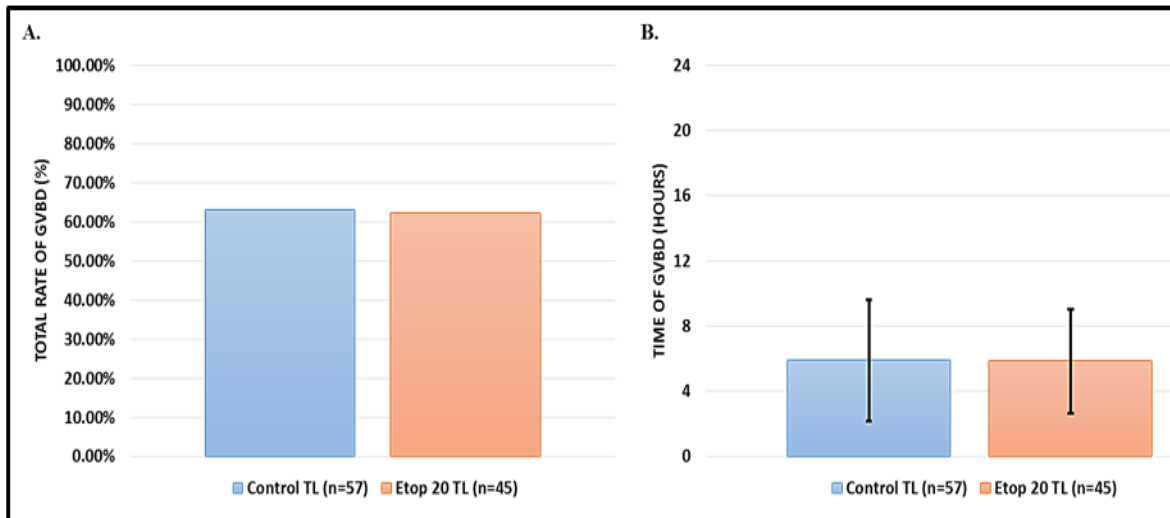
παραγόντων που εν δυνάμει θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μελέτης. Συνολικά, 102 ανώριμα GV ωοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη φάση της μελέτης, 45 στην ομάδα Etop TL και 57 στην ομάδα Control TL, αντίστοιχα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία βλάβης τύπου DSBs στο DNA των ωοκυττάρων που επώαστηκαν για μία ώρα σε συγκέντρωση ετοποσίδης 20 $\mu\text{g/ml}$, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας με σκοπό την ανίχνευση της ιστόνης $\gamma\text{-H2AX}$ στα σημεία της βλάβης (Εικόνα 45).



Εικόνα 45. Η επώαση με 20 $\mu\text{g/ml}$ ετοποσίδης για 1 ώρα προκαλεί δίκλωνες θραύσεις στο DNA των ωοκυττάρων του ανθρώπου. Αυτό γίνεται αντιληπτό με πειράματα ανοσοφθορισμού σε συνεστιακό μικροσκόπιο, καθώς στα σημεία της βλάβης ενεργοποιείται η ιστόνη $\gamma\text{-H2AX}$, η οποία και χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την ανίχνευση DSBs (πράσινη χρωστική). Η χρωστική Draq7 χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση του DNA. Στην εικόνα παρουσιάζονται δύο ώρια GV από την ομάδα Control PF και Etop PF, αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση τα ώρια μονιμοποιήθηκαν άμεσα, ενώ στη δεύτερη περίπτωση τα ώρια μονιμοποιήθηκαν μετά την επώασή τους σε διάλυμα με συγκέντρωση ετοποσίδης 20 $\mu\text{g/ml}$ για 1 ώρα. Ακολούθησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού και παρουσιάζονται οι αντίστοιχες εικόνες μετά από επεξεργασία στο συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal images). Οι μαύρες μπάρες δείχνουν την κλίμακα της ανάλυσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι τα 20 μm . Τα μαύρα βέλη δείχνουν το βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle, GV) και τα άσπρα βέλη δείχνουν τους πυρηνίσκους (nucleolus).

Με τη χρήση της τεχνολογίας time-lapse αξιολογήθηκαν με ακρίβεια σημαντικές παράμετροι που σχετίζονται με την ωρίμανση των ωοκυττάρων και πιο ειδικά αξιολογήθηκαν το ποσοστό των ωοκυττάρων που παρατηρήθηκε διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD rate) και ο χρόνος μέχρι την επίτευξη της διάσπασης. Αναφορικά με την πειραματική ομάδα (Etop TL) διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου επετεύχθη σε 28 από τα 45 ωοκύτταρα της ομάδας (GVBD rate 62.22%), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την

ομάδα ελέγχου (Control TL) ήταν 63.16% (36/57). Η διαφορά αυτή ήταν μη στατιστικώς σημαντική (p -value = 0.543). Αναφορικά με τον χρόνο που απαιτήθηκε για να πραγματοποιηθεί η διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (time of GVBD), ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για την πειραματική ομάδα (Etop TL) ήταν 5.86 ± 3.19 ώρες και για την ομάδα ελέγχου (Control TL) ήταν 5.89 ± 3.71 ώρες. Και σε αυτή την περίπτωση η διαφορά ήταν μη στατιστικώς σημαντική (p -value = 0.792) (Εικόνα 46).



Εικόνα 46. Γραφική απεικόνιση (A) του ποσοστού των GV ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε GVBD και (B) του αντίστοιχου χρόνου που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί το GVBD. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του GVBD rate μεταξύ των ομάδων ήταν το Fisher's exact test. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του χρόνου επίτευξης GVBD μεταξύ των δύο ομάδων ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι η επώαση με ετοποσίδη σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$, η οποία σχετίζεται με μέτρια επίπεδα βλάβης στο DNA, δεν επηρεάζει το ποσοστό των GV ωοκυττάρων που μεταβαίνουν στο στάδιο MI, καθώς δεν αναχαιτίζεται η διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), αλλά ούτε και επηρεάζεται ο αντίστοιχος χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η διάσπαση και άρα η μετάβαση από το στάδιο GV στο στάδιο MI. Αναλύοντας από κοινού όλα τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να εξάγουμε σημαντικά συμπεράσματα αναφορικά με τους μηχανισμούς λειτουργίας και την ευαισθησία των σημείων ελέγχου βλαβών στον DNA κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης στα ανθρώπινα ωοκύτταρα.

Αρχικά, τα ανθρώπινα ωκύτταρα διαθέτουν σημεία ελέγχου για την ανίχνευση βλαβών στο DNA στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Τα σημεία ελέγχου είναι ευαίσθητα και ενεργοποιούνται προκαλώντας αναστολή της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και ανασχεση της περαιτέρω ωρίμανσης των ωκυττάρων από το στάδιο GV στο στάδιο MI, όταν η βλάβη είναι εκτεταμένη, όπως συνέβη στα GV ωκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρωση ετοποσίδης 100 μg/ml. Σε αντίθεση με τις εκτεταμένες βλάβες, τα σημεία ελέγχου για την ανίχνευση βλαβών στο DNA στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης δεν παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία για ήπιας ή/και μέτριας έκτασης βλάβες στο DNA, με αποτέλεσμα ανθρώπινα ωκύτταρα που φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA να υφίσταται διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και να μεταβαίνουν επιτυχώς από το στάδιο GV στο στάδιο MI, έχοντας βλάβες στο DNA τους, όπως παρατηρήθηκε για τα GV ωκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 10 μg/ml και 20 μg/ml. Μάλιστα, τα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά κατά την ωρίμανση των GV ωκυττάρων που φέρουν μέτριου βαθμού βλάβες στο DNA δεν διαφέρουν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται για ωκύτταρα που δεν παρουσιάζουν βλάβες στο DNA, κάτι που ενδυναμώνει ακόμα περισσότερο την υπόθεση πως τα ανθρώπινα GV ωκύτταρα διαθέτουν σημεία ελέγχου χαμηλής ευαισθησίας κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης.

Συνοψίζοντας, οι μηχανισμοί ελέγχου βλαβών στο DNA στη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης ανθρώπινων GV ωκυττάρων δεν είναι ευαίσθητοι σε χαμηλά και μέτρια επίπεδα γενοτοξικής βλάβης και ενεργοποιούνται προκαλώντας αναστολή της περαιτέρω ωρίμανσης μόνο σε πολύ εκτενή βλάβη του DNA. Τα συμπεράσματα αυτά είναι στην ίδια γραμμή με τα συμπεράσματα προηγούμενων μελετών σε πειραματόζωα, τα οποία συνηγορούν πως GV ωκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA μπορούν επιτυχώς να μεταβούν στο στάδιο MI, κάτι που παρουσιάζει εξαιρετικά σημαντικό κλινικό ενδιαφέρον αναφορικά με την ακεραιότητα του γονιδιώματος ωκυττάρων που επιτυχώς μπορούν να ωριμάζουν *in vitro* (Marangos et al., 2015; Marangos and Carroll, 2012; Rémillard-Labrosse et al., 2020).

3.3 Μηχανισμός Ελέγχου Φάσης ΜΙ

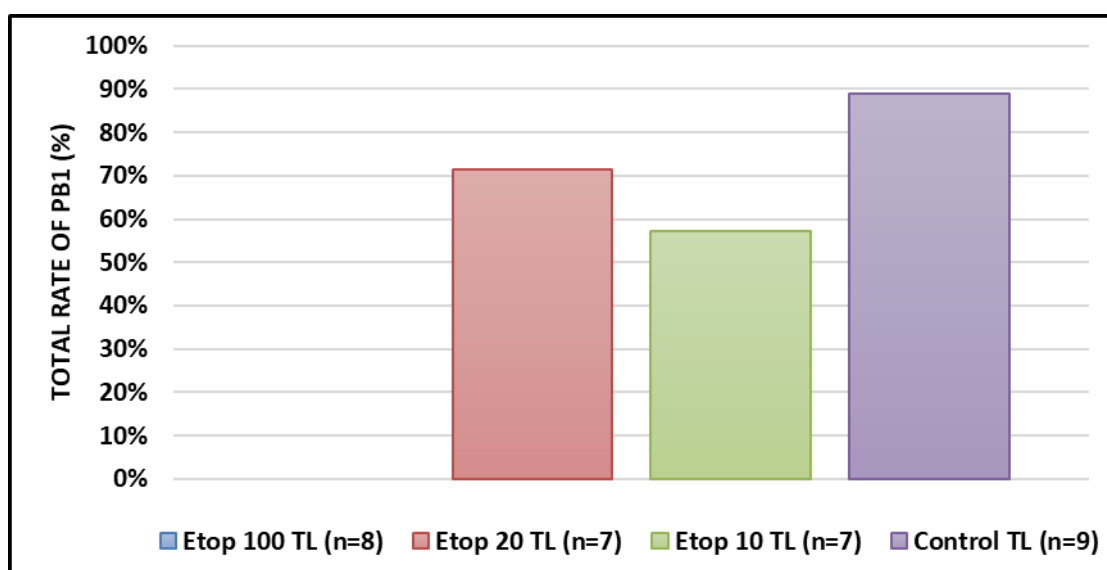
Σε συνέχεια της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2, αναφορικά με την ευαισθησία των σημείων ελέγχου βλαβών στο DNA στη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της ευαισθησίας των αντίστοιχων σημείων ελέγχου που εποπτεύουν την επιτυχή ολοκλήρωση της φάσης ΜΙ, η έναρξη της οποίας σηματοδοτείται από τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), ενώ η λήξη της από το σχηματισμό και την αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), η οποία και σηματοδοτεί τη μετάβαση από το στάδιο ΜΙ στο στάδιο ΜΙΙ.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μορφοκινητικών δεδομένων κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων από το στάδιο ΜΙ στο στάδιο ΜΙΙ στο πλαίσιο των πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη μείωση, όπως αυτά περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 3.2. Υπενθυμίζεται πως συνολικά 31 ανώριμα ωοκύτταρα σταδίου GV χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο των πειραμάτων αυτών. Οκτώ (8) εξ αυτών επώαστηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 μg/ml (Etop 100 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 20 μg/ml (Etop 20 TL), επτά (7) σε συγκέντρωση ετοποσίδης 10 μg/ml (Etop 10 TL) και τα υπόλοιπα εννέα (9) δεν επώαστηκαν με ετοποσίδη και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (Control TL). Η επώαση σε ετοποσίδη πραγματοποιήθηκε για μία ώρα αναφορικά και με τις τρεις ομάδες μελέτης.

Η ανάλυση των μορφοκινητικών δεδομένων στη φάση αυτή, η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 47, κατέδειξε πως σε κανένα ωοκύτταρο της ομάδας ωοκυττάρων που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 μg/ml (Etop 100 TL) δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου, κάτι που ήταν δεδομένο, καθώς τα σημεία ελέγχου της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης είχαν αναστείλει την ωρίμανση στο στάδιο GV και ως εκ τούτου κανένα εκ των ωοκυττάρων της ομάδας αυτής δεν είχε εισέλθει στο στάδιο ΜΙ.

Αναφορικά με τα ωοκύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 10 μg/ml και 20 μg/ml παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου σε ποσοστό 57.14% (4/7) και 71.43% (5/7), αντίστοιχα. Το ποσοστό σχηματισμού και αποβολής του 1^{ου} πολικού σωματίου για τα ωοκύτταρα της ομάδας ελέγχου ήταν 88.89% (8/9). Αναλύοντας περαιτέρω τα δεδομένα αυτά σε σύγκριση με τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο υποκεφάλαιο 3.2 φαίνεται πως μόνο ένα εκ των πέντε ωοκυττάρων της ομάδας που εκτέθηκαν σε 10 μg/ml ετοποσίδης και κατάφεραν να

επιτύχουν διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (GVBD) δεν κατάφερε να μεταβεί επιτυχώς από το στάδιο MI στο στάδιο MII, ενώ και τα πέντε ωοκύτταρα της ομάδας που εκτέθηκαν σε 20 µg/ml ετοποσίδης και κατάφεραν να επιτύχουν διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (GVBD) κατάφεραν επιτυχώς να σχηματίσουν και να αποβάλουν το 1^ο πολικό σωματίο και να μεταβούν από το στάδιο MI στο στάδιο MII. Παρόμοια εικόνα παρουσίασαν και τα ωοκύτταρα της ομάδας ελέγχου, όπου από το σύνολο των εννέα ωοκυττάρων της ομάδας, οκτώ κατάφεραν να επιτύχουν διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (GVBD), όπου και στα οκτώ παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου και ως εκ τούτου επιτυχημένη μετάβαση από το στάδιο MI στο στάδιο MII (Εικόνα 47).



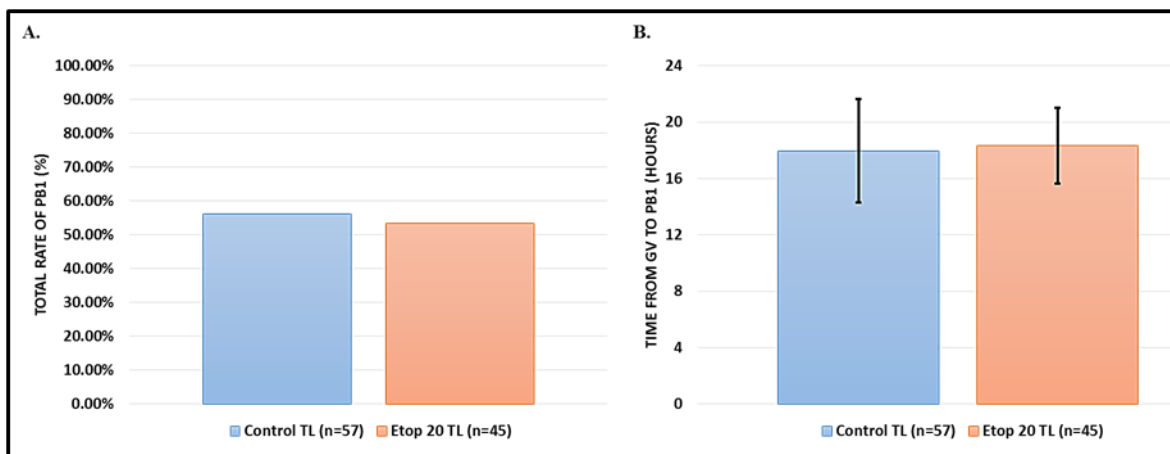
Εικόνα 47. Αποτελέσματα πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας (titration experiments) των μηχανισμών ελέγχου για βλάβες του DNA στη μετάφαση I της πρώτης μειωτικής διαίρεσης.

Ερμηνεύοντας τα παραπάνω μπορούν να εξαχθούν κάποια πολύ σημαντικά αρχικά συμπεράσματα αναφορικά με την ρύθμιση και την ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου βλαβών στο DNA των ανθρώπινων ωοκυττάρων κατά την MI φάση. Τα συμπεράσματα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός μοντέλου χαμηλής ευαισθησίας των σημείων ελέγχου κατά την MI φάση σε χαμηλά και μέτρια επίπεδα γενετοξικής βλάβης, όπως ακριβώς περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.2 αναφορικά με τα σημεία ελέγχου κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Μάλιστα, τα συμπεράσματα αυτά υποστηρίζονται και από τα συμπεράσματα προηγούμενων μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα (Pailas et al., 2022).

Σε δεύτερη φάση και με σκοπό την επιβεβαίωση των παρατηρήσεων αυτών σε μεγαλύτερης κλίμακας πειράματα, τα οποία θα επέτρεπαν την διεξαγωγή στατιστικών

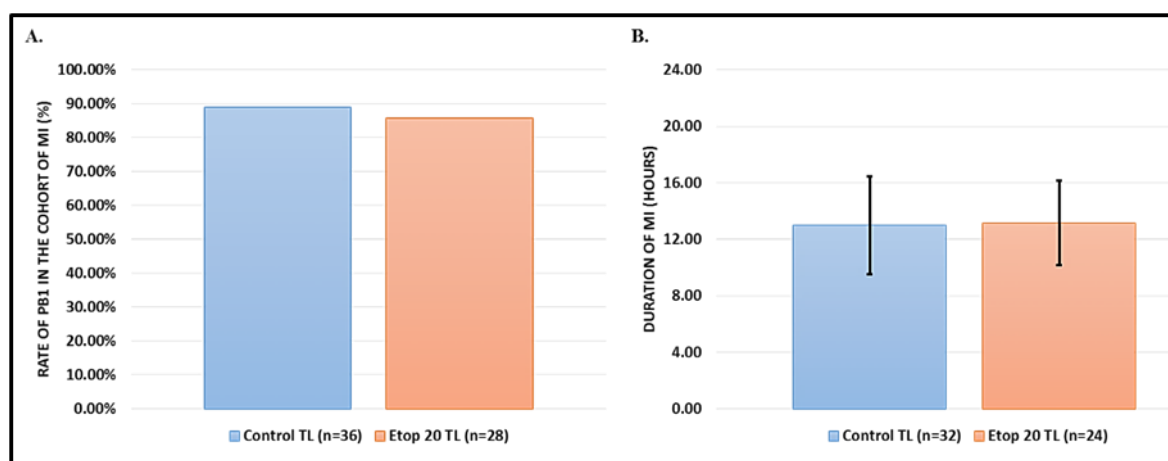
δοκιμασιών για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μορφοκινητικών χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση 45 ωοκυττάρων που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε 20 $\mu\text{g/ml}$ ετοποσίδης, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.2. Πιο αναλυτικά, συνολικά, 102 ανώριμα GV ωοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη φάση της μελέτης, 45 στην πειραματική ομάδα όπου τα ωοκύτταρα είχαν εκτεθεί σε ετοποσίδα (Etop TL) και 57 στην ομάδα ελέγχου (Control TL), αντίστοιχα.

Με τη χρήση της τεχνολογίας time-lapse αξιολογήθηκαν με ακρίβεια σημαντικές παράμετροι που σχετίζονται με την ωρίμανση των ωοκυττάρων κατά την ΜΙ φάση και πιο ειδικά αξιολογήθηκαν το ποσοστό των ωοκυττάρων που παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion rate) και ο αντίστοιχος χρόνος που απαιτήθηκε για την παρατήρηση αυτή. Αναφορικά με την πειραματική ομάδα, σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) παρατηρήθηκε στο 53.33% (24/45) επί των αρχικών GV ωοκυττάρων που εκτέθηκαν σε ετοποσίδα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα ελέγχου ήταν 56.14% (32/57). Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p\text{-value} = 0.467$). Ο μέσος χρόνος που απαιτήθηκε για το σχηματισμό και την αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) για τις ομάδες Etop TL και Control TL ήταν 18.32 ± 2.70 ώρες και 17.96 ± 3.66 ώρες, αντίστοιχα. Και αυτή η διαφορά δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ($p\text{-value} = 0.914$). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 48.



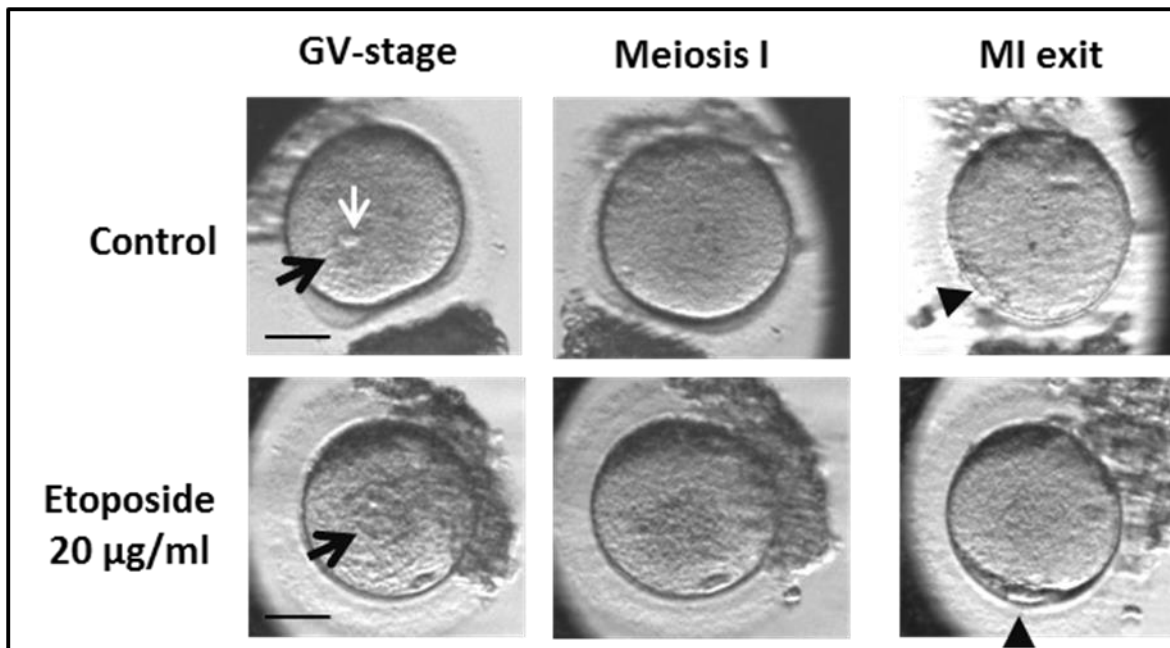
Εικόνα 48. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των GV ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε PB1 extrusion (A) και του αντίστοιχου χρόνου που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί το PB1 extrusion (B). Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων για κανένα από τα δύο παραπάνω μετρήσιμα αποτελέσματα. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για τη σύγκριση του PB1 extrusion rate μεταξύ των ομάδων ήταν το Fisher's exact test. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για τη σύγκριση του χρόνου επίτευξης PB1 extrusion μεταξύ των δύο ομάδων ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$).

Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκαν δύο ακόμα σημαντικοί παράμετροι που αφορούν τα μορφοκινητικά δεδομένα στο πλαίσιο της *in vitro* ωρίμανσης των ωοκυττάρων κατά την ΜΙ φάση, οι οποίοι είναι το ποσοστό των ΜΙ ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) και ο χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και του σχηματισμού και της αποβολής του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion). Πρακτικά οι παράμετροι αυτοί εκφράζουν το ποσοστό των ωοκυττάρων τα οποία με επιτυχία ολοκλήρωσαν τη μετάβαση από την 1^η στη 2^η μειωτική διαίρεση και την συνολική διάρκεια της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (MI duration), αντίστοιχα. Στην πειραματική ομάδα (Etop TL) από τα συνολικά 28 ΜΙ ωοκύτταρα, σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) παρατηρήθηκε στα 24 (85.71%), ενώ μόλις τέσσερα (4) ΜΙ ωοκύτταρα (14.29%) δεν κατάφεραν να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ΜΙ φάση. Η μέση συνολική διάρκεια της ΜΙ για την πειραματική ομάδα (Etop TL) ήταν 13.14 ± 3.00 ώρες. Ανάλογα δεδομένα παρατηρήθηκαν και στην ομάδα ελέγχου (Control TL). Από τα συνολικά 36 ΜΙ ωοκύτταρα της ομάδας, σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) παρατηρήθηκε στα 32 (88.89%), ενώ μόλις τέσσερα (4) εκ των 36 (11.11%) δεν κατάφεραν επιτυχώς να ολοκληρώσουν την ΜΙ. Η αντίστοιχη μέση συνολική διάρκεια της ΜΙ φάσης για την ομάδα ελέγχου (Control TL) ήταν 13.00 ± 3.47 ώρες. Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε καμία διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και για τις δύο παραμέτρους (*p-value* = 0.495 και *p-value* = 0.772, αντίστοιχα). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 49.



Εικόνα 49. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ΜΙ ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε PB1 extrusion (A) και του αντίστοιχου χρόνου που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί το PB1 extrusion από το GVBD (διάρκεια ΜΙ) (B). Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων για κανένα από τα δύο παραπάνω μετρήσιμα αποτελέσματα. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του ποσοστού των ΜΙ ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε PB1 extrusion μεταξύ των ομάδων ήταν το Fisher's exact test. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση της συνολικής διάρκειας της ΜΙ φάσης μεταξύ των δύο ομάδων ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (*p-value* < 0.05).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται πως GV ανθρώπινα ωοκύτταρα τα οποία φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA μπορούν επιτυχώς να ολοκληρώσουν την 1^η μειωτική διαίρεση και να μεταβούν από την φάση MI στην φάση MII, καθώς τα σημεία ελέγχου της φάσης M παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία. Η επώαση GV ωοκυττάρων με ετοποσιδίδη σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$, η οποία έχει ως έμμεσο αποτέλεσμα την πρόκληση DSBs στο DNA, δεν επηρεάζει σημαντικά τις παραμέτρους που σχετίζονται με την ικανότητα ωρίμανσης των ωοκυττάρων, δεδομένου πως δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου τόσο όσον αφορά το ποσοστό των ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 rate), όσο και αναφορικά με τους αντίστοιχους χρόνους μετάβασης από το στάδιο MI στο στάδιο MII (Εικόνα 50). Εμβαθύνοντας στην μοριακή ερμηνεία του φαινομένου, φαίνεται πως τα δεδομένα προηγούμενων μελετών, που δείχνουν μειωμένη ευαισθησία της επαγόμενης από τη βλάβη στο DNA ενεργοποίησης του σημείου ελέγχου της ακεραιότητας της ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) στα ωοκύτταρα του ποντικού, επιβεβαιώνονται και στην παρούσα μελέτη στα ανθρώπινα ωοκύτταρα (Collins and Jones, 2016; Greaney et al., 2018; Marangos et al., 2015; Marangos and Carroll, 2012; Musacchio, 2015).



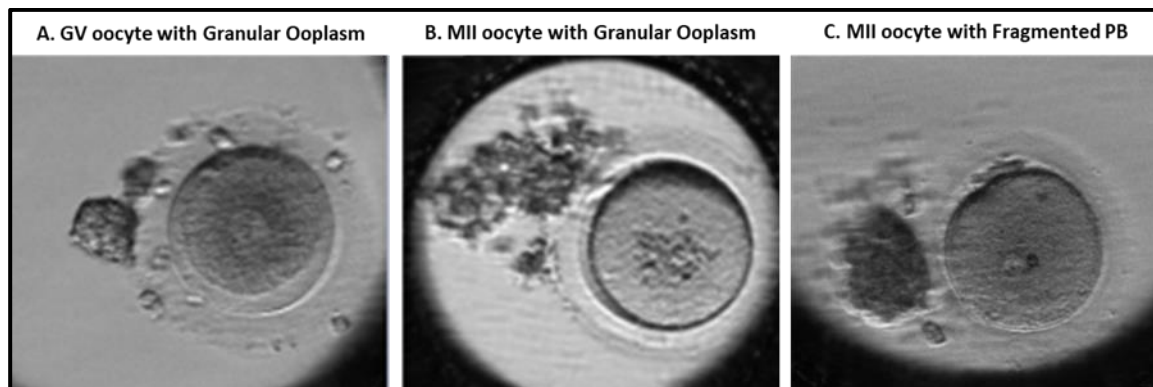
Εικόνα 50. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ενός ωαρίου από την ομάδα ελέγχου (Control TL) και ενός ωαρίου από την ομάδα της ετοποσιδίνης (Etop TL), στο στάδιο πριν την ωρίμανσή τους (GV-stage), κατά τη διάρκεια της μείωσης I (μετά το GVBD) και μετά την έξοδο από την μείωση I και την είσοδο στην μείωση II (μετά το PB1 extrusion). Οι εικόνες προέρχονται από το σύστημα time-lapse. Οι μαύρες μπάρες δείχνουν την κλίμακα της ανάλυσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι τα 50 μm . Τα μαύρα βέλη δείχνουν το βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle, GV), τα άσπρα βέλη δείχνουν τους πυρηνίσκους (nucleolus) και η κεφαλή του μαύρου βέλους το 1^ο πολικό σωματίο (PB1).

3.4 Αντίκτυπος της Βλάβης του DNA στη Μορφολογία των Ωοκυττάρων

Μετά την ανάλυση της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και κατά την ΜΙ φάση πραγματοποιήθηκε ενδελεχής αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ωοκυττάρων με σκοπό την εύρεση πιθανών διαφορών μεταξύ αυτών που εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και άρα έφεραν DSBs στο DNA και των αντίστοιχων της ομάδας ελέγχου. Η ανάλυση αυτή έχει βαρύνουσα σημασία, δεδομένου πως τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν σήμερα το βασικό “εργαλείο” των κλινικών εμβρυολόγων για την αξιολόγηση της ποιότητας και του δυναμικού ανάπτυξης των ωοκυττάρων. Ως εκ τούτου η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ωοκυττάρων και της ύπαρξης DSBs στο DNA παρουσιάζει βαρύνουσα ερευνητική, αλλά και κλινική σημασία.

Για τους σκοπούς της ανάλυσης αξιολογήθηκαν στιγμιότυπα time-lapse καθ’ όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων από το στάδιο GV έως και το στάδιο ΜΙΙ, για όλα τα ωοκύτταρα και των δύο ομάδων και ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης μέχρι το οποίο έφτασαν. Τα μορφολογικά κριτήρια που αξιολογήθηκαν είναι αυτά που περιγράφονται στον “Ατλαντα Εμβρυολογίας του Ανθρώπου: από τα Ωάρια στο Προεμφυτευτικό Έμβρυο” (Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos), ο οποίος αποτελεί το βασικό εγχειρίδιο για την ανάλυση της ποιότητας των γαμετών και των εμβρύων μέσω μορφολογικών κριτηρίων και είναι δημοσιευμένος στην επίσημη ιστοσελίδα της European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Σε αυτά περιλαμβάνονται το μέγεθος των ωοκυττάρων και κυρίως διάφορα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά χαρακτηριστικά των ωοκυττάρων, όπως είναι η υφή και το χρώμα του κυτταροπλάσματος, η ύπαρξη ενδοκυτταρικών κυστιδίων (vacuoles), το μέγεθος, το σχήμα και η αρχιτεκτονική των πολικών σωματίων και τα χαρακτηριστικά της διαφανούς ζώνης. Σε αντίθεση με την ανάλυση των παραμέτρων που σχετίζονται με το ποσοστό ωρίμανσης των ωοκυττάρων και τους χρόνους μετάβασης από το ένα στάδιο ωρίμανσης στο επόμενο, η οποία δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές, η ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ωοκυττάρων έδειξε σημαντικές διαφορές. Αρχικά αξίζει να σημειωθεί πως και στις δύο ομάδες βρέθηκαν ωοκύτταρα με μη φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, τόσο μεταξύ αυτών που ολοκλήρωσαν επιτυχώς την ωρίμανσή τους από το στάδιο GV έως και το στάδιο ΜΙΙ, όσο και μεταξύ αυτών που η ωρίμανση διακόπηκε είτε στο στάδιο GV, είτε στο στάδιο ΜΙ. Μεταξύ των μη

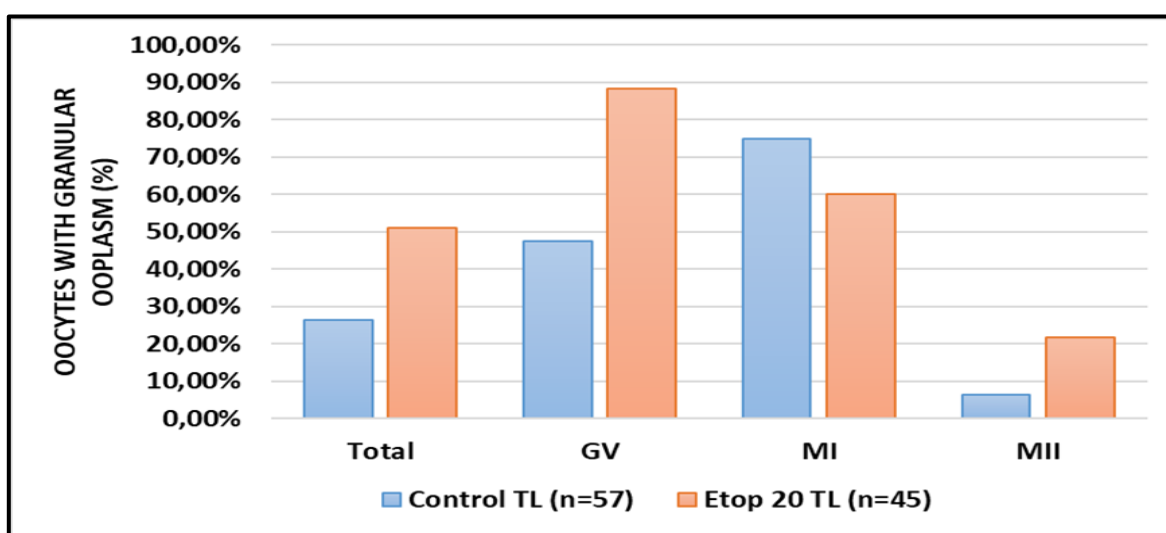
φυσιολογικών μορφολογικών παραμέτρων και στις δύο ομάδες κυριάρχησαν το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (granular cytoplasm) και το θραυσμένο 1^ο πολικό σωματίο (fragmented 1st polar body) (Εικόνα 51), ενώ δεν παρατηρήθηκαν μη φυσιολογικά μορφολογικά πρότυπα αναφορικά με το μέγεθος και το σχήμα των ωοκυττάρων, την ύπαρξη ενδοκυτταρικών κυστιδίων (vacuoles), το μέγεθος και το σχήμα των πολικών σωματίων και την αρχιτεκτονική της διαφανούς ζώνης.



Εικόνα 51. Χαρακτηριστικά παραδείγματα GV ωοκυττάρων και MII ωαρίων με τις μορφολογικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν. Α. GV ωοκύτταρο με κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (granular ooplasm), Β. MII ωάριο με κοκκιώδες κυτταρόπλασμα και ώρα 11 διαγράφεται το 1^ο πολικό σωματίο και Γ. MII ωάριο με θραυσμένο 1^ο πολικό σωματίο (fragmented 1st polar body), το οποίο διαγράφεται ώρα 12.

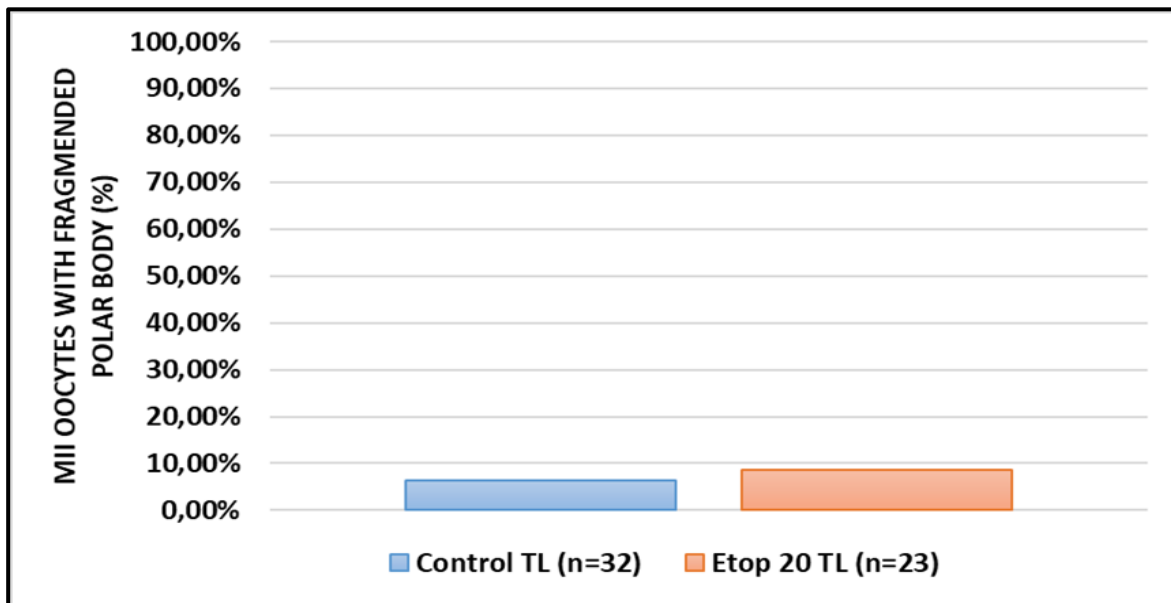
Αναφορικά με το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (granular ooplasm), το μη φυσιολογικό αυτό μορφολογικό χαρακτηριστικό εντοπίστηκε σε 23 από τα 45 (51.11%) ωοκύτταρα της πειραματικής ομάδας που εκτέθηκαν σε 20 $\mu\text{g/ml}$ ετοποσίδης (Etop TL), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα ελέγχου (Control TL) ήταν 26.32% (15/57), με τη διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική ($p\text{-value} < 0.01$). Το υψηλότερο ποσοστό ωοκυττάρων με κοκκιώδες κυτταρόπλασμα και στις δύο ομάδες καταγράφηκε στα ωοκύτταρα που παρέμειναν στο στάδιο GV μετά την καλλιέργεια, με το ποσοστό στην πειραματική ομάδα να είναι στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε στην ομάδα ελέγχου (Etop TL 88.24% και Control TL 47.62%, $p\text{-value} < 0.01$). Αναφορικά με τα ωοκύτταρα που ολοκλήρωσαν επιτυχώς την ανάπτυξή τους έως το στάδιο MII και στις δύο ομάδες το ποσοστό εμφάνισης κοκκιώδους κυτταροπλάσματος καταγράφηκε να είναι μειωμένο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε για τα ωοκύτταρα που παρέμειναν στο στάδιο GV, με το ποσοστό στην πειραματική ομάδα να παραμένει στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με την

ομάδα ελέγχου (Etop TL 21.74% και Control TL 6.25%, p -value < 0.01). Τέλος, αναφορικά με τα ωοκύτταρα που παρέμειναν στο στάδιο MI, δηλαδή σε αυτά που παρατηρήθηκε διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), αλλά όχι σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PBI extrusion), το ποσοστό εμφάνισης κοκκιώδους κυτταροπλάσματος για την πειραματική ομάδα ήταν 60% (3/5), ενώ για την ομάδα ελέγχου 75% (3/4). Ωστόσο, λόγω του πολύ μικρού αριθμού MI ωοκυττάρων και στις δύο ομάδες η στατιστική σύγκριση δεν κατέστη δυνατή και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με τα MI ωοκύτταρα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 52.



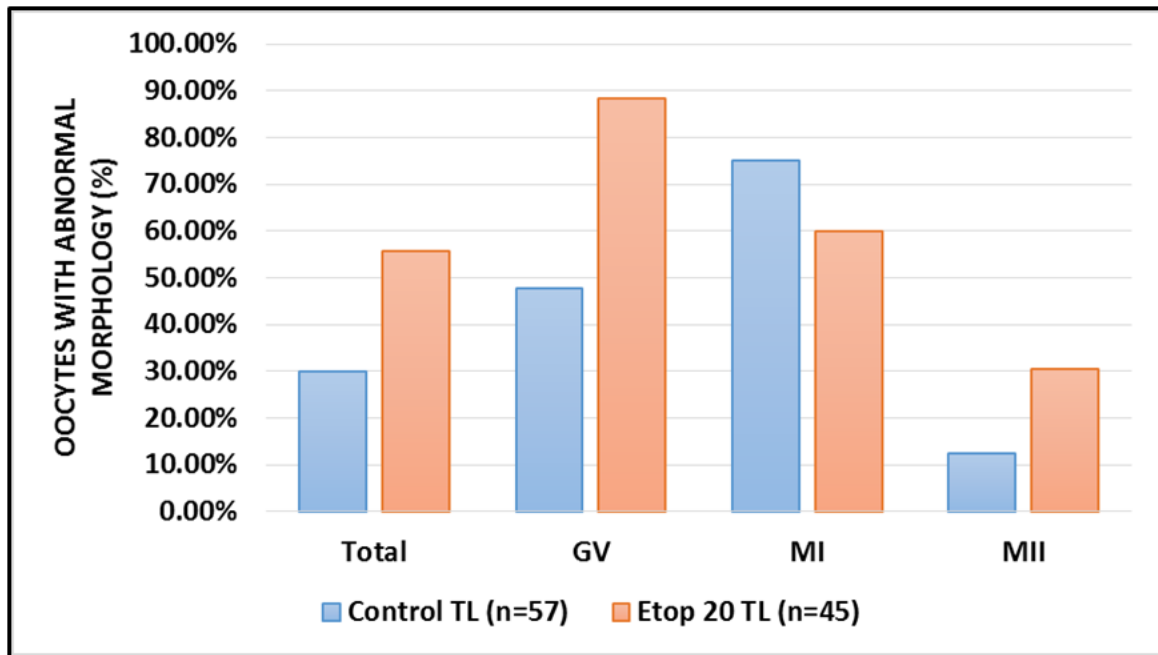
Εικόνα 52. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ωοκυττάρων που είχαν κοκκιώδες κυτταρόπλασμα ανά ομάδα μελέτης και ανά στάδιο ωρίμανσης. Η αξιολόγηση της μορφολογίας πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* ωρίμανσης και αναλύοντας διεξοδικά τα time-lapse δεδομένα από την έναρξη έως και την λήξη της εικοσιτετράωρης καλλιέργειας των ωαρίων. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

Αναφορικά με το θραυσμένο 1^ο πολικό σωματίο (fragmented 1st polar body), τα ευρήματα της ανάλυσης κατέδειξαν πως το ποσοστό εμφάνισής του δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, θραυσμένο πολικό σωματίο παρατηρήθηκε σε δύο από τα 23 MII ώρια της πειραματικής ομάδας (2/23, 8.70%) και αντίστοιχα σε 2 από τα 32 MII ώρια της ομάδας ελέγχου (2/32, 6.25%). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 53.



Εικόνα 53. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ΜΠ ωαρίων με θραυσμένο 1^ο πολικό σωματίο ανά ομάδα μελέτης. Η αξιολόγηση της μορφολογίας πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* ωρίμανσης και αναλύοντας διεξοδικά τα time-lapse δεδομένα από την έναρξη έως και την λήξη της εικοσιτετράωρης καλλιέργειας των ωαρίων. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (*p-value* < 0.05).

Αναλύοντας συνολικά τα παραπάνω δεδομένα αναφορικά με όλα τα μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν (κοκκιώδες κυτταρόπλασμα και θραυσμένο 1^ο πολικό σωματίο), στην πειραματική ομάδα (Etop TL) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ωοκυττάρων που είχαν μη φυσιολογική μορφολογία (55.56%, 25/45) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control TL) (29.82%, 17/57) (*p-value* = 0.015). Και στις δύο ομάδες τα υψηλότερα ποσοστά μορφολογικά μη φυσιολογικών ωοκυττάρων παρατηρήθηκαν στα ωκύτταρα τα οποία παρέμειναν στο στάδιο GV, όπου για την πειραματική ομάδα (Etop TL) το ποσοστό ήταν 88.24% (15/17) και για την ομάδα ελέγχου (Control TL) το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 47,62% (10/21). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ακόμα και το ποσοστό των ΜΠ ωαρίων που είχαν μη φυσιολογική μορφολογία ήταν πολύ υψηλό για την πειραματική ομάδα (Etop TL) (30.43%, 7/23), σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό που καταγράφηκε στην ομάδα ελέγχου (Control TL) (12.50%, 4/32). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως τα ωκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA τύπου DSBs είναι πιο πιθανό να παρουσιάζουν μη φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ακόμα και εάν επιτύχουν ωρίμανση έως το στάδιο ΜΠ. Τα δεδομένα της ανάλυσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 54.



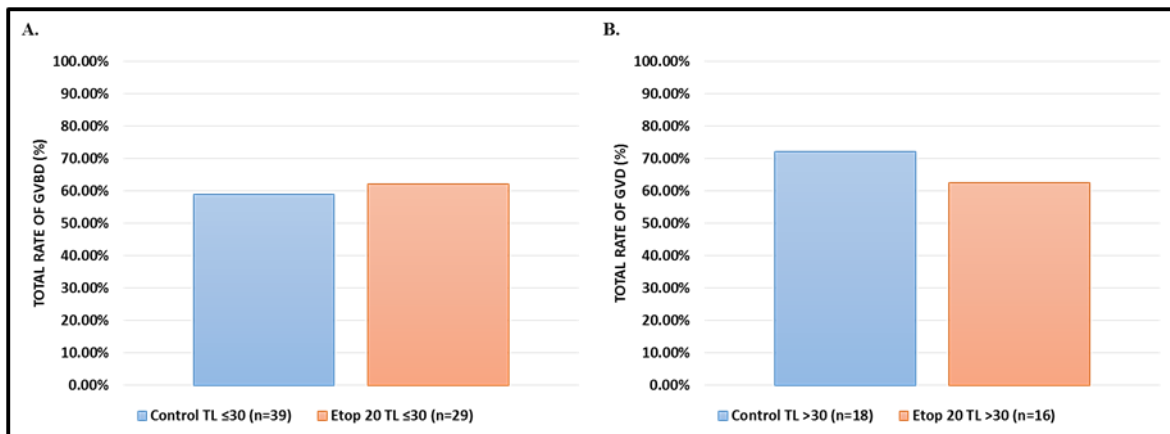
Εικόνα 54. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ωοκυττάρων που είχαν μη φυσιολογική μορφολογία ανά ομάδα μελέτης και ανά στάδιο ωρίμανσης. Η αξιολόγηση της μορφολογίας πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* ωρίμανσης και αναλύοντας διεξοδικά τα time-lapse videos από την έναρξη έως και την λήξη της εικοσιτετράωρης καλλιέργειας των ωαρίων. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

3.5 Διερεύνηση της Επίδρασης της Ηλικίας στην Ευαισθησία των Μηχανισμών Ελέγχου Βλάβης στο DNA κατά τη Μείωση Ανθρώπινων Ωοκυττάρων

Αναγνωρίζοντας την επίδραση της ηλικίας στην ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, ακολούθησε ανάλυση υποομάδων (subgroup analysis) προκειμένου να αξιολογηθεί το εάν και κατά πόσον τα δεδομένα της μορφοκινητικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων, έπειτα από επώαση με ετοποσίδη, μπορούν να διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία των δοτριών (Hamatani et al., 2004; Marangos et al., 2015). Για τον σκοπό αυτό ο αρχικός πληθυσμός διαχωρίστηκε σε δύο υποομάδες, έχοντας ως σημείο αναφοράς την ηλικία των 30 ετών. Είναι γνωστό πως η κορύφωση του αναπαραγωγικού δυναμικού της γυναίκας παρατηρείται στην 3^η δεκαετία της ζωής της, ενώ από τα 30 έτη και έπειτα, τόσο το απόθεμα, όσο και η ποιότητα των ωαρίων εκπίπτουν σταδιακά. Έτσι, η πρώτη υποομάδα περιλάμβανε GV ωοκύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν από δότριες ηλικίας έως και 30 ετών (n=19), ενώ η δεύτερη υποομάδα από δότριες ηλικίας μεγαλύτερης των 30 ετών (n=11). Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των μορφοκινητικών δεδομένων τόσο μεταξύ των δύο ηλικιακών υποομάδων, όσο και μεταξύ των πειραματικών

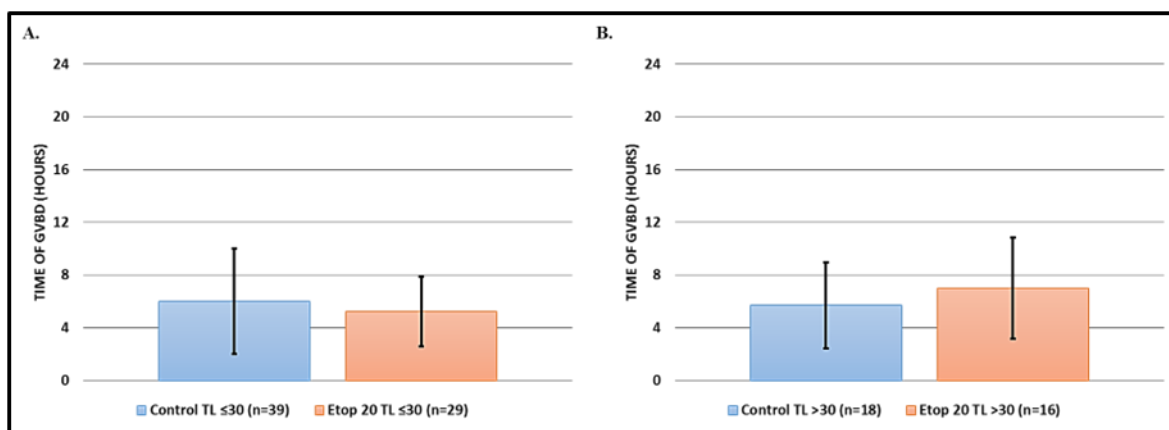
ομάδων (Control TL και Etop TL) μέσα στην κάθε ηλικιακή υποομάδα. Πιο αναλυτικά, η ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών απαρτίστηκε συνολικά από 68 GV ωκύτταρα, εκ των οποίων 29 συμπεριλήφθηκαν στην πειραματική ομάδα Etop TL και 39 συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα ελέγχου (Control TL). Αντίστοιχα, η ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών απαρτίστηκε συνολικά από 34 GV ωκύτταρα, εκ των οποίων 16 συμπεριλήφθηκαν στην πειραματική ομάδα Etop TL και 18 συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα ελέγχου (Control TL).

Αρχικά αξιολογήθηκε το ποσοστό των GV ωκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε GVBD. Αναφορικά με την υποομάδα ≤ 30 ετών, GVBD παρατηρήθηκε σε 18 από τα 29 ωκύτταρα της ομάδας Etop 20 TL (62.97%) και σε 23 από τα 39 ωκύτταρα της ομάδας ελέγχου (58.97%), αντίστοιχα. Αναφορικά με την υποομάδα > 30 ετών, GVBD παρατηρήθηκε σε 10 από τα 16 ωκύτταρα της ομάδας Etop 20 TL (62.50%) και σε 13 από τα 18 ωκύτταρα της ομάδας ελέγχου (72.22%), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν κατέδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων τόσο στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών (Etop TL (Εικόνα 55 A), όσο και στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών (Εικόνα 55 B) (p -value = 0.498 και p -value = 0.406, αντίστοιχα).



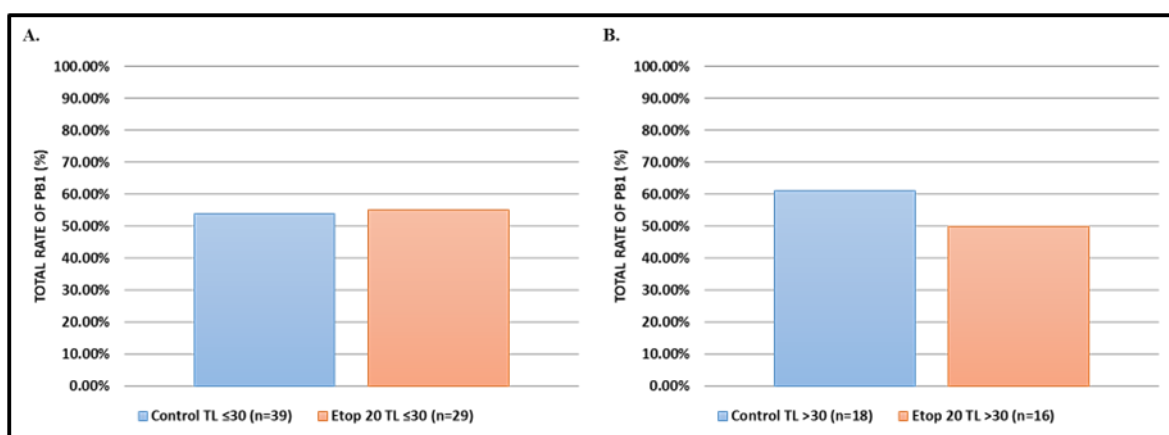
Εικόνα 55. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των GV ωκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε GVBD, (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του GVBD rate ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

Αναφορικά με τον χρόνο επίτευξης του GVBD, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων τόσο στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών (Etop 20 TL 5.23 ± 2.65 ώρες vs Control TL 5.99 vs 4.01 ώρες, p -value = 0.665) (Εικόνα 56 A), όσο και στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών (Etop TL 6.99 ± 3.86 ώρες vs Control TL 5.71 ± 3.27 ώρες, p -value = 0.208) (Εικόνα 56 B).



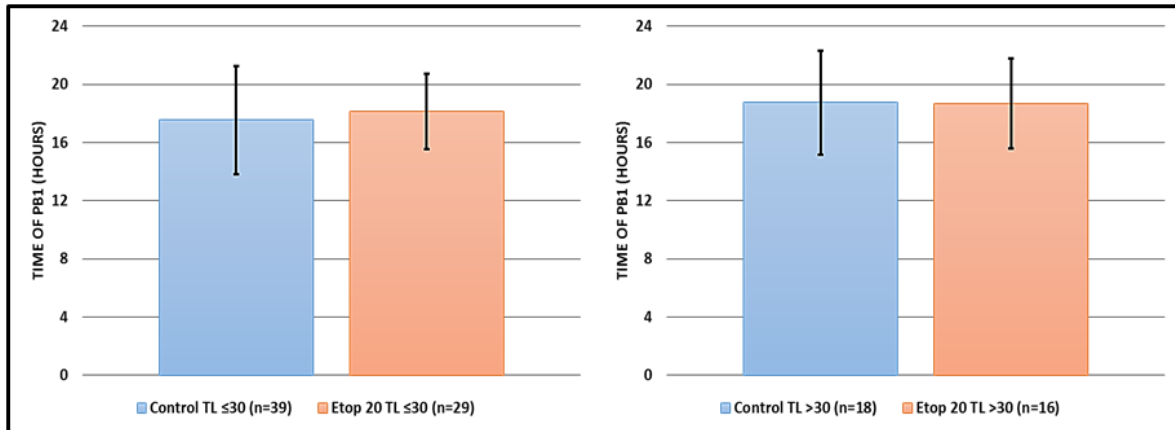
Εικόνα 56. Γραφική απεικόνιση του χρόνου που απαιτήθηκε για να πραγματοποιηθεί το GVBD, (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα >30 ετών. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του χρόνου επίτευξης GVBD ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

Αναφορικά με ποσοστό των GV ωοκυττάρων που ολοκλήρωσαν επιτυχώς την ΜΙ φάση και εισήλθαν στην ΜΠ, στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion rate), στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών το ποσοστό ήταν 55.17% (16/29) για την πειραματική ομάδα Etop 20 TL και 53.85% (21/39) για την ομάδα ελέγχου (Control TL). Τα αντίστοιχα ποσοστά στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών ήταν 50.00% (8/16) για την ομάδα Etop 20 TL και 61.11% (11/18) για την ομάδα ελέγχου (Control TL). Το ποσοστό δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των πειραματικών ομάδων τόσο στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών (p -value = 0.555) (Εικόνα 57 A), όσο και στην ηλικιακή υποομάδα >30 ετών (p -value = 0.380) (Εικόνα 57 B).



Εικόνα 57. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού σχηματισμού και αποβολής 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion rate), (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών. Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ηλικιακών υποομάδων, όσο και μεταξύ των πειραματικών ομάδων εντός της κάθε ηλικιακής υποομάδας. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του PB1 extrusion rate ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

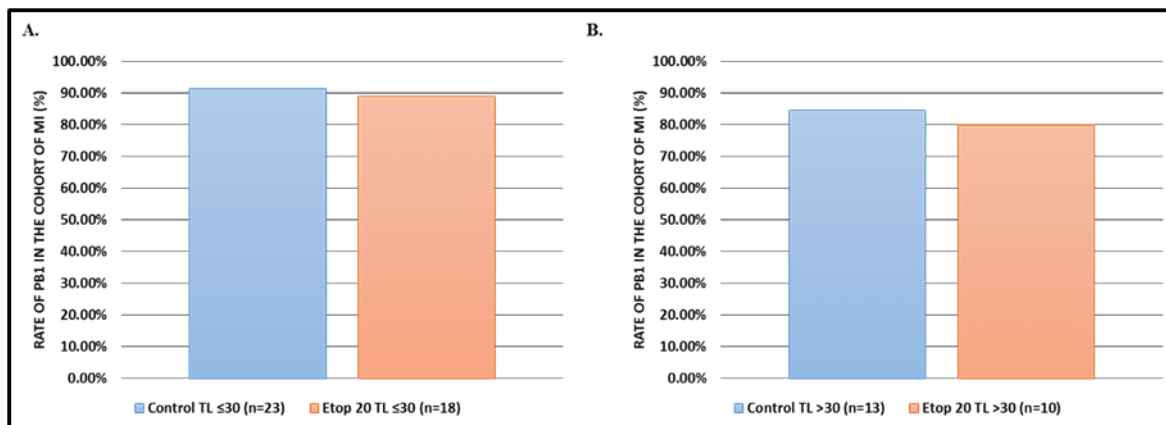
Επιπρόσθετα και ο χρόνος επίτευξης του σχηματισμού και της διάσπασης του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion time) δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των πειραματικών ομάδων, τόσο στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών (Etop 20 TL 18.14 ± 2.58 ώρες vs Control TL 17.55 ± 3.72 ώρες, $p\text{-value} = 0.660$) (Εικόνα 58 A), όσο και στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών (Etop 20 TL 18.68 ± 3.08 ώρες vs Control TL 18.74 ± 3.59 ώρες, $p\text{-value} = 0.850$) (Εικόνα 58 B).



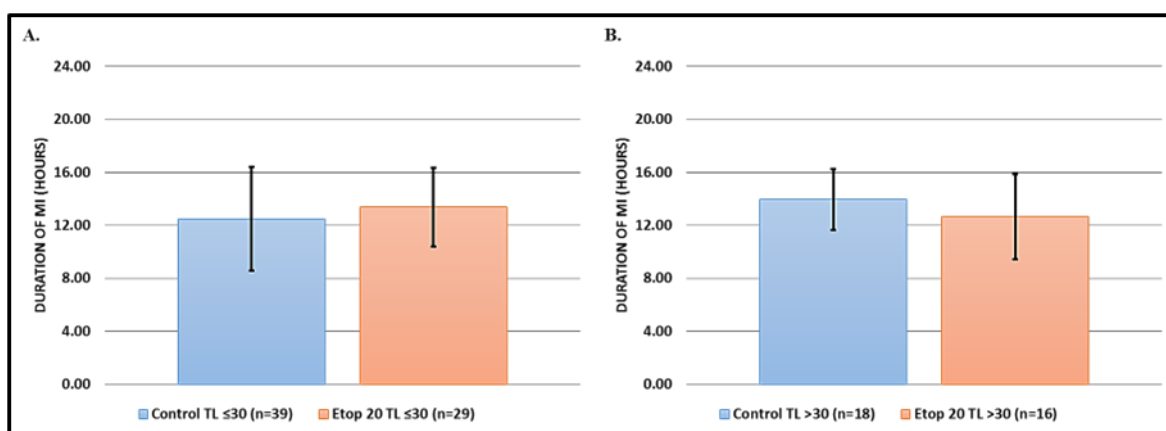
Εικόνα 58. Γραφική απεικόνιση του χρόνου που απαιτήθηκε για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός και η αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (time of PB1 extrusion), (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις αναφορικά με το ποσοστό των ΜΙ ωοκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) και το χρόνο μεταξύ της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και του σχηματισμού και της αποβολής του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), ο οποίος αντικατοπτρίζει τη διάρκεια της ΜΙ φάσης. Στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών σε 16 από τα 18 ΜΙ ωοκύτταρα της ομάδας Etop 20 TL (88.89%) παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα ελέγχου (Control TL) ήταν 91.30% (21/23). Στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών σχηματισμός και αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου παρατηρήθηκε σε 8 από τα 10 ΜΙ ωοκύτταρα της ομάδας Etop 20 TL (80.00%) και σε 11 από τα 13 ΜΙ ωοκύτταρα της ομάδας ελέγχου (84.62%) (Εικόνα 59). Αναφορικά με το χρόνο μεταξύ της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και του σχηματισμού και της αποβολής του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών ο χρόνος ήταν 13.97 ± 2.97

ώρες για την ομάδα Etop 20 TL και 12.49 ± 3.90 ώρες για την ομάδα ελέγχου. Οι αντίστοιχοι χρόνοι για την ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών ήταν 12.67 ± 3.20 ώρες για την ομάδα Etop TL και 13.97 ± 2.31 για την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 59. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των MI ωκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών. Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε στατιστικές σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ηλικιακών υποομάδων, όσο και μεταξύ των πειραματικών ομάδων εντός της κάθε ηλικιακής υποομάδας. Η στατιστική δοκιμασία που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του ποσοστού των MI ωκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε PB1 extrusion μεταξύ των ομάδων ήταν το Fisher's exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).



Εικόνα 60. Γραφική απεικόνιση του αντίστοιχου χρόνου που απαιτήθηκε για να επιτευχθεί ο σχηματισμός και η αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) από τη χρονική στιγμή διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) (διάρκεια MI φάσης), (A) στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών και (B) στην ηλικιακή υποομάδα > 30 ετών. Η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε στατιστικές σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των ηλικιακών υποομάδων, όσο και μεταξύ των πειραματικών ομάδων εντός της κάθε ηλικιακής υποομάδας. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση της συνολικής διάρκειας της MI φάσης μεταξύ των δύο ομάδων ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05).

Όπως ήταν αναμενόμενο και το ποσοστό των MI ωκυττάρων στα οποία παρατηρήθηκε σχηματισμός και αποβολή 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) (Εικόνα 59) και ο χρόνος μεταξύ της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και του

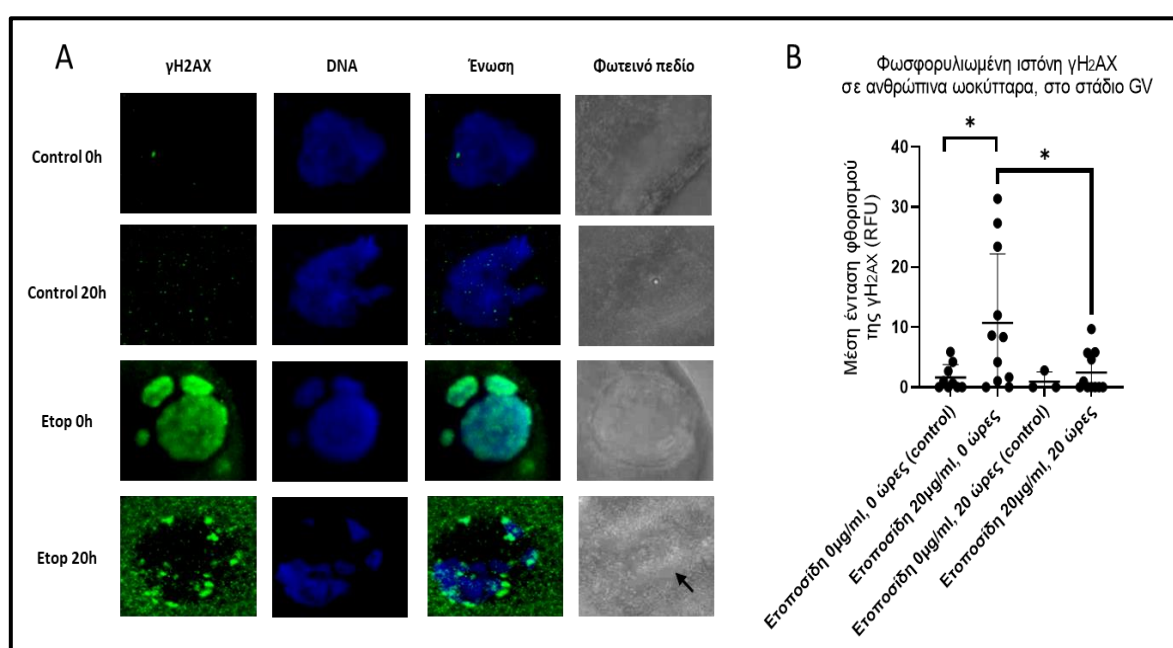
σχηματισμού και της αποβολής 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) (Εικόνα 60) δεν παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, τόσο στην ηλικιακή υποομάδα ≤ 30 ετών (p -value = 0.598 και p -value = 0.751, αντίστοιχα), όσο και στην ηλικιακή υποομάδα >30 ετών (p -value = 0.596 και p -value = 0.206, αντίστοιχα).

3.6 Μελέτη της Επιδιορθωτικής Ικανότητας των Ωοκυττάρων

Στην τελευταία φάση του ερευνητικού πρωτοκόλλου της παρούσας διδακτορικής διατριβής διερευνήθηκε η ικανότητα των ωοκυττάρων να επιδιορθώνουν βλάβες τύπου DSBs, οι οποίες προκλήθηκαν έπειτα από επώαση των ωοκυττάρων σε ετοποσίδη για μία ώρα. Πιο αναλυτικά, εννέα (9) GV ωοκύτταρα μονιμοποιήθηκαν άμεσα μετά την ανάκτηση και την αξιολόγηση της ωρίμανσής τους, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (ομάδα ελέγχου Ετοποσίδη 0 $\mu\text{g/ml}$, 0 ώρες καλλιέργειας). Αντίστοιχα, 11 GV ωοκύτταρα εκτέθηκαν σε ετοποσίδη για μία ώρα και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν άμεσα, χωρίς να καλλιεργηθούν (πειραματική ομάδα Ετοποσίδη 20 $\mu\text{g/ml}$, 0 ώρες καλλιέργειας). Από τα GV ωοκύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε σύστημα time-lapse για 24 ώρες, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της ετοποσίδης στην ικανότητα ωρίμανσής τους, τρία (3) ωοκύτταρα, τα οποία παρέμειναν στο στάδιο GV και τα οποία δεν είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ετοποσίδη μονιμοποιήθηκαν μετά την καλλιέργεια (ομάδα ελέγχου Ετοποσίδη 0 $\mu\text{g/ml}$, 24 ώρες καλλιέργειας). Αντίστοιχα, 11 ωοκύτταρα τα οποία παρέμειναν στο στάδιο GV και τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ετοποσίδη μονιμοποιήθηκαν επίσης μετά το πέρας της καλλιέργειας (πειραματική ομάδα Ετοποσίδη 20 $\mu\text{g/ml}$, 24 ώρες καλλιέργειας). Ακολούθησε πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού και ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία προκειμένου σε κάθε ομάδα να αξιολογηθεί ο βαθμός της ύπαρξης βλάβης τύπου DSBs στο DNA των ωοκυττάρων, μέσω της μέτρησης της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού από την ιστόνη γ -H2AX, η οποία και επιστρατεύεται ειδικά στα σημεία της βλάβης.

Τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας κατέδειξαν πως τα GV ωοκύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και μονιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την έκθεσή τους είχαν τα υψηλότερα επίπεδα εκπεμπόμενου ανοσοφθορισμού, άρα και υψηλότερα επίπεδα βλάβης στο DNA. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει πως τα αντίστοιχα ωοκύτταρα, τα οποία είχαν εκτεθεί σε ετοποσίδη αλλά καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες, παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα φθορισμού, τα οποία όμως ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα ανοσοφθορισμού που καταγράφηκαν στις ομάδες ελέγχου.

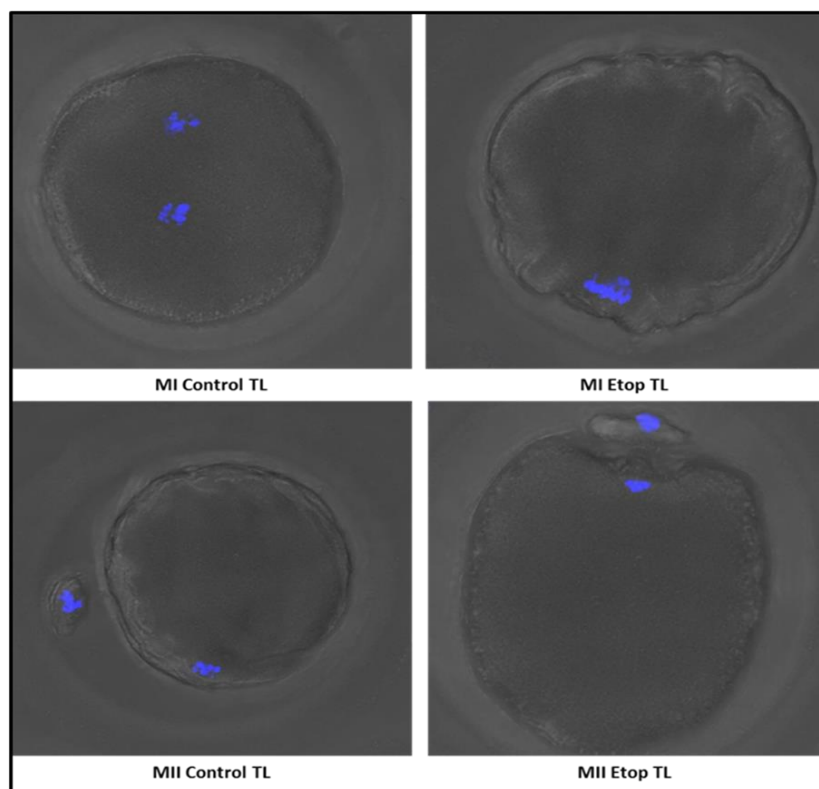
Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα παρουσιάζουν μερική ικανότητα ανίχνευσης και επιδιόρθωσης DSBs στο DNA, καθώς κάποια εκ των ωοκυττάρων παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα εκπεμπόμενου φθορισμού μετά την καλλιέργεια, ενώ κάποια άλλα συνέχιζαν να εκπέμπουν υψηλά επίπεδα φθορισμού ακόμα και μετά την πάροδο 24 ωρών. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως ο πληθυσμός των ωοκυττάρων που μελετήθηκε είναι μικρός και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, καθώς η ισχύς της στατιστικής ανάλυσης είναι περιορισμένη. Για τον λόγο αυτό παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα του εκπεμπόμενου φθορισμού σε όλες τις ομάδες μελέτης, όπως δείχνουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 61.



Εικόνα 61. Μελέτη της επιδιορθωτικής ικανότητας των ωοκυττάρων. **A:** Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η μείωση της έντασης του ανοσοφθορισμού της ιστόνης γ -H2AX έπειτα από την αρχική επώαση σε ετοποσίδη για μία ώρα και μετά την *in vitro* ωρίμανση για 24 ώρες χωρίς ετοποσίδη. Ο πράσινος ανοσοφθορισμός εκπέμπεται από την γ -H2AX στα σημεία των DSBs. Ο μπλε φθορισμός εκπέμπεται από τη φθορίζουσα χρωστική Draq7, η οποία χρησιμοποιείται για την χρώση του DNA. Οι εικόνες που παρουσιάζονται αποτελούν την ολική εικόνα που προκύπτει από την ένωση (stack) των επιμέρους εικόνων που ελήφθησαν στον άξονα z (z projections) από το συνεστιακό μικροσκόπιο. **B:** Γραφική απεικόνιση του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης του εκπεμπόμενου ανοσοφθορισμού ανά ομάδα μελέτης υπό την μορφή scatter plot. Τα αποτελέσματα προέρχονται από 34 μονιμοποιημένα ωάρια. Η μονάδα Relative Fluorescence Unit (RFU) αποτελεί αυθαίρετη μονάδα μέτρησης της έντασης του εκπεμπόμενου ανοσοφθορισμού. Ο έλεγχος που εφαρμόστηκε για την σύγκριση του εκπεμπόμενου ανοσοφθορισμού μεταξύ των ομάδων ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (p -value < 0.05). Το μαύρο βέλος δείχνει την περιοχή του πυρήνα (germinal vesicle, GV). Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον προπτυχιακό φοιτητή κ. Αλέξανδρο Παΐλα.

Στην τελική φάση του πειραματικού πρωτοκόλλου διερευνήθηκε η επιδιορθωτική ικανότητα ωοκυττάρων, τα οποία στο πλαίσιο της εικοσιτετράωρης *in vitro* ωρίμανσης σε σύστημα time-lapse κατάφεραν να επιτύχουν μετάβαση στο στάδιο MI ή/και στο στάδιο

MII. Στο πλαίσιο αυτό, MI και MII ωάρια και από τις δύο πειραματικές ομάδες (Control TL και Etop TL) μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού και ανάλυση σε συνεστιακό μικροσκόπιο για την μέτρηση του εκπεμπόμενου από την γ -H2AX φθορισμού, ο οποίος και αντικατοπτρίζει τα επίπεδα βλάβης στο DNA τύπου DSBs. Στόχος ήταν η διερεύνηση του εάν και κατά πόσον τα ωάρια που ωρίμασαν επιτυχώς κατάφεραν να επιδιορθώσουν τα DSBs σε μεγαλύτερο βαθμό από τα αντίστοιχα ωάρια που παρέμειναν στο στάδιο GV, εστιάζοντας στην διερεύνηση της συσχέτισης της δυναμικής ωρίμανσης με την δυναμική επιδιόρθωσης του DNA. Ωστόσο, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 62, τα πειράματα ανοσοφθορισμού της γ -H2AX στα MI και MII ωάρια παρουσίασαν τεχνικές δυσκολίες και ως εκ τούτου δεν μπόρεσαν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα. Η μελέτη αυτή βρίσκεται στο επίκεντρο της ερευνητικής δραστηριότητας της ερευνητικής ομάδας, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο για την ανίχνευση DSBs σε ανθρώπινα ωάρια σταδίου MI και MII.



Εικόνα 62. Μελέτη της επιδιορθωτικής ικανότητας GV ωοκυττάρων που ωρίμασαν έως το στάδιο MI και MII. Αποτυχία ανίχνευσης πράσινης φθορίζουσας χρωστικής γ -H2AX. Ο μπλε φθορισμός εκπέμπεται από τη φθορίζουσα χρωστική Draq7, η οποία χρησιμοποιείται για την χρώση του DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.5, η μελέτη της απόκρισης των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, όχι μόνο στο επίπεδο της βασικής έρευνας, αλλά και στο επίπεδο της κλινικής έρευνας, καθώς οι βλάβες αυτές μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη γονιμότητα, την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την υγεία των απογόνων. Ως εκ της ιδιαίτερης αναπτυξιακής τους πορείας, τα ωοκύτταρα παρουσιάζουν έναν ιδιαίτερο κύκλο ζωής, ο οποίος έχει εξαιρετικά μεγάλη διάρκεια, επιτρέποντας έτσι την συνεχή έκθεση των ωοκυττάρων σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA. Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η οποία στις μέρες μας παρουσιάζει ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση λόγω της αναλογικής αύξησης του επιπολασμού της υπογονιμότητας σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ωοκύτταρα υφίσταται επιδράσεις από τους μικροχειρισμούς και το *in vitro* περιβάλλον καλλιέργειας με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του αριθμού όλων εκείνων των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς την ακεραιότητα του γενετικού τους υλικού. Αν και η απόκριση των ωοκυττάρων στις βλάβες του DNA αποτελεί αντικείμενο μελέτης της επιστημονικής κοινότητας εδώ και πολλές δεκαετίες, υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα αναφορικά με το εάν και κατά πόσον τα ωοκύτταρα μπορούν να επιδιορθώσουν ενδεχόμενες βλάβες στο DNA, μέσω ποιανών μοριακών μηχανισμών πραγματοποιείται αυτό, αλλά και με το ποιος είναι ο πραγματικός αντίκτυπος των βλαβών αυτών στο τελικό αναπτυξιακό δυναμικό των ωοκυττάρων. Τα δεδομένα αυτά προέρχονται κυρίως από πειραματικά ζωικά μοντέλα, ενώ τα δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπινα ωοκύτταρα είναι ακόμα πιο περιορισμένα. Αυτό αποτέλεσε και τον “οδηγό” (driver) για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η οποία αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες μελέτες διερεύνησης της απόκρισης ανθρώπινων ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA.

Για να γίνει πιο κατανοητή η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, αξίζει να πραγματοποιηθεί μία σύνοψη της αναπτυξιακής πορείας των ωοκυττάρων, από τη στιγμή της διαφοροποίησής τους κατά την εμβρυϊκή ζωή, έως και την στιγμή της πλήρους ωρίμανσής τους πριν την γονιμοποίηση. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής των θηλυκού γένους θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα εισέρχονται στην μείωση και μετά από τον ομόλογο ανασυνδυασμό τα ωοκύτταρα εισέρχονται σε μία φάση ανάσχεσης του κυτταρικού κύκλου (arrest) στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Τα ωοκύτταρα αυτά βρίσκονται εντός των

πρωτογενών ωοθυλακίων (primordial follicles) και παραμένουν στην κατάσταση αυτή έως και την έλευση της εμμηναρχής. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως λόγω της διακοπής της έκφρασης ποικίλων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου που είναι υπεύθυνοι για τη συνέχιση και την ολοκλήρωση της μείωσης (Mitra and Schultz, 1996; Pailas et al., 2022). Κατά την έλευση της εφηβείας και της εμμηναρχής, ένα ή περισσότερα ωοκύτταρα σε κάθε έμμηνο κύκλο εισέρχονται σε μία φάση αύξησης και ωρίμανσης, η οποία είναι ορμονικά ρυθμιζόμενη. Στο πλαίσιο της φάσης αυτής παρατηρείται έντονη σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών, τα οποία είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της μείωσης, τη γονιμοποίηση και τη μετέπειτα εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα ωοκύτταρα αυτά ταυτοποιούνται από την ύπαρξη ενός μεγάλου πυρήνα (germinal vesicle, GV) που χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά συμπυκνωμένη χρωματίνη, η οποία περιβάλλει τους πυρηνίσκους και είναι μεταγραφικά ανενεργή (Pailas et al., 2022).

Στο μοριακό επίπεδο, σε αναλογία με την ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στα σωματικά κύτταρα που επάγεται από το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (DNA Damage Checkpoint, DDC) στην G2 φάση όταν αυτό απαιτείται, κατά τη διάρκεια της ανάσχεσης της μείωσης των ωοκυττάρων στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, το σύμπλοκο Cyclin B-CDK1 kinase διατηρείται ανενεργό και για αυτό το λόγο η ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης παρεμποδίζεται. Μάλιστα, τα φαινόμενα της ανάσχεσης του κυτταρικού κύκλου στη G2 φάση και της ανάσχεσης της μείωσης των ωοκυττάρων στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης προσομοιάζουν έντονα το ένα το άλλο, καθώς είναι και τα δύο συμβάντα ανεξάρτητα από τη μεταγραφή (Solc et al., 2010). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως και στις δύο περιπτώσεις η ανάσχεση της προόδου του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από μία αλληλουχία φωσφορυλιώσεων συμπλόκων κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ενεργότητα του G2 DDC, η ανάσχεση στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης δεν επάγεται από τα σύμπλοκα ATM/ATR και Chk1/Chk2, αλλά από τα υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού cAMP, τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (Protein Kinase A, PKA). Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει από κοινού την κινάση Wee1 και την φωσφατάση Cdc25 και ως εκ τούτου παρατηρείται ενεργοποίηση της πρώτης και σίγαση της δεύτερης. Τα δύο αυτά συμβάντα οδηγούν με τη σειρά τους σε κατασταλτική φωσφορυλίωση του συμπλόκου Cyclin B-CDK1 από τον παράγοντα Wee1, ενώ ταυτόχρονα η ανενεργή φωσφατάση Cdc25 δεν μπορεί να απομακρύνει τις φωσφορικές

ομάδες από το σύμπλοκο Cyclin B-CDK1 και έτσι το τελευταίο καταστέλλεται, με τελικό αποτέλεσμα την ανασχεση του κύκλου στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (Jones, 2004; Marangos and Carroll, 2004).

Το πρωταρχικό σήμα για την συνέχιση της μειωτικής διαίρεσης δίνεται από την μεσοκυκλική εκκριτική αιχμή της LH, η οποία και επάγει την ωοθυλακιορρηξία. Στο πλαίσιο της συνέχισης της μείωσης, ο παράγοντας PKA απενεργοποιείται και ως εκ τούτου απενεργοποιείται και ο κατασταλτικός παράγοντας Wee1, ενώ παράλληλα ενεργοποιείται η φωσφατάση Cdc25. Η τελευταία, αποφωσφορυλιώνει το σύμπλοκο Cyclin B-CDK1, το οποίο και επάγει τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GV breakdown, GVBD) και έτσι σηματοδοτείται η είσοδος στη μεγάλη διάρκειας φάση της μείωσης I. Μετά τον σχηματισμό της 1^{ης} μειωτικής ατράκτου και την ορθή πρόσδεση όλων των ομολόγων χρωμοσωμάτων στη μεταφασική πλάκα, η Cyclin B αποδομείται από την δράση της λιγάσης της ουβικουιτίνης E3 του Συμπλόκου Προώθησης της Ανάφασης ή Κυκλοσώματος (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome, APC/C). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε απενεργοποίηση του συμπλόκου Cyclin B-CDK1 και στον επακόλουθο διαχωρισμό των ομολόγων χρωμοσωμάτων (Jones, 2004; Marangos and Carroll, 2004; Pailas et al., 2022). Η ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης σηματοδοτείται από τον σχηματισμό και την αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion), ενώ το ωοκύτταρο εισέρχεται άμεσα στην 2^η μειωτική διαίρεση, η οποία αναχαιτίζεται εκ νέου στο στάδιο της μετάφασης II και ολοκληρώνεται μετά τη γονιμοποίηση (Jones, 2004; Marangos and Carroll, 2004; Pailas et al., 2022).

Η σύνοψη των μοριακών μηχανισμών ελέγχου των μειωτικών διαιρέσεων, κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων, είναι εξαιρετικά σημαντική προκειμένου να γίνουν περισσότερο κατανοητοί οι μηχανισμοί ελέγχου και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA των ωοκυττάρων, κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων ωρίμανσης. Πιο αναλυτικά, η διερεύνηση της απόκρισης των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA ξεκίνησε έντονα πριν από περίπου τρεις δεκαετίες. Στις πρωταρχικές αυτές μελέτες ανώριμα GV ωοκύτταρα εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV-A και UV-C) και τα αποτελέσματα έδειξαν πως η UV ακτινοβολία μάλλον δεν επηρεάζει τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), δηλαδή την συνέχιση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, αλλά επηρεάζει δυσμενώς την πρόοδο της M φάσης και την ολοκλήρωση της MI (Bradshaw et al., 1995). Μάλιστα, φάνηκε πως η UV ακτινοβολία επέδρασε αρνητικά στον σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου και

οδήγησε σε πτώση των επιπέδων του παράγοντα προώθησης της ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor, MPF), με τελικό αποτέλεσμα την διακοπή της ωρίμανσης στην φάση MI και την ανώμαλη παρθενογενετική ενεργοποίηση όσων ωοκυττάρων έφτασαν στο στάδιο MII. Βλάβες επίσης ανιχνεύθηκαν στον σχηματισμό του θηλυκού προουρηνίου στους ζυγώτες που προέκυψαν από τα εκτεθειμένα στην UV ωοκύτταρα (Bradshaw et al., 1995). Αν και οι μελέτες αυτές προσέφεραν απλές παρατηρήσεις και όχι αιτιολογικές ερμηνείες των φαινομένων αυτών, τα δεδομένα τους κατέδειξαν από νωρίς κάτι πολύ σημαντικό. Αυτό είναι πως η απόκριση των ωοκυττάρων στις βλάβες του DNA και η τελική επίδραση των βλαβών αυτών στη φυσιολογία των ωαρίων εξαρτάται σημαντικά από το είδος και την ένταση του παράγοντα που προκαλεί τη βλάβη, το είδος της βλάβης και την φάση ωρίμανσης που λαμβάνει χώρα η βλάβη.

Εστιάζοντας στα πιο σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούμε να αντλήσουμε περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με την επίδραση που έχουν οι βλάβες στο DNA στην ρύθμιση της ωρίμανσης και του δυναμικού των ωοκυττάρων, πεδίο στο οποίο εμπίπτει και το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της απόκρισης των ωοκυττάρων σε βλάβες τύπου DSBs, οι οποίες και μελετώνται διεξοδικά τα τελευταία χρόνια. Η παρουσία DSBs στο DNA των ωοκυττάρων εντοπίζεται από την παρουσία της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX (γ -H2AX) στα σημεία της βλάβης (Rogakou et al., 1998). Ως εκ τούτου η γ -H2AX αποτελεί σήμερα ένα βιοδείκτη υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας που χρησιμοποιείται στην βιοϊατρική έρευνα για τον εντοπισμό DSBs σε κύτταρα. Η ανίχνευση των DSBs και η επιστράτευση της γ -H2AX στα σημεία της βλάβης πραγματοποιείται από το σύμπλοκο Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) και πιο ειδικά από την Mre11 (Mayer et al., 2016). Η μελέτη των DSBs στα ωοκύτταρα είναι ιδιαίτερα σημαντική για πολλούς λόγους. Σε αυτούς συγκαταλέγονται το γεγονός πως τα DSBs αποτελούν βλάβες οι οποίες δημιουργούνται στα ωοκύτταρα πολύ συχνά τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* από μία πλειάδα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ROS, η ομοιόσταση των οποίων παρουσιάζει σημαντική διακύμανση εντός του αναπαραγωγικού συστήματος. Επιπρόσθετα, ο εντοπισμός των DSBs μέσω της ιστόνης γ -H2AX είναι καλά καθορισμένος και το σημαντικότερο είναι πως η απόκριση των ωοκυττάρων σε βλάβες τύπου DSBs διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το μέγεθος και την έκταση της βλάβης. Για τον λόγο αυτό η επαγωγή και η μελέτη των DSBs αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο

για τη διερεύνηση των επιπτώσεων που έχουν οι βλάβες στο DNA στη φυσιολογία των ωοκυττάρων, καθώς και για την ανάλυση της ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων.

Πιο αναλυτικά, όταν τα επίπεδα της βλάβης τύπου DSBs είναι εκτεταμένα, όπως προκύπτει μετά από έκθεση GV ωοκυττάρων του ποντικού σε υψηλές δόσεις αναστολέων της τοποϊσομεράσης-II μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η ετοποσίδη και η μπλεομυκίνη (bleomycin), παρατηρείται ολοκληρωτική αναστολή της μείωσης και τα εκτεθειμένα ωοκύτταρα παραμένουν στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (στάδιο GV) (Ma et al., 2013; Marangos and Carroll, 2012). Η αναστολή της μείωσης σε αυτές τις περιπτώσεις διατηρείται μέσω του συμπλόκου ATM, το οποίο φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Chk1, ο οποίος με την σειρά του μέσω φωσφορυλίωσης αναστέλλει την φωσφατάση Cdc25B (Ma et al., 2013; Marangos and Carroll, 2012). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και με βάση τα δεδομένα που παρέχονται από την παρούσα διδακτορική διατριβή και μέρος τους έχει ήδη δημοσιευθεί (Rémillard-Labrosse et al., 2020). Πράγματι, στο πλαίσιο των πειραμάτων ελέγχου της ευαισθησίας των μηχανισμών ελέγχου των βλαβών του DNA (titration experiments) που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε πως η έκθεση GV ανθρώπινων ωοκυττάρων για μία ώρα σε συγκέντρωση ετοποσίδης 100 µg/ml προκαλεί ολοκληρωτική αναστολή της μείωσης στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης στο σύνολο των ωοκυττάρων που εκτέθηκαν στις δόσεις αυτές. Τα παραπάνω δείχνουν πως όταν οι βλάβες είναι εκτεταμένες τότε η ωρίμανση των ωοκυττάρων αναστέλλεται άμεσα. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως τα ανθρώπινα ωοκύτταρα διαθέτουν σημεία ελέγχου για την ανίχνευση βλαβών στο DNA στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, τα οποία ενεργοποιούνται σε εκτεταμένη γενοτοξική βλάβη. Σε αντίθεση με τις εκτεταμένες βλάβες, τα σημεία ελέγχου για την ανίχνευση βλαβών στο DNA στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης δεν παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία για ήπιας ή/και μέτριας έκτασης βλάβες στο DNA, με αποτέλεσμα ανθρώπινα ωοκύτταρα που φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA να υφίσταται διάσπαση βλαστικού κυστιδίου (GVBD) και να μεταβαίνουν επιτυχώς από το στάδιο GV στο στάδιο MI, έχοντας βλάβες στο DNA τους, όπως παρατηρήθηκε για τα GV ωοκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 10 µg/ml και 20 µg/ml. Μάλιστα, τα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά κατά την ωρίμανση των GV ωοκυττάρων που φέρουν μέτριου βαθμού βλάβες στο DNA δεν διαφέρουν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά που

παρατηρούνται για ωκύτταρα που δεν παρουσιάζουν βλάβες στο DNA, κάτι που ενδυναμώνει ακόμα περισσότερο την υπόθεση πως τα ανθρώπινα GV ωκύτταρα διαθέτουν σημεία ελέγχου χαμηλής ευαισθησίας κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης.

Πράγματι η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από πολυάριθμα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία δείχνουν πως όταν η γοναδοτοξική επίδραση δεν είναι τόσο εκτεταμένη, τότε τα ωάρια μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ωρίμανσή τους. Έχει δειχθεί πως χαμηλότερα επίπεδα βλάβης, τα οποία επάγονται από μικρότερες δόσεις κυτταροτοξικών ουσιών, όπως είναι η ετοποσίδη, η νεοκαρζινοστατίνη και η μπλεομυκίνη, παρουσιάζουν αμελητέα επίδραση στην πορεία της μείωσης των ωαρίων και δεν προκαλούν αναστολή της ωρίμανσης σε κανένα από τα στάδια των μειωτικών διαιρέσεων (Ma et al., 2013; Marangos and Carroll, 2012; Pailas et al., 2022; Yuen et al., 2012). Τα δεδομένα αυτά παρέχονται από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ωκύτταρα ζωικών μοντέλων, αλλά και του ανθρώπου, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση πως μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA τύπου DSBs δεν παρεμποδίζουν την είσοδο στην MI και το GVBD (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2014). Ακριβώς στα ίδια συμπεράσματα μπορούμε να καταλήξουμε αναλύοντας και τα δεδομένα που παρέχονται από την παρούσα διδακτορική διατριβή. Ενώ η έκθεση ανθρώπινων GV ωκυττάρων σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης των 100 μg/ml είχε σαν αποτέλεσμα την καθολική αναστολή της ωρίμανσης στο στάδιο της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, η έκθεση σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης των 20 μg/ml δεν επηρέασε την ωρίμανση των εκτεθειμένων ωκυττάρων. Τα GV ωκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης 20 μg/ml για μία ώρα παρουσίασαν τα ίδια ποσοστά GVBD σε σύγκριση με τα αντίστοιχα GV ωκύτταρα της ομάδας ελέγχου. Μάλιστα μέσω της τεχνολογίας time-lapse διαπιστώθηκε πως και οι αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξης του GVBD δεν διέφεραν μεταξύ της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, όπως διαπιστώθηκε από τα πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας για την ανίχνευση της γ-H2AX, τα GV ωκύτταρα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ετοποσίδης των 20 μg/ml παρουσίαζαν βλάβες τύπου DSBs στο γενετικό τους υλικό. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, φαίνεται πως όταν οι βλάβες τύπου DSBs είναι παρούσες, αλλά όχι εκτεταμένες, τότε δεν παρατηρείται καμία διαφορά στα χαρακτηριστικά της ωρίμανσης των GV ωκυττάρων σε σύγκριση με αντίστοιχα ωκύτταρα που δεν φέρουν ανάλογες βλάβες. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ανθρώπινα

ωοκύτταρα με βλάβες στο DNA μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ωρίμανσή τους και να γονιμοποιηθούν, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιωματική αστάθεια και ως εκ τούτου σε μη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η ακριβής μοριακή ερμηνεία του παράδοξου αυτού φαινομένου της χαμηλής ευαισθησίας των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που επιτρέπει σε ωοκύτταρα που φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA τους να συνεχίσουν την ωρίμανσή τους, παραμένει αδιευκρίνιστη. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν πως η αδυναμία αναστολής της ωρίμανσης στην πρόφαση, σε GV ωοκύτταρα που φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA, οφείλεται σε περιορισμένη ενεργότητα του μονοπατιού ATM/Chk1 (Marangos and Carroll, 2012; Pailas et al., 2022; Wang et al., 2016). Πρόσφατα, με βάση πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ωοκύτταρα ποντικού, προτάθηκε πως η αδυναμία αυτή πηγάζει από τη συνεχή ενεργοποίηση του παράγοντα αγρίου τύπου p53-induced phosphatase 1 (Wip1), ο οποίος ίσως παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση και άρα την ενεργοποίηση του συμπλόκου ATM. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση πως όταν η δραστηριότητα του παράγοντα Wip1 αναστέλλεται φαρμακευτικά, τότε τα επίπεδα δραστηριότητας του ATM αυξάνονται σημαντικά, επάγοντας την αναστολή της ωρίμανσης στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης σε GV ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA (Leem et al., 2018).

Μία ακόμα πιθανή ερμηνεία του φαινομένου υποστηρίζει πως η αδυναμία αναστολής της ανάπτυξης στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης οφείλεται στην καθυστερημένη ανίχνευση και απόκριση των μοριακών μηχανισμών ελέγχου και επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA στο στάδιο GV. Μία πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει πως η απόκριση των σημείων ελέγχου βλαβών του DNA (DNA Damage Checkpoints, DDCs) στην πρόφαση λαμβάνει χώρα μετά από 20 ή και περισσότερες ώρες από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η βλάβη (Subramanian et al., 2020). Μάλιστα, αυτό δεν είναι το μοναδικό παράδοξο που περιεγράφηκε στη μελέτη αυτή, που περιλάμβανε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ωοκύτταρα ποντικών. Οι συγγραφείς επιπρόσθετα κατέδειξαν πως η καθυστερημένη αυτή ανταπόκριση στη βλάβη δεν διαμεσολαβείται μέσω καταστολής της φωσφορυλίωσης του παράγοντα Cdk1, όπως θα περίμενε κανείς, αλλά μέσω διαμεσολαβούμενης από το σύμπλοκο APC-Cdh1 πρωτεόλυσης του ενεργοποιητή του παράγοντα Cdk1, της Cyclin B. Η αύξηση της ενεργότητας του συμπλόκου APC-Cdh1, το οποίο επάγει το ανωτέρω περιγραφόμενο ανεξάρτητο από τη φωσφορυλίωση μονοπάτι

πρωτεόλυσης, βρέθηκε πως οφείλεται σε αυξημένη ενεργότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης Cdc14B, η οποία δρα ως ενεργοποιητής του συμπλόκου APC-Cdh1 και σε μειωμένη ενεργότητα του παράγοντα Emi1, ο οποίος έχει ιδιότητες καταστολέα του συμπλόκου APC-Cdh1 (Subramanian et al., 2020). Η μελέτη αυτή παρουσιάζει βαρύνουσα σημασία διότι περιγράφει έναν νέο, εν πολλοίς άγνωστο, μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του DNA στα ωκύτταρα των θηλαστικών. Ωστόσο, απαιτούνται επιπρόσθετα πειράματα για να καθοριστεί το εάν και τα πόσον τα παραπάνω ισχύουν και στα ωκύτταρα άλλων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Μία ακόμα πολύ σημαντική παρατήρηση, που αφορά τους μηχανισμούς απόκρισης GV ωκυττάρων σε βλάβες του DNA, υποστηρίζει πως σημαντικό ρόλο σε αυτήν διαδραματίζουν τα κοκκιώδη κύτταρα των COCs. Οι μελέτες που υποστηρίζουν τον μηχανισμό αυτό δείχνουν αύξηση της δραστηριότητας του DDC στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης παρουσία βλάβης στο DNA, όταν τα ωκύτταρα παραμένουν εσώκλειστα μέσα στα COCs. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται σε αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού cAMP στα ωκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA, η οποία αύξηση διαμεσολαβείται μέσω της μεταφοράς cAMP από τα κοκκιώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου στο ωκύτταρο, μέσω των ισχυρών διακυτταρικών χασματοσυνδέσεων που τα ενώνουν (Sun et al., 2015). Μάλιστα, αυτό έχει περιγραφεί για πολυάριθμα σηματοδοτικά μόρια και ορμόνες και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό μέσω του οποίου τα COCs υποστηρίζουν την ανάπτυξη και ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ωκυττάρων (Kidder and Mhawī, 2002). Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής διαμορφώνεται ένα ισχυρό πρότυπο που υποστηρίζει πως οι μηχανισμοί ελέγχου για βλάβες του DNA κατά την πρόφαση παρουσιάζουν πολύ χαμηλή ευαισθησία στα ωκύτταρα του ανθρώπου και η απόκρισή τους γίνεται έντονη μόνο παρουσία εκτεταμένης βλάβης του DNA (Pailas et al., 2022).

Όλα τα παραπάνω ισχύουν για την απόκριση των μηχανισμών ελέγχου για βλάβες του DNA κατά την πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Ωστόσο αξίζει να πραγματοποιηθεί μία σύνοψη των νεότερων βιβλιογραφικών δεδομένων αναφορικά με την απόκριση των ωκυττάρων σε βλάβες του DNA που συμβαίνουν σε μεταγενέστερα στάδια ωρίμανσης και συγκεκριμένα κατά την φάση M της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (στάδιο MI) και κατά τη φάση μετά την ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (στάδιο MII).

Αναφορικά με την απόκριση των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA κατά τη φάση M της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης (στάδιο MI), τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζουν ένα μοντέλο παρόμοιο με αυτό που παρουσιάστηκε παραπάνω για το DDC στην πρόφαση, όπου δηλαδή εκτεταμένες βλάβες στο DNA μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ωρίμανσης στο στάδιο MI χωρίς να παρατηρείται σχηματισμός του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion). Ωστόσο, λιγότερο εκτεταμένες βλάβες δεν παρεμποδίζουν την ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και την εξαγωγή του 1^{ου} πολικού σωματίου (F. Lin et al., 2014; Pailas et al., 2022; Zhang et al., 2014). Πιο αναλυτικά, η απόκριση των ωοκυττάρων σε βλάβες του DNA κατά την M φάση δεν φαίνεται να ρυθμίζεται από τα παραδοσιακά DDCs, όπως είναι τα σύμπλοκα ATM και ATR, αλλά από την ενεργοποίηση του Σημείου Ελέγχου της Ακεραιότητας της Ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) (Lane et al., 2017; Marangos et al., 2015). Το SAC επιτηρεί την σωστή στοίχιση και πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της μειωτικής ατράκτου. Όταν παρουσιάζεται βλάβη στην άτρακτο, τότε τα στοιχεία του SAC επιστρατεύονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, στις θέσεις της χρωματίνης των κεντροσωματίων και καταστέλλουν την δράση του APC/C, οδηγώντας σε αποδόμηση της Cyclin B, με τελικό αποτέλεσμα την έξοδο από την φάση M (Musacchio and Salmon, 2007).

Αυξημένη ενεργότητα του SAC κατά την M φάση έχει παρατηρηθεί σε MI ωοκύτταρα τα οποία είχαν υποστεί βλάβη κατά το στάδιο GV, υποδηλώνοντας πως ίσως αλλαγές στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης και ο κατακερματισμός του DNA μπορούν να ενεργοποιήσουν το SAC, προκαλώντας αναστολή της ωρίμανσης στο στάδιο MI (Collins et al., 2015; F. Lin et al., 2014; Ma et al., 2013; Marangos et al., 2015). Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως παρουσία βλάβης στο DNA επιστράτευση των στοιχείων του SAC παρατηρείται μόνο στις θέσεις των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων, αν και τα κυτταροτοξικά σκευάσματα, όπως είναι η ετοποσίδη, προκαλούν βλάβες σε όλη την έκταση των χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των κινητοχώρων και των βραχιόνων των χρωμοσωμάτων (Lane et al., 2017). Κάτι τέτοιο υποδηλώνει πως το SAC ίσως είναι ευαίσθητο σε βλάβες του DNA που επηρεάζουν την αρχιτεκτονική της μειωτικής ατράκτου, αλλά όχι σε βλάβες που δεν σχετίζονται με την άτρακτο και με την πρόσδεση των χρωμοσωμάτων.

Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται από ολοένα και περισσότερα δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν πως βλάβες στο DNA των ωοκυττάρων μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του SAC στο στάδιο MI, χωρίς ωστόσο το συγκεκριμένο σημείο ελέγχου να είναι ευαίσθητο στην φάση αυτή, καθώς σε πολλές περιπτώσεις ωοκύτταρα με εμμένουσες βλάβες στο DNA μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς το στάδιο MI και να εισέλθουν στο στάδιο MII (Pailas et al., 2022). Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η ωρίμανση ανθρώπινων ωοκυττάρων που φέρουν βλάβες στο DNA φαίνεται πως δεν αναστέλλεται στο στάδιο MI ως απόκριση στην ύπαρξη βλάβης στο DNA (Rémillard-Labrosse et al., 2020). Αυτό μπορεί να αποτελέσει και μία λογική ερμηνεία των παρατηρήσεων διαφόρων μελετών, οι οποίες έδειξαν αυξημένα επίπεδα κατακερματισμού του DNA και μη φυσιολογική αρχιτεκτονική της μεταφασικής πλάκας, καθώς και της μειωτικής ατράκτου σε MII ωάρια τα οποία είχαν υποστεί βλάβες στο DNA στο στάδιο GV (Collins et al., 2015; Ding et al., 2019; F. Lin et al., 2014; Marangos et al., 2015). Επιπρόσθετα, φαίνεται πως παρά το γεγονός πως το SAC ενεργοποιείται στο στάδιο MII σε απόκριση σε βλάβες στην αρχιτεκτονική της μειωτικής ατράκτου της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης, οι βλάβες στο DNA που δεν επηρεάζουν την άτρακτο δεν προκαλούν ενεργοποίηση του SAC (Lane et al., 2017). Αυτό έχει καλά τεκμηριωθεί από μελέτες που δείχνουν πως δεν υπάρχει σημαντική επιστράτευση των στοιχείων του SAC στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων μετά από πρόκληση βλάβης στο DNA στο στάδιο MII (Lane et al., 2017; Pailas et al., 2022).

Τα δεδομένα των μελετών αυτών επιβεβαιώνονται πλήρως και από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η οποία περιλάμβανε μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ωοκυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται πως τα ωοκύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβες στο DNA τύπου DSBs, μετά από επώαση για μία ώρα σε διάλυμα 20 μg/ml ετοποσίδης, μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς το στάδιο MI και να εισέλθουν στο στάδιο MII. Αυτό διαπιστώνεται από το γεγονός πως τα ποσοστά των MI και MII ωαρίων μετά την εικοσιτετράωρη *in vitro* καλλιέργεια στο σύστημα time-lapse δεν διέφεραν μεταξύ της ομάδας των GV ωοκυττάρων που εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου. Επιπρόσθετα, μέσω της ανάλυσης των δεδομένων του συστήματος time-lapse διαπιστώθηκε πως ούτε οι χρόνοι μετάβασης από το ένα στάδιο στο άλλο διέφεραν μεταξύ των ομάδων, καθώς η διάρκεια από τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) έως το σχηματισμό και την αποβολή του 1^{ου} πολικού σωματίου (PB1 extrusion) ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων. Συμπερασματικά, φαίνεται

πως GV ανθρώπινα ωοκύτταρα τα οποία φέρουν μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA μπορούν επιτυχώς να ολοκληρώσουν την 1^η μειωτική διαίρεση και να μεταβούν από την φάση MI στην φάση MII, καθώς τα σημεία ελέγχου της φάσης M παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί μία σημαντική παρατήρηση που έχει πραγματοποιηθεί από μελέτες σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, οι οποίες υποστηρίζουν πως η επαγόμενη από βλάβες του DNA δραστηριότητα του σημείου ελέγχου κατά την MI φάση επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε γερασμένα ωοκύτταρα ποντικών φάνηκε μειωμένη επιστράτευση των στοιχείων του SAC στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, έπειτα από επαγωγή βλάβης στο DNA. Μάλιστα, αυτή η μείωση της ευαισθησίας του SAC ήταν άμεσα σχετιζόμενη με την ηλικία των θήλων ποντικών, από όπου και ανακτήθηκαν τα ωοκύτταρα (Marangos et al., 2015). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν πως όσο αυξάνεται η αναπαραγωγική ηλικία, τόσο αυξάνεται η συχνότητα βλαβών στο DNA, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η ευαισθησία των σημείων ελέγχου του κύκλου ωρίμανσης των ωοκυττάρων, με αποτέλεσμα την συσσώρευση μεταλλάξεων και τη γονιδιωματική αστάθεια των ωαρίων και των εμβρύων. Ο μηχανισμός αυτός παρέχει νέα δεδομένα αναφορικά με το πώς η προχωρημένη μητρική ηλικία επιδρά αρνητικά στη γονιμότητα, καθώς και στα μαιευτικά, περιγεννητικά και παιδιατρικά αποτελέσματα.

Έχοντας ως γνώμονα τις σημαντικές αυτές παρατηρήσεις, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση υποομάδων ανάλογα με την ηλικία των δοτριών που προσέφεραν τα ωοκύτταρά τους για τους ερευνητικούς σκοπούς της διατριβής, με σκοπό τη διερεύνηση της ισχύος των συμπερασμάτων των πειραματικών ζωικών μοντέλων στα ανθρώπινα ωοκύτταρα. Για τον σκοπό αυτό ο πληθυσμός των GV ωοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη διαχωρίστηκε σε δύο υποομάδες ανάλογα με την ηλικία των δοτριών. Η μία υποομάδα περιλάμβανε GV ωοκύτταρα που συλλέχθηκαν από δότριες ηλικίας ≤ 30 ετών και η άλλη GV ωοκύτταρα που συλλέχθηκαν από δότριες ηλικίας > 30 ετών. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης υποομάδων, φαίνεται πως η ηλικία δεν επιδρά σημαντικά στα μορφοκινητικά χαρακτηριστικά κατά την *in vitro* ωρίμανση ανθρώπινων GV ωοκυττάρων, τα οποία προηγουμένως έχουν εκτεθεί σε ετοποσίδη και άρα φέρουν βλάβες στο DNA τύπου DSBs. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν έμμεσα πως η ευαισθησία του SAC, τουλάχιστον σε αυτό το ηλικιακό εύρος δεν μεταβάλλεται σημαντικά,

καθώς εάν ήταν μειωμένη, όπως υποστηρίζει η βιβλιογραφία, τότε θα παρατηρούσαμε θεωρητικά αυξημένο ποσοστό επιτυχούς ωρίμανσης GV ωοκυττάρων που προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε ετοποσίδη στην ηλικιακή ομάδα > 30 ετών. Ωστόσο, στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα της ανάλυσης υποομάδων θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, λόγω των περιορισμών που τίθενται από τον σχεδιασμό της μελέτης, αλλά και από τη δυναμική της στατιστικής ανάλυσης. Πιο αναλυτικά, στον υπό μελέτη πληθυσμό δεν περιλαμβάνονται γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών, δηλαδή γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας (advanced maternal age, AMA). Με βάση τη βιβλιογραφία, σε αυτόν τον πληθυσμό θα περιμέναμε να εντοπίσουμε σημαντική απευαισθητοποίηση του SAC, καθώς στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης η πλειονότητα των ωοκυττάρων που ανακτώνται στον AMA πληθυσμό φέρει ανευπλοειδίες ή/και βλάβες στο DNA, ακόμα και εάν έχουν ολοκληρώσει επιτυχώς την ωρίμανσή τους έως το στάδιο MII, ενώ αντίστοιχα δεδομένα παρουσιάζονται και σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα. Άρα ο πληθυσμός που μελετήθηκε ίσως να μην ήταν ο κατάλληλος για να καταδείξει σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά της μορφοκινητικής ωρίμανσης ωοκυττάρων που φέρουν βλάβες στο DNA μεταξύ διαφορετικών ηλικιακών ομάδων. Επιπρόσθετα, και αναφορικά με τη δυναμική της στατιστικής ανάλυσης, αξίζει να σημειωθεί πως ο πληθυσμός των ωοκυττάρων που μελετήθηκε και ειδικά στην υποομάδα > 30 ετών ήταν πολύ μικρός και έτσι η ισχύς της ανάλυσης είναι σημαντικά περιορισμένη. Απαιτούνται πρόσθετες μελέτες σε πιο στοχευμένο πληθυσμό και σε πολύ μεγαλύτερο δείγμα προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με το εάν και κατά πόσον η ηλικία μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία του SAC σε ανθρώπινα ωοκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες στο DNA.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω φαίνεται πως τα ωοκύτταρα των θηλαστικών και ειδικά του ανθρώπου διαθέτουν μηχανισμούς ελέγχου για βλάβες του DNA περιορισμένης ευαισθησίας σε μη εκτεταμένες βλάβες στο DNA, οι οποίες όμως εν δυνάμει μπορούν να προκαλέσουν γονιδιωματική αστάθεια με δυσμενείς συνέπειες για το αναπτυξιακό δυναμικό των ωαρίων, καθώς και για την μετέπειτα εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου έχει σαν αποτέλεσμα η ωρίμανση των ωοκυττάρων να μην διακόπτεται παρουσία βλάβης στο DNA, κάτι που είναι μείζονος σημασίας, ώστε να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης να αναστρέψουν τις βλάβες (Pailas et al., 2022).

Πράγματι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, ήδη από τη δεκαετία του 80', ότι τα ωάρια έχουν την ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί, η αποτελεσματικότητά τους και οι χρόνοι απόκρισης βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση (Pailas et al., 2022). Επιπρόσθετα φαίνεται πως τα ωοκύτταρα, των οποίων η ωρίμανση έχει διακοπεί στο στάδιο GV λόγω ανίχνευσης βλάβης στο DNA, διαθέτουν υψηλότερο δυναμικό επιδιόρθωσης σε σύγκριση με τα ωοκύτταρα που βρίσκονται στα στάδια MI και MII (Brazill and Masui, 1978; Masui and Pedersen, 1975; Pedersen and Mangia, 1978). Δεδομένα από πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των αρχικών μελετών, ερμηνεύοντας με σύγχρονες μοριακές μεθόδους τις αρχικές παρατηρήσεις. Μέσω της τεχνολογίας της ομικής (OMICs) και πιο συγκεκριμένα μέσω πρωτεομικής ανάλυσης (proteomics) στα ωοκύτταρα έχουν αναγνωρισθεί περισσότεροι από 40 παράγοντες που εμπλέκονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, συμπεριλαμβανομένων των NER, HR και NHEJ (Wang et al., 2010). Αντίστοιχα δεδομένα παρουσιάζονται και από μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μεταγραφώματος (transcriptomics) σε ωοκύτταρα, όπου και ταυτοποιήθηκαν εκατοντάδες μεταγράφα που κωδικοποιούν πολυάριθμους παράγοντες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA (Hamatani et al., 2004; Su et al., 2007; Yu et al., 2020). Ωστόσο, σημαντικά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα αναφορικά με τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση της γενετικής πληροφορίας παρουσία βλάβης στο DNA, δεδομένου πως τα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα είναι μεταγραφικά ανενεργά, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους, η οποία δύνανται να διαταραχθεί από πολυάριθμους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Απάντηση σε αυτό το πολύ σημαντικό ερώτημα δίνουν πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν το εξής μοντέλο. Τα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα είναι εξοπλισμένα με έναν μεγάλο αριθμό μεταγράφων, η δράση των οποίων ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Πιο συγκεκριμένα, τα ωοκύτταρα φαίνεται πως παρουσιάζουν μια εξαιρετική δυναμική τροποποίησης του δυναμικού των πολυάριθμων ριβοσωμάτων τους, σε συνδυασμό με την ύπαρξη μίας πλειάδας ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης, όπως microRNAs και άλλων non-coding RNAs. Οι πολύπλοκοι αυτοί μοριακοί μηχανισμοί επιτρέπουν στα ωοκύτταρα ανά πάσα στιγμή να ελέγχουν την έκφραση αυτής της πλειάδας mRNAs που ήδη διαθέτουν, εφόσον δεν μπορούν να μεταγράψουν νέα mRNAs. Το πρότυπο αυτό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης φαίνεται πως ισχύει έως και το στάδιο της αυλάκωσης των εμβρύων (cleavage

stage), όπου και ξεκινά το πρώτο μεγάλο κύμα ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος (major embryo genome activation, mEGA) (Conti and Franciosi, 2018; Tulay et al., 2015).

Εστιάζοντας στην επιδιόρθωση του DNA και πιο συγκεκριμένα των DSBs που αποτελούν και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες ερευνητικές προσεγγίσεις για τη διερεύνηση της επιδιορθωτικής ικανότητας των ωοκυττάρων, οι οποίες βασίζονται στη μελέτη της επιστράτευσης στο χώρο και το χρόνο της ιστόνης γ H2AX και στην ανάλυση του κατακερματισμού του DNA (comet assay) (Pailas et al., 2022). Η πλειονότητα των βιβλιογραφικών δεδομένων καταλήγει στο συμπέρασμα πως η επιδιόρθωση των DSBs στα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του μηχανισμού HR. Αυτό είναι λογικό καθώς στα ωοκύτταρα σταδίου GV, που η ωρίμανση έχει ανασταλεί στη πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, έχει γίνει ήδη ο διπλασιασμός του DNA και οι αδερφές χρωματίδες είναι προσκολλημένες η μία στην άλλη (Stringer et al., 2018). Τα στοιχεία, που υποστηρίζουν την άμεση εμπλοκή του μηχανισμού HR στην επιδιόρθωση των DSBs στα ωοκύτταρα, προέρχονται από μελέτες, όπου ως μοντέλο χρησιμοποιήσαν ωοκύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε γενοτοξικούς παράγοντες, όπως είναι η ετοποσίδη. Πιο αναλυτικά, σε GV ωοκύτταρα ποντικών, τα οποία εκτέθηκαν σε ετοποσίδη και στα οποία έλλειπε ο παράγοντας Ooep, ο οποίος είναι ρυθμιστής του παράγοντα Rad51 και του συμπλόκου ATM, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επιδιόρθωση των DSBs, συμπέρασμα που εξήχθη με βάση τον συνεχή έντονο φθορισμό της ιστόνης γ H2AX στα σημεία της βλάβης (He et al., 2018). Ανάλογη αδυναμία επιδιόρθωσης των DSBs κατέδειξε και μία ακόμα μελέτη, όπου ωοκύτταρα μετά τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) εκτέθηκαν σε ετοποσίδη, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε καταστολή του παράγοντα Rad51 με τη χρήση του αναστολέα του RI-1. Στην ίδια μελέτη προτείνεται ένας εξαρτώμενος από τον παράγοντα Rad51 μηχανισμός επιδιόρθωσης των DSBs στα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα του ποντικού, καθώς ο παράγοντας Rad51 φαίνεται πως συνεντοπίζεται μαζί με την ιστόνη γ H2AX στα σημεία της βλάβης (Ma et al., 2019). Εκτός από τον παράγοντα Rad51 και το μονοπάτι HR, τα οποία φαίνεται πως αποτελούν τους κεντρικούς ρυθμιστές επιδιόρθωσης των DSBs στα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα, έχουν προταθεί και άλλοι ενδιαφέροντες μηχανισμοί. Σε ωοκύτταρα ποντικού σταδίου GV έχει δειχθεί πως και ο εξαρτώμενος από το NHEJ μηχανισμός συμμετέχει στην επιδιόρθωση και μάλιστα η δραστηριότητά του

αυξάνεται από την μελατονίνη (Leem et al., 2019). Μία ακόμα ενδιαφέρουσα υπόθεση εμπλέκει τα ινίδια της ακτίνης στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στην παρατήρηση πως, παρουσία βλάβης στο DNA των ωοκυττάρων, τα κοκκιώδη κύτταρα της ακτινωτής στεφάνου επάγουν την σύνθεση πυρηνικών ινιδίων ακτίνης στα ωοκύτταρα, τα οποία είναι γνωστό πως εμπλέκονται στους μηχανισμούς απόκρισης σε βλάβες του DNA (Hurst et al., 2019; Sun et al., 2017). Ο μηχανισμός αυτός υποστηρίζεται και από το γεγονός πως η πρωτεΐνη ακτίνης των πυρηνίσκων, JMY, μετατοπίζεται στον πυρήνα μετά από επαγόμενη από την ετοποσίδη βλάβη στο DNA των ωοκυττάρων (Z. Lin et al., 2014). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η δυναμική των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στα ωοκύτταρα περιορίζεται σημαντικά με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας και αυτό έχει δειχθεί σε μελέτες τόσο σε ζωικά μοντέλα, όσο και στον άνθρωπο. Αυτό ως επί των πλείστων οφείλεται σε μείωση της έκφρασης σημαντικών πρωτεϊνών-ρυθμιστών των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, όπως είναι τα στοιχεία του συμπλόκου ATM, ο παράγοντας Rad51, ο Mre11 και ο BRCA1. Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά, με αυτά που περιεγράφηκαν παραπάνω αναφορικά με την επίδραση της ηλικίας στην ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου, φαίνεται πως με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας όχι μόνο αυξάνεται η συχνότητα των μεταλλάξεων, αλλά μειώνεται σημαντικά τόσο η ευαισθησία των μηχανισμών ελέγχου, όσο και η αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Astbury et al., 2020; Pailas et al., 2022; Titus et al., 2013).

Αναφορικά με την δυναμική των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA στα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα, μελέτες δείχνουν πως σε χρονικό διάστημα 10 ωρών μετά την πρόκληση βλάβης με ετοποσίδη σε GV-arrested ωοκύτταρα, τα επίπεδα της έντασης του φθορισμού της ιστόνης γH2AX μειώνονται προοδευτικά, κάτι που δείχνει επιδιόρθωση της βλάβης τουλάχιστον σε έναν βαθμό (Collins et al., 2015). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και από μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν άλλες μέθοδοι πρόκλησης βλάβης στο DNA, καθώς και άλλες τεχνικές ανάλυσης της επιδιορθωτικής ικανότητας των ωοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση της τεχνικής comet assay παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων κατακερματισμού του DNA σε ωοκύτταρα που προηγουμένως είχαν επωαστεί με τον γενετοξικό παράγοντα δοξορουβικίνη (doxorubicin) (Kujjo et al., 2010). Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες, στις οποίες καταδεικνύεται η ικανότητα των ωοκυττάρων να επιδιορθώνουν DSBs προκαλούμενα από

την επίδραση γ-ακτινοβολίας. Αν και η γ-ακτινοβολία προκαλεί συνήθως άμεσα επαγωγή της απόπτωσης, όταν αυτή αναστέλλεται, τότε τα ωοκύτταρα, των οποίων η ωρίμανση έχει ανασταλεί στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, μπορούν επιτυχώς να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA μέσω του συμπλόκου ATM, της φωσφορυλίωσης της ιστόνης γH2AX και του παράγοντα RAD51, ο οποίος επιστρατεύεται στα σημεία της βλάβης (Stringer et al., 2020).

Τα συμπεράσματα των παραπάνω μελετών, που αφορούν κυρίως πειράματα σε ωοκύτταρα ζωικών μοντέλων, επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, στην οποία διερευνήθηκαν ανθρώπινα GV ωοκύτταρα. Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε πως μετά την πάροδο της εικοσιτετράωρης καλλιέργειας, ο εκπεμπόμενος φθορισμός της ιστόνης γH2AX μειώθηκε σημαντικά σε GV-arrested ωοκύτταρα που είχαν εκτεθεί σε συγκέντρωση ετοποσίδης 20 μg/ml για μία ώρα. Ο φθορισμός της ιστόνης γH2AX των ωοκυττάρων που μετά την καλλιέργεια παρέμειναν στο στάδιο GV ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο φθορισμό που εξέπεμπαν GV ωοκύτταρα που μονιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την επώασή τους σε ετοποσίδα και στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με τον φθορισμό που εξέπεμπαν ωοκύτταρα που μετά την καλλιέργεια παρέμειναν στο στάδιο GV, χωρίς όμως να έχουν εκτεθεί σε ετοποσίδα (control group). Τα δεδομένα αυτά ερμηνεύονται ως εξής: τα ανθρώπινα GV-arrested ωοκύτταρα παρουσιάζουν επιδιορθωτική ικανότητα, η οποία όμως είναι περιορισμένη, καθώς ο εκπεμπόμενος φθορισμός της ιστόνης γH2AX από τα GV-arrested ωοκύτταρα που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ετοποσίδα είναι υψηλότερος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το μοντέλο της περιορισμένης δυναμικής των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA στα ωοκύτταρα φαίνεται πως υποστηρίζεται σήμερα από την επιστημονική κοινότητα (Pailas et al., 2022). Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσπάθεια διερεύνησης του εάν και κατά πόσον τα ωοκύτταρα που πέτυχαν *in vitro* ωρίμανση έως τα στάδια MI και MII και είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε ετοποσίδα, είχαν καταφέρει να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA ή όχι. Ωστόσο, λόγω τεχνικών δυσκολιών στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοφθορισμού της ιστόνης γH2AX στα στάδια αυτά, δεν μπόρεσαν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα και αυτό αποτελεί και το μεγαλύτερο περιορισμό της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ως εκ τούτου απαιτούνται πρόσθετες μελέτες, ώστε να διερευνηθεί σε βάθος το σημαντικό αυτό ερώτημα.

Τέλος, αξίζει να γίνει αναφορά σε μία σημαντική παρατήρηση που εξ όσων γνωρίζουμε παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία μέσω της παρούσας διατριβής. Η παρατήρηση αυτή αφορά την πιθανή επίδραση της βλάβης στο DNA στη μορφολογία των ωοκυττάρων. Πιο αναλυτικά, η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ωαρίων που φέρουν μη φυσιολογικές μορφολογίες έπειτα από έκθεση σε ετοποσίδη. Μάλιστα, το ποσοστό αυτό ήταν αυξημένο, ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης που εν τέλει πέτυχαν τα ωοκύτταρα μετά την εικοσιτετράωρη *in vitro* καλλιέργεια. Τα υψηλότερα ποσοστά μη φυσιολογικής μορφολογίας παρατηρήθηκαν στα ωοκύτταρα που παρέμειναν στο στάδιο GV, ωστόσο και τα MII ωάρια, που στο στάδιο GV εκτέθηκαν σε ετοποσίδη, παρουσίασαν σε υψηλότερο ποσοστό μη φυσιολογικά μορφολογικά πρότυπα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ωάρια της ομάδας ελέγχου. Αν και τα δεδομένα αυτά δεν επιβεβαιώνονται από τα λιγιστά στοιχεία που έχουμε έως σήμερα διαθέσιμα, αξίζει να σημειωθεί πως αυτή είναι μία από τις μεγαλύτερες, σε αριθμό ανθρώπινων ωοκυττάρων, μελέτες όπου διερευνήθηκε η επίδραση της βλάβης στο DNA στη μορφολογία των ωοκυττάρων μέσω εξελιγμένων συστημάτων time-lapse (Rémillard-Labrosse et al., 2020). Αν και η μοριακή βάση της παρατήρησης αυτής δεν διερευνήθηκε, μπορούμε να σχηματίσουμε μία υπόθεση, βασιζόμενοι στην κυρίαρχη μη φυσιολογική παράμετρο που εντοπίστηκε και στις γνώσεις που έχουν παρατεθεί αναφορικά με τους μηχανισμούς απόκρισης των ωοκυττάρων στις βλάβες του DNA. Πιο αναλυτικά, μεταξύ των μη φυσιολογικών μορφολογικών παραμέτρων που παρατηρήθηκαν κυριάρχησε το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (granular cytoplasm). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα υποδηλώνει έντονη δραστηριότητα των ριβοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων, κάτι που παρατηρείται σε καταστάσεις κυτταρικού stress, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και οι συνθήκες γονιδιωματικής αστάθειας που δημιουργούνται παρουσία βλάβης στο DNA (Kumari and Jat, 2021; Reader et al., 2017). Στο μοντέλο αυτό, οι βλάβες στο DNA επάγουν την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης, η δράση των οποίων ρυθμίζεται από μετάγραφα, τα οποία στα ωοκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στα ριβοσώματα (Conti and Franciosi, 2018). Ως εκ τούτου η δραστηριότητα των ριβοσωμάτων επάγεται εντόνως, κάτι που μορφολογικά αποτυπώνεται με αύξηση της κοκκίωσης στο κυτταρόπλασμα. Το μοντέλο αυτό είναι θεωρητικό και ως εκ τούτου απαιτούνται μελέτες ώστε να απορρίψουν ή να αποδεχτούν την ισχύ του. Ωστόσο, τα δεδομένα της μελέτης που δείχνουν πως τα

ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA τύπου DSBs είναι πιο πιθανό να παρουσιάζουν μη φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ακόμα και εάν επιτύχουν ωρίμανση έως το στάδιο MII, έχουν ύψιστη σημασία και στο επίπεδο της κλινικής έρευνας. Εάν αποδειχθεί η ισχύς των παρατηρήσεων αυτών, τότε είναι πιθανών μέσω της ενδεδειγμένης ανάλυσης των μορφοκινητικών δεδομένων κατά την *in vitro* ανάπτυξη των ωοκυττάρων να διαθέτουμε έναν ευαίσθητο βιοδείκτη της πιθανής παρουσίας βλαβών στο DNA.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμφωνούν με την πλειονότητα των βιβλιογραφικών δεδομένων και δείχνουν πως πλήρως ανεπτυγμένα ανθρώπινα ωοκύτταρα σταδίου GV που φέρουν βλάβες στο DNA τους μπορούν να ολοκληρώσουν επιτυχώς την ωρίμανσή τους έως και το στάδιο MII. Αυτό οφείλεται στην χαμηλή ευαισθησία των σημείων ελέγχου για βλάβες του DNA κατά τη μείωση, οι οποίοι προκαλούν αναστολή της ωρίμανσης όταν οι βλάβες είναι εκτεταμένες, χωρίς να ισχύει το ίδιο σε λιγότερο εκτεταμένες βλάβες, οι οποίες όμως εν δυνάμει μπορούν να προκαλέσουν γονιδιωματική αστάθεια, επηρεάζοντας δυσμενώς το δυναμικό ανάπτυξης των ωαρίων, καθώς και την μετέπειτα εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αναφορικά με την επιδιορθωτική ικανότητα των ωοκυττάρων, αυτή διαπιστώνουμε πως δεν είναι ολική. Η επιδιόρθωση της βλάβης δεν είναι συνθήκη ούτε αναγκαία, ούτε ικανή για την συνέχιση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, κάτι που σημαίνει πως πλήρως ώριμα ωάρια σταδίου MII μπορούν να φέρουν βλάβες στο DNA. Επίσης, φαίνεται πως τα ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA είναι πιο πιθανό να παρουσιάζουν μη φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ακόμα και εάν επιτύχουν ωρίμανση έως το στάδιο MII. Ωστόσο η παρατήρηση αυτή πρέπει να διερευνηθεί προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η απόκριση των ωοκυττάρων του ανθρώπου σε βλάβες στο DNA, τόσο σε μοριακό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Σε επίπεδο μεταφραστικής έρευνας, μελέτες που θα εστιάσουν στην διερεύνηση του “αποτυπώματος” που αφήνουν ωοκύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA στα καλλιεργητικά υλικά, στο πλαίσιο της *in vitro* ωρίμανσης, θα συνεισφέρουν σημαντικά τόσο για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών αξιολόγησης της ποιότητας και του δυναμικού των ωοκυττάρων, όσο και για την βελτιστοποίηση των συστημάτων *in vitro* ωρίμανσης. Οι τεχνολογίες των “OMICs” αναμένεται να φέρουν επανάσταση στο πεδίο

αυτό. Στο ίδιο πλαίσιο, η ενδεδειγμένη αξιολόγηση των μορφοκινητικών δεδομένων, η συσχέτιση αυτών με τις βλάβες στο DNA, με τα δεδομένα από τις αναλύσεις των “OMICs” και τα δεδομένα από το ατομικό ιατρικό ιστορικό και η συν-αξιολόγηση όλων αυτών με συστήματα τεχνητής νοημοσύνης (artificial intelligence, AI) και μηχανικής μάθησης (machine learning, ML), αποτελούν μελλοντικούς ερευνητικούς στόχους με απώτερο και κορυφαίο σκοπό την εξατομικευμένη ιατρική (personalized medicine) και την ιατρική ακριβείας (precision medicine) στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Acuna-Hidalgo, R., Veltman, J.A., Hoischen, A., 2016. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol.* 17, 241. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1110-1>
2. Agarwal, A., Durairajanayagam, D., du Plessis, S.S., 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 12, 112. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>
3. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R., 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod. Biomed. Online* 11, 641–650. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61174-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61174-1)
4. Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86, 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.088>
5. al-Khodairy, F., Carr, A.M., 1992. DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 11, 1343–1350.
6. al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J., Lehmann, A.R., Carr, A.M., 1994. Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 147–160. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.2.147>
7. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. An Overview of the Cell Cycle. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed.
8. Allahbadia, G.N., 2017. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *J. Obstet. Gynaecol. India* 67, 385–392. <https://doi.org/10.1007/s13224-017-1060-x>
9. Alper, M.M., Fauser, B.C., 2017. Ovarian stimulation protocols for IVF: is more better than less? *Reprod. Biomed. Online* 34, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.010>
10. Antczak, M., Van Blerkom, J., Clark, A., 1997. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 2226–2234. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.10.2226>

11. Aparicio-Ruiz, B., Romany, L., Meseguer, M., 2018. Selection of preimplantation embryos using time-lapse microscopy in in vitro fertilization: State of the technology and future directions. *Birth Defects Res.* 110, 648–653. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1226>
12. Arce, J.-C., Andersen, A.N., Fernández-Sánchez, M., Visnova, H., Bosch, E., García-Velasco, J.A., Barri, P., de Sutter, P., Klein, B.M., Fauser, B.C.J.M., 2014. Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone: a randomized, antimüllerian hormone-stratified, dose-response trial in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 102, 1633-1640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.013>
13. Armstrong, S., Vail, A., Mastenbroek, S., Jordan, V., Farquhar, C., 2015. Time-lapse in the IVF-lab: how should we assess potential benefit? *Hum. Reprod.* 30, 3–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu250>
14. Ashwood-Smith, M.J., Edwards, R.G., 1996. DNA repair by oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 46–51. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.1.46>
15. Astbury, P., Subramanian, G.N., Greaney, J., Roling, C., Irving, J., Homer, H.A., 2020. The Presence of Immature GV- Stage Oocytes during IVF/ICSI Is a Marker of Poor Oocyte Quality: A Pilot Study. *Med. Sci. Basel Switz.* 8, E4. <https://doi.org/10.3390/medsci8010004>
16. Baart, E., Martini, E., Eijkemans, M., Van Opstal, D., Beckers, N., Verhoeff, A., Macklon, N., Fauser, B., 2007. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 980-988. <https://doi.org/10.1093/humrep/del484>
17. Baerwald, A.R., Adams, G.P., Pierson, R.A., 2012. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum. Reprod. Update* 18, 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
18. Baker, T.G., Franchi, L.L., 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2, 213–224.
19. Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., Coutifaris, C., 2002. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 77, 1148–1155. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03112-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03112-6)

20. Barnum, K.J., O'Connell, M.J., 2014. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
21. Bedaiwy, M.A., Sharma, R.K., Alhussaini, T.K., Mohamed, M.S., Abdel-Aleem, A.M., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A., 2003. The use of novel semen quality scores to predict pregnancy in couples with male-factor infertility undergoing intrauterine insemination. *J. Androl.* 24, 353–360. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02682.x>
22. Behrman, H.R., Kodaman, P.H., Preston, S.L., Gao, S., 2001. Oxidative stress and the ovary. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, S40-42. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(00\)00106-4](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(00)00106-4)
23. Benksim, A., Elkhoudri, N., Ait Addi, R., Baali, A., Cherkaoui, M., 2018. Difference between Primary and Secondary Infertility in Morocco: Frequencies and Associated Factors. *Int. J. Fertil. Steril.* 12, 142–146. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2018.5188>
24. Ben-Nagi, J., Miell, J., Yazbek, J., Holland, T., Jurkovic, D., 2009. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reprod. Biomed. Online* 19, 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.06.011>
25. Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
26. Bhandari, H.M., Choudhary, M.K., Stewart, J.A., 2018. An overview of assisted reproductive technology procedures. *Obstet. Gynaecol.* 20, 167–176. <https://doi.org/10.1111/tog.12509>
27. Biggers, J.D., Summers, M.C., 2008. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil. Steril.* 90, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.010>
28. Bleuyard, J.-Y., Gallego, M.E., White, C.I., 2006. Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.08.017>
29. Blow, J.J., Tanaka, T.U., 2005. The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. *EMBO Rep.* 6, 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400557>

30. Bodri, D., Guillén, J.J., Polo, A., Trullenque, M., Esteve, C., Coll, O., 2008. Complications related to ovarian stimulation and oocyte retrieval in 4052 oocyte donor cycles. *Reprod. Biomed. Online* 17, 237–243. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60200-3](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60200-3)
31. Bongaarts, J., 2015. Global fertility and population trends. *Semin. Reprod. Med.* 33, 5–10. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395272>
32. Boroviak, T., Stirparo, G.G., Dietmann, S., Hernando-Herraez, I., Mohammed, H., Reik, W., Smith, A., Sasaki, E., Nichols, J., Bertone, P., 2018. Single cell transcriptome analysis of human, marmoset and mouse embryos reveals common and divergent features of preimplantation development. *Dev. Camb. Engl.* 145, dev167833. <https://doi.org/10.1242/dev.167833>
33. Boulet, S.L., Mehta, A., Kissin, D.M., Warner, L., Kawwass, J.F., Jamieson, D.J., 2015. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. *JAMA* 313, 255–263. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.17985>
34. Bradshaw, J., Jung, T., Fulka, J., Moor, R.M., 1995. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 503–512. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410413>
35. Branigan, E.F., Estes, M.A., Muller, C.H., 1999. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil. Steril.* 71, 547–551. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00503-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00503-2)
36. Brazill, J.L., Masui, Y., 1978. Changing levels of uv light and carcinogen-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation. *Exp. Cell Res.* 112, 121–125. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(78\)90532-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(78)90532-3)
37. Breuer, C., Ishida, T., Sugimoto, K., 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.10.006>
38. Brighton, P.J., Maruyama, Y., Fishwick, K., Vrljicak, P., Tewary, S., Fujihara, R., Muter, J., Lucas, E.S., Yamada, T., Woods, L., Lucciola, R., Hou Lee, Y., Takeda, S., Ott, S., Hemberger, M., Quenby, S., Brosens, J.J., 2017. Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *eLife* 6, e31274. <https://doi.org/10.7554/eLife.31274>

39. Brosens, J.J., Hayashi, N., White, J.O., 1999. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140, 4809–4820. <https://doi.org/10.1210/endo.140.10.7070>
40. Brunet, S., Verlhac, M.H., 2011. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum. Reprod. Update* 17, 68–75. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq044>
41. Buckland, R.J., Watt, D.L., Chittoor, B., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., Chabes, A., 2014. Increased and imbalanced dNTP pools symmetrically promote both leading and lagging strand replication infidelity. *PLoS Genet.* 10, e1004846. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004846>
42. Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M.A., 2007. The management of DNA double-strand breaks in mitotic G2, and in mammalian meiosis viewed from a mitotic G2 perspective. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 29, 974–986. <https://doi.org/10.1002/bies.20639>
43. Caldwell, B.V., Auletta, F.J., Speroff, L., 1973. Prostaglandins in the control of ovulation, corpus luteum function, and parturition. *J. Reprod. Med.* 10, 133–138.
44. Campo, R., Binda, M.M., Van Kerkhoven, G., Frederickx, V., Serneels, A., Roziers, P., Lopes, A.S., Gordts, S., Puttemans, P., Gordts, S., 2010. Critical reappraisal of embryo quality as a predictive parameter for pregnancy outcome: a pilot study. *Facts Views Vis. ObGyn* 2, 289–295.
45. Caperton, L., Murphey, P., Yamazaki, Y., McMahan, C.A., Walter, C.A., Yanagimachi, R., McCarrey, J.R., 2007. Assisted reproductive technologies do not alter mutation frequency or spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5085–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611642104>
46. Carbone, M.C., Tatone, C., Delle Monache, S., Marci, R., Caserta, D., Colonna, R., Amicarelli, F., 2003. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 639–643. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag090>
47. Carvajal, L.A., Hamard, P.-J., Tonnessen, C., Manfredi, J.J., 2012. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev.* 26, 1533–1545. <https://doi.org/10.1101/gad.184911.111>

48. Carvajal, L.A., Manfredi, J.J., 2013. Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* 14, 414–421. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.25>
49. Chan, K., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., 2013. The choice of nucleotide inserted opposite abasic sites formed within chromosomal DNA reveals the polymerase activities participating in translesion DNA synthesis. *DNA Repair* 12, 878–889. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.07.008>
50. Chandra, V., Bortnick, A., Murre, C., 2015. AID targeting: old mysteries and new challenges. *Trends Immunol.* 36, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.07.003>
51. Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
52. Chatterjee, N., Lin, Y., Wilson, J.H., 2016. Mismatch repair enhances convergent transcription-induced cell death at trinucleotide repeats by activating ATR. *DNA Repair* 42, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.03.016>
53. Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
54. Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., 2018. Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Front. Endocrinol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00327>
55. Cohen, P.E., Pollack, S.E., Pollard, J.W., 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr. Rev.* 27, 398–426. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0017>
56. Collins, J.K., Jones, K.T., 2016. DNA damage responses in mammalian oocytes. *Reprod. Camb. Engl.* 152, R15-22. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0069>
57. Collins, J.K., Lane, S.I.R., Merriman, J.A., Jones, K.T., 2015. DNA damage induces a meiotic arrest in mouse oocytes mediated by the spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun.* 6, 8553. <https://doi.org/10.1038/ncomms9553>

58. Conaghan, J., Chen, A.A., Willman, S.P., Ivani, K., Chenette, P.E., Boostanfar, R., Baker, V.L., Adamson, G.D., Abusief, M.E., Gvakharia, M., Loewke, K.E., Shen, S., 2013. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil. Steril.* 100, 412-419.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.021>
59. Conti, M., Franciosi, F., 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum. Reprod. Update* 24, 245–266. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>
60. Corner, G.W., Allen, W.M., 2005. Physiology of the corpus luteum. 1929. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 1574; discussion 1575. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.116>
61. Critchley, H.O., Jones, R.L., Lea, R.G., Drudy, T.A., Kelly, R.W., Williams, A.R., Baird, D.T., 1999. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 240–248. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.1.5380>
62. Critchley, H.O.D., Maybin, J.A., Armstrong, G.M., Williams, A.R.W., 2020. Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation. *Physiol. Rev.* 100, 1149–1179. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2019>
63. Crosby, M.E., 2007. Cell Cycle: Principles of Control. *Yale J. Biol. Med.* 80, 141–142.
64. Crosignani, P.G., Colombo, M., Vegetti, W., Somigliana, E., Gessati, A., Ragni, G., 2003. Overweight and obese anovulatory patients with polycystic ovaries: parallel improvements in anthropometric indices, ovarian physiology and fertility rate induced by diet. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 1928–1932. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg367>
65. Cross, F.R., 1988. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4675–4684.
66. Csapo, A.I., Pulkkinen, M., 1978. Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstet. Gynecol. Surv.* 33, 69–81. <https://doi.org/10.1097/00006254-197802000-00001>

67. Csapo, A.I., Resch, B., 1979. Prevention of implantation by antiprogestosterone. *J. Steroid Biochem.* 11, 963–969. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90039-6)
68. d’Ischia, M., Napolitano, A., Manini, P., Panzella, L., 2011. Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 2071–2092. <https://doi.org/10.1021/tx2003118>
69. De Bont, R., van Larebeke, N., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169–185. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh025>
70. De Felici, M., 2010. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 632–636. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq006>
71. De Los Santos, C., Chang, C.-W., Mycek, M.-A., Cardullo, R.A., 2015. FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 587–604. <https://doi.org/10.1002/mrd.22501>
72. den Elzen, N., Kosoy, A., Christopoulos, H., O’Connell, M.J., 2004. Resisting arrest: recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of Chk1 by PP1. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 529–533.
73. den Elzen, N.R., O’Connell, M.J., 2004. Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J.* 23, 908–918. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600105>
74. Dewailly, D., 2016. Diagnostic criteria for PCOS: Is there a need for a rethink? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 37, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.03.009>
75. Dewailly, D., Andersen, C.Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T.W., La Marca, A., Lambalk, C., Mason, H., Nelson, S.M., Visser, J.A., Wallace, W.H., Anderson, R.A., 2014. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum. Reprod. Update* 20, 370–385. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt062>

76. Diagnosis and Management of Ovarian Disorders - 2nd Edition [WWW Document], n.d. URL <https://www.elsevier.com/books/diagnosis-and-management-of-ovarian-disorders/altchek/978-0-12-053642-9> (accessed 7.22.21).
77. Dieamant, F., Petersen, C.G., Mauri, A.L., Comar, V., Mattila, M., Vagnini, L.D., Renzi, A., Petersen, B., Ricci, J., Oliveira, J.B.A., Baruffi, R.L.R., Franco Jr., J.G., 2017. Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist. Reprod.* 21, 240–246. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170045>
78. Diedrich, K., Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., Griesinger, G., Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group, 2007. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum. Reprod. Update* 13, 365–377. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm011>
79. Ding, Z.-M., Zhang, S.-X., Jiao, X.-F., Hua, L.-P., Ahmad, M.J., Wu, D., Chen, F., Wang, Y.-S., Zhang, X.-Y., Meng, F., Duan, Z.-Q., Miao, Y.-L., Huo, L.-J., 2019. Doxorubicin exposure affects oocyte meiotic maturation through DNA damage induced meiotic arrest. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* kfz161. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz161>
80. Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531–535. <https://doi.org/10.1038/383531a0>
81. du Plessis, S.S., Makker, K., Desai, N.R., Agarwal, A., 2008. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 3, 539–554. <https://doi.org/10.1586/17474108.3.4.539>
82. Dun, E.C., Nezhat, C.H., 2012. Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 39, 551–566. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2012.09.006>
83. Dunn, C.L., Kelly, R.W., Critchley, H.O.D., 2003. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod. Biomed. Online* 7, 151–161. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61745-2](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61745-2)

84. Dyer, S., Chambers, G.M., de Mouzon, J., Nygren, K.G., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., Adamson, G.D., 2016. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 31, 1588–1609. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew082>
85. Edgar, B.A., Lehner, C.F., 1996. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 274, 1646–1652. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1646>
86. Eijkemans, M.J.C., van Poppel, F., Habbema, D.F., Smith, K.R., Leridon, H., te Velde, E.R., 2014. Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29, 1304–1312. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu056>
87. Enoch, T., Carr, A.M., Nurse, P., 1992. Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev.* 6, 2035–2046. <https://doi.org/10.1101/gad.6.11.2035>
88. Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., Giwercman, A., 2006. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl.* 8, 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>
89. Errico, A., Costanzo, V., 2012. Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 222–235. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.655374>
90. Espey, L.L., 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 233–238. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.233>
91. Esteves, S.C., Roque, M., Bedoschi, G., Haahr, T., Humaidan, P., 2018. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat. Rev. Urol.* 15, 535–562. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0051-8>
92. Fatemi, H.M., Blockeel, C., Devroey, P., 2012. Ovarian stimulation: today and tomorrow. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 392–397. <https://doi.org/10.2174/138920112799362007>

93. Fatemi, H.M., Doody, K., Griesinger, G., Witjes, H., Mannaerts, B., 2013. High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 442–452. <https://doi.org/10.1093/humrep/des389>
94. Fauser, B.C.J.M., Nargund, G., Andersen, A.N., Norman, R., Tarlatzis, B., Boivin, J., Ledger, W., 2010. Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 2678–2684. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq247>
95. Finn, C.A., 1996. Why do women menstruate? Historical and evolutionary review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 70, 3–8. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(96\)02565-1](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(96)02565-1)
96. Finn, C.A., 1986. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 61, 313–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1986.tb00657.x>
97. Foster, D.A., Yellen, P., Xu, L., Saqcena, M., 2010. Regulation of G1 Cell Cycle Progression. *Genes Cancer* 1, 1124–1131. <https://doi.org/10.1177/1947601910392989>
98. Fox, D.T., Duronio, R.J., 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3–12. <https://doi.org/10.1242/dev.080531>
99. Franks, S., 2008. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int. J. Obes.* 2005 32, 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.61>
100. Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H., Russell, P., 1999. Cdc25 Inhibited In Vivo and In Vitro by Checkpoint Kinases Cds1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell* 10, 833–845.
101. Gaide Chevronnay, H.P., Galant, C., Lemoine, P., Courtoy, P.J., Marbaix, E., Henriot, P., 2009. Spatiotemporal coupling of focal extracellular matrix degradation and reconstruction in the menstrual human endometrium. *Endocrinology* 150, 5094–5105. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0750>
102. Gallego, R.D., Remohí, J., Meseguer, M., 2019. Time-lapse imaging: the state of the art†. *Biol. Reprod.* 101, 1146–1154. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox035>

103. Gallos, I.D., Eapen, A., Price, M.J., Sunkara, S.K., Macklon, N.S., Bhattacharya, S., Khalaf, Y., Tobias, A., Deeks, J.J., Rajkhowa, M., Coomarasamy, A., 2017. Controlled ovarian stimulation protocols for assisted reproduction: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017, CD012586. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012586>
104. Gandarillas, A., Molinuevo, R., Sanz-Gómez, N., 2018. Mammalian endoreplication emerges to reveal a potential developmental timer. *Cell Death Differ.* 25, 471–476. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0040-0>
105. Gao, Z., Wyman, M.J., Sella, G., Przeworski, M., 2016. Interpreting the Dependence of Mutation Rates on Age and Time. *PLoS Biol.* 14, e1002355. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002355>
106. García-Rodríguez, A., Gosálvez, J., Agarwal, A., Roy, R., Johnston, S., 2019. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 31. <https://doi.org/10.3390/ijms20010031>
107. Gargett, C.E., Masuda, H., 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 818–834. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061>
108. Garry, R., Hart, R., Karthigasu, K.A., Burke, C., 2010. Structural changes in endometrial basal glands during menstruation. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 117, 1175–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02630.x>
109. Gatimel, N., Mansoux, L., Moreau, J., Parinaud, J., Léandri, R.D., 2017. Continued existence of significant disparities in the technical practices of sperm morphology assessment and the clinical implications: results of a French questionnaire. *Fertil. Steril.* 107, 365–372.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.038>
110. Gellersen, B., Brosens, J.J., 2014. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr. Rev.* 35, 851–905. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1045>
111. Geschwind, D.H., Flint, J., 2015. Genetics and genomics of psychiatric disease. *Science* 349, 1489–1494. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8954>
112. Gilbert, S.F., 2000. Oogenesis. *Dev. Biol.* 6th Ed.

113. Giono, L.E., Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. Cell. Physiol.* 209, 13–20. <https://doi.org/10.1002/jcp.20689>
114. Giunta, S., Belotserkovskaya, R., Jackson, S.P., 2010. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* 190, 197–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911156>
115. Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., Freundl, G., 2005. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 1144–1147. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh870>
116. Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D’Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., Jackson, S.P., 2003. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature01445>
117. Goldmann, J.M., Wong, W.S.W., Pinelli, M., Farrah, T., Bodian, D., Stittrich, A.B., Glusman, G., Vissers, L.E.L.M., Hoischen, A., Roach, J.C., Vockley, J.G., Veltman, J.A., Solomon, B.D., Gilissen, C., Niederhuber, J.E., 2016. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat. Genet.* 48, 935–939. <https://doi.org/10.1038/ng.3597>
118. Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A., 2013. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv. Genet.* 82, 1–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407676-1.00001-9>
119. Goriely, A., 2016. Decoding germline de novo point mutations. *Nat. Genet.* 48, 823–824. <https://doi.org/10.1038/ng.3629>
120. Grallert, B., Boye, E., 2008. The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 2315–2320. <https://doi.org/10.4161/cc.6389>
121. Greaney, J., Wei, Z., Homer, H., 2018. Regulation of chromosome segregation in oocytes and the cellular basis for female meiotic errors. *Hum. Reprod. Update* 24, 135–161. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx035>
122. Griswold, M.D., 2015. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.* 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>

123. Grow, D., Kawwass, J.F., Kulkarni, A.D., Durant, T., Jamieson, D.J., Macaluso, M., 2014. GnRH agonist and GnRH antagonist protocols: comparison of outcomes among good-prognosis patients using national surveillance data. *Reprod. Biomed. Online* 29, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.05.007>
124. Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménézo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175–189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
125. Gui, L., Homer, H., 2012. Spindle assembly checkpoint signalling is uncoupled from chromosomal position in mouse oocytes. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1941–1946. <https://doi.org/10.1242/dev.078352>
126. Guzick, D.S., Carson, S.A., Coutifaris, C., Overstreet, J.W., Factor-Litvak, P., Steinkampf, M.P., Hill, J.A., Mastroianni, L., Buster, J.E., Nakajima, S.T., Vogel, D.L., Canfield, R.E., 1999. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N. Engl. J. Med.* 340, 177–183. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901213400302>
127. Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., Surani, M.A., 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15–23. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00181-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00181-8)
128. Hamatani, T., Falco, G., Carter, M.G., Akutsu, H., Stagg, C.A., Sharov, A.A., Dudekula, D.B., VanBuren, V., Ko, M.S.H., 2004. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2263–2278. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh241>
129. Hambiliki, F., Sandell, P., Yaldir, F., Stavreus-Evers, A., 2011. A prospective randomized sibling-oocyte study of two media systems for culturing cleavage-stage embryos-impact on fertilization rate. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 335–341. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9518-0>
130. Hanoux, V., Pairault, C., Bakalska, M., Habert, R., Livera, G., 2007. Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. *Cell Death Differ.* 14, 671–681. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402052>

131. Harashima, H., Dissmeyer, N., Schnittger, A., 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>
132. Hart, R.J., 2016. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol. Rev.* 96, 873–909. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2015>
133. Hatirnaz, Ş., Ata, B., Hatirnaz, E.S., Dahan, M.H., Tannus, S., Tan, J., Tan, S.L., 2018. Oocyte in vitro maturation: A systematic review. *Turk. J. Obstet. Gynecol.* 15, 112–125. <https://doi.org/10.4274/tjod.23911>
134. He, D.-J., Wang, L., Zhang, Z.-B., Guo, K., Li, J.-Z., He, X.-C., Cui, Q.-H., Zheng, P., 2018. Maternal gene *Ooep* may participate in homologous recombination-mediated DNA double-strand break repair in mouse oocytes. *Zool. Res.* 39, 387–395. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.067>
135. Heijnen, E.M., Eijkemans, M.J., De Klerk, C., Polinder, S., Beckers, N.G., Klinkert, E.R., Broekmans, F.J., Passchier, J., Te Velde, E.R., Macklon, N.S., Fauser, B.C., 2007. A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* 369, 743–749. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60360-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60360-2)
136. Holesh, J.E., Bass, A.N., Lord, M., 2021. Physiology, Ovulation, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
137. Homer, H.A., McDougall, A., Levasseur, M., Yallop, K., Murdoch, A.P., Herbert, M., 2005. Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes Dev.* 19, 202–207. <https://doi.org/10.1101/gad.328105>
138. Homsy, J., Zaidi, S., Shen, Y., Ware, J.S., Samocha, K.E., Karczewski, K.J., DePalma, S.R., McKean, D., Wakimoto, H., Gorham, J., Jin, S.C., Deanfield, J., Giardini, A., Porter, G.A., Kim, R., Bilguvar, K., López-Giráldez, F., Tikhonova, I., Mane, S., Romano-Adesman, A., Qi, H., Vardarajan, B., Ma, L., Daly, M., Roberts, A.E., Russell, M.W., Mital, S., Newburger, J.W., Gaynor, J.W., Breitbart, R.E., Iossifov, I., Ronemus, M., Sanders, S.J., Kaltman, J.R., Seidman, J.G., Brueckner, M.,

- Gelb, B.D., Goldmuntz, E., Lifton, R.P., Seidman, C.E., Chung, W.K., 2015. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science* 350, 1262–1266. <https://doi.org/10.1126/science.aac9396>
139. Howie, R., Kay, V., 2018. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.* 2005 79, 194–199. <https://doi.org/10.12968/hmed.2018.79.4.194>
140. Huang, S.J., Chen, C.-P., Buchwalder, L., Yu, Y.-C., Piao, L., Huang, C.-Y., Schatz, F., Lockwood, C.J., 2019. Regulation of CX3CL1 Expression in Human First-Trimester Decidual Cells: Implications for Preeclampsia. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 26, 1256–1265. <https://doi.org/10.1177/1933719118815592>
141. Huarte, J., Belin, D., Vassalli, A., Strickland, S., Vassalli, J.D., 1987. Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev.* 1, 1201–1211. <https://doi.org/10.1101/gad.1.10.1201>
142. Humaidan, P., Alsbjerg, B., 2014. GnRHa trigger for final oocyte maturation: is HCG trigger history? *Reprod. Biomed. Online* 29, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.05.008>
143. Hurst, V., Shimada, K., Gasser, S.M., 2019. Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair. *Trends Cell Biol.* 29, 462–476. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.010>
144. iGenetics: A Mendelian Approach [WWW Document], n.d. URL /content/one-dot-com/one-dot-com/us/en/higher-education/program.html (accessed 10.14.20).
145. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.F.P., Yong, W.H., 2019. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
146. Inhorn, M.C., Patrizio, P., 2015. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum. Reprod. Update* 21, 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
147. Iossifov, I., O’Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., Smith, J.D., Paepker, B., Nickerson, D.A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L.E., Mandell, J.D., Mane, S.M.,

- Murtha, M.T., Sullivan, C.A., Walker, M.F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A.J., Yamrom, B., Lee, Y., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M.C., Ye, K., McCombie, W.R., Shendure, J., Eichler, E.E., State, M.W., Wigler, M., 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
148. Jabbour, H.N., Kelly, R.W., Fraser, H.M., Critchley, H.O.D., 2006. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr. Rev.* 27, 17–46. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0021>
149. Jain, T., Gupta, R.S., 2007. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection in the United States. *N. Engl. J. Med.* 357, 251–257. <https://doi.org/10.1056/NEJMs070707>
150. Jaroudi, S., Kakourou, G., Cawood, S., Doshi, A., Ranieri, D.M., Serhal, P., Harper, J.C., SenGupta, S.B., 2009. Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 2649–2655. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep224>
151. Joerger, A.C., Fersht, A.R., 2016. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014710>
152. Jones, G.S., 1991. Luteal phase defect: a review of pathophysiology. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 3, 641–648.
153. Jones, K.T., 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 1–5. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah009>
154. Jones, R.L., Kelly, R.W., Critchley, H.O., 1997. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 1300–1306. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.6.1300>
155. Jonkman, J., Brown, C.M., Wright, G.D., Anderson, K.I., North, A.J., 2020. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat. Protoc.* 15, 1585–1611. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0313-9>

156. Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breitkreutz, B.-J., Tyers, M., 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395–400. <https://doi.org/10.1126/science.1070850>
157. Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M., Szamatowicz, M., 1999. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 409–413. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.5.409>
158. Jung, D., Kee, K., 2015. Insights into female germ cell biology: from in vivo development to in vitro derivations. *Asian J. Androl.* 17, 415–420. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.148077>
159. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., European Association of Urology Working Group on Male Infertility, 2012. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur. Urol.* 62, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
160. Juul, A., Almstrup, K., Andersson, A.-M., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Main, K.M., Rajpert-De Meyts, E., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2014. Possible fetal determinants of male infertility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 553–562. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.97>
161. Kammerman, S., Ross, J., 1975. Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 546–550. <https://doi.org/10.1210/jcem-41-3-546>
162. Kara, M., Aydin, T., Aran, T., Turktekin, N., Ozdemir, B., 2013. Comparison of GnRH agonist and antagonist protocols in normoresponder patients who had IVF-ICSI. *Arch. Gynecol. Obstet.* 288, 1413–1416. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2903-z>
163. Kaser, D.J., Racowsky, C., 2014. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 20, 617–631. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu023>
164. Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, S.-Y., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu, P., Wade, J.D., Bathgate, R.A.D., Hsueh, A.J.W., 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7323–7328. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307061101>

165. Kayisli, U.A., Guzeloglu-Kayisli, O., Arici, A., 2004. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034, 50–63. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.005>
166. Khalaf, M., Mittre, H., Levallet, J., Hanoux, V., Denoual, C., Herlicoviez, M., Bonnamy, P.-J., Benhaim, A., 2010. GnRH agonist and GnRH antagonist protocols in ovarian stimulation: differential regulation pathway of aromatase expression in human granulosa cells. *Reprod. Biomed. Online* 21, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.03.017>
167. Kidder, G.M., Mhawi, A.A., 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reprod. Camb. Engl.* 123, 613–620. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230613>
168. Killander, D., Zetterberg, A., 1965a. A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* 40, 12–20. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90285-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90285-5)
169. Killander, D., Zetterberg, A., 1965b. Quantitative cytochemical studies on interphase growth: I. Determination of DNA, RNA and mass content of age determined mouse fibroblasts in vitro and of intercellular variation in generation time. *Exp. Cell Res.* 38, 272–284. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90403-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90403-9)
170. Kolano, A., Brunet, S., Silk, A.D., Cleveland, D.W., Verlhac, M.-H., 2012. Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1858-1867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204686109>
171. Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, Aslaug, Jonasdottir, Adalbjorg, Wong, W.S.W., Sigurdsson, G., Walters, G.B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Helgason, A., Magnusson, O.T., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2012. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471–475. <https://doi.org/10.1038/nature11396>
172. Koniaras, K., Cuddihy, A.R., Christopoulos, H., Hogg, A., O'Connell, M.J., 2001. Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene* 20, 7453–7463. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204942>

173. Koos, R.D., Clark, M.R., 1982. Production of 6-keto-prostaglandin F1 alpha by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 111, 1513–1518. <https://doi.org/10.1210/endo-111-5-1513>
174. Kopeika, J., Thornhill, A., Khalaf, Y., 2015. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum. Reprod. Update* 21, 209–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
175. Krisher, R.L., 2013. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 393–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103647>
176. Kujjo, L.L., Laine, T., Pereira, R.J.G., Kagawa, W., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., Perez, G.I., 2010. Enhancing survival of mouse oocytes following chemotherapy or aging by targeting Bax and Rad51. *PloS One* 5, e9204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009204>
177. Kumagai, A., Dunphy, W.G., 2000. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 6, 839–849. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(05\)00092-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00092-4)
178. Kumari, R., Jat, P., 2021. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
179. Kunkel, T.A., 2011. Balancing eukaryotic replication asymmetry with replication fidelity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.025>
180. Kunkel, T.A., 2009. Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 91–101. <https://doi.org/10.1101/sqb.2009.74.027>
181. Kunkel, T.A., 2004. DNA Replication Fidelity *. *J. Biol. Chem.* 279, 16895–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400006200>
182. Labarta, E., Bosch, E., Alamá, P., Rubio, C., Rodrigo, L., Pellicer, A., 2012. Moderate ovarian stimulation does not increase the incidence of human embryo chromosomal abnormalities in in vitro fertilization cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1987-1994. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1738>

- 183.Lai, Q., Zhang, H., Zhu, G., Li, Y., Jin, L., He, L., Zhang, Z., Yang, P., Yu, Q., Zhang, S., Xu, J.-F., Wang, C.-Y., 2013. Comparison of the GnRH agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 1903–1910.
- 184.Lambert, S., Carr, A.M., 2013. Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.009>
- 185.Lambert, S., Carr, A.M., 2005. Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie, Biological responses to DNA damage* 87, 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.020>
- 186.Lane, S.I.R., Morgan, S.L., Wu, T., Collins, J.K., Merriman, J.A., ElInati, E., Turner, J.M., Jones, K.T., 2017. DNA damage induces a kinetochore-based ATM/ATR-independent SAC arrest unique to the first meiotic division in mouse oocytes. *Dev. Camb. Engl.* 144, 3475–3486. <https://doi.org/10.1242/dev.153965>
- 187.Lane, S.I.R., Yun, Y., Jones, K.T., 2012. Timing of anaphase-promoting complex activation in mouse oocytes is predicted by microtubule-kinetochore attachment but not by bivalent alignment or tension. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1947–1955. <https://doi.org/10.1242/dev.077040>
- 188.Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., Taylor, S.S., 2012. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* 22, R966–R980. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- 189.Latif, C., Elzen, N.R. den, O’Connell, M.J., 2004. DNA damage checkpoint maintenance through sustained Chk1 activity. *J. Cell Sci.* 117, 3489–3498. <https://doi.org/10.1242/jcs.01204>
- 190.Leaver, R.B., 2016. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br. J. Nurs. Mark Allen Publ.* 25, S35–S40. <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.18.S35>
- 191.Lee, H.-S., Seo, Y.-I., Yin, X.-J., Cho, S.-G., Lee, S.-S., Kim, N.-H., Cho, S.-K., Kong, I.-K., 2007. Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 42, 561–565. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00818.x>

- 192.Lee, K., Myung, K., 2008. PCNA Modifications for Regulation of Post-Replication Repair Pathways. *Mol. Cells* 26, 5–11.
- 193.Leem, J., Bai, G.-Y., Kim, J.-S., Oh, J.S., 2019. Melatonin protects mouse oocytes from DNA damage by enhancing nonhomologous end-joining repair. *J. Pineal Res.* 67, e12603. <https://doi.org/10.1111/jpi.12603>
- 194.Leem, J., Kim, J.-S., Oh, J.S., 2018. WIP1 phosphatase suppresses the DNA damage response during G2/prophase arrest in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 99, 798–805. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y108>
- 195.Lefebvre, J., Antaki, R., Kadoch, I.-J., Dean, N.L., Sylvestre, C., Bissonnette, F., Benoit, J., Menard, S., Lapensee, L., 2015. 450 IU versus 600 IU gonadotropin for controlled ovarian stimulation in poor responders: a randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* 104, 1419–1425. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.014>
- 196.Lemmens, L., Kos, S., Beijer, C., Braat, D.D.M., Jonker, M.A., Nelen, W.L.D.M., Wetzels, A.M.M., 2018. Optimization of laboratory procedures for intrauterine insemination: survey of methods in relation to clinical outcome. *Andrology* 6, 707–713. <https://doi.org/10.1111/andr.12510>
- 197.Lemmens, L., Kos, S., Beijer, C., Braat, D.D.M., Nelen, W.L.D.M., Wetzels, A.M.M., for section semen of the Dutch Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories, 2017. Techniques used for IUI: is it time for a change? *Hum. Reprod.* 32, 1835–1845. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex223>
- 198.Lenormand, T., Engelstädter, J., Johnston, S.E., Wijnker, E., Haag, C.R., 2016. Evolutionary mysteries in meiosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 371, 20160001. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0001>
- 199.Leonard, A.C., Méchali, M., 2013. DNA Replication Origins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010116>
- 200.Li, X., Heyer, W.-D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 18, 99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- 201.Lichtman, J.W., Conchello, J.-A., 2005. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* 2, 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>

- 202.Limas, J.C., Cook, J.G., 2019. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. *FEBS Lett.* 593, 2853–2867. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13619>
- 203.Lin, F., Ma, X.-S., Wang, Z.-B., Wang, Z.-W., Luo, Y.-B., Huang, L., Jiang, Z.-Z., Hu, M.-W., Schatten, H., Sun, Q.-Y., 2014. Different fates of oocytes with DNA double-strand breaks in vitro and in vivo. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2674–2680. <https://doi.org/10.4161/15384101.2015.945375>
- 204.Lin, Z., Xu, Y.-N., Namgoong, S., Kim, N.-H., 2014. JMY functions as actin nucleation-promoting factor and mediator for p53-mediated DNA damage in porcine oocytes. *PloS One* 9, e109385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109385>
- 205.Lindahl, T., Barnes, D.E., 2000. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 127–133. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- 206.Lindsay, H.D., Griffiths, D.J.F., Edwards, R.J., Christensen, P.U., Murray, J.M., Osman, F., Walworth, N., Carr, A.M., 1998. S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 12, 382–395.
- 207.Liskay, R.M., 1977. Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1622–1625.
- 208.Lockwood, C.J., Krikun, G., Rahman, M., Caze, R., Buchwalder, L., Schatz, F., 2007. The role of decidualization in regulating endometrial hemostasis during the menstrual cycle, gestation, and in pathological states. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 111–117. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958469>
- 209.Lodish, H.F., 2000. *Molecular cell biology*. New York : W.H. Freeman.
- 210.Loeb, L.A., Monnat, R.J., 2008. DNA polymerases and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 594–604. <https://doi.org/10.1038/nrg2345>
- 211.Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P., 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 38, 259–267. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>

212. Lu, X., Nannenga, B., Donehower, L.A., 2005. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev.* 19, 1162–1174. <https://doi.org/10.1101/gad.1291305>
213. Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., Beach, D., 1991. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64, 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90266-2)
214. Lunenfeld, B., 2004. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum. Reprod. Update* 10, 453–467. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh044>
215. Lynch, M., 2010. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 961–968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912629107>
216. Ma, J.-Y., Feng, X., Tian, X.-Y., Chen, L.-N., Fan, X.-Y., Guo, L., Li, S., Yin, S., Luo, S.-M., Ou, X.-H., 2019. The repair of endo/exogenous DNA double-strand breaks and its effects on meiotic chromosome segregation in oocytes. *Hum. Mol. Genet.* 28, 3422–3430. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz156>
217. Ma, J.-Y., Li, S., Chen, L.-N., Schatten, H., Ou, X.-H., Sun, Q.-Y., 2020. Why is oocyte aneuploidy increased with maternal aging? *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 47, 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.04.003>
218. Ma, J.-Y., Ou Yang, Y.-C., Wang, Z.-W., Wang, Z.-B., Jiang, Z.-Z., Luo, S.-M., Hou, Y., Liu, Z.-H., Schatten, H., Sun, Q.-Y., 2013. The effects of DNA double-strand breaks on mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1233–1241. <https://doi.org/10.4161/cc.24311>
219. Machtiger, R., Racowsky, C., 2012. Culture systems: single step. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 912, 199–209. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-971-6_12
220. Macklon, N.S., Pieters, M.H.E.C., Hassan, M.A., Jeucken, P.H.M., Eijkemans, M.J.C., Fauser, B.C.J.M., 2002. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 2700–2705. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.10.2700>
221. Mahadevan, M., 1981. Capacitation of spermatozoa. *Acta Eur. Fertil.* 12, 329–335.

222. Mamsen, L.S., Brøchner, C.B., Byskov, A.G., Møllgard, K., 2012. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 771–778. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120202lm>
223. Mantovani, F., Collavin, L., Del Sal, G., 2019. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* 26, 199–212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>
224. Marangos, P., Carroll, J., 2012. Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. *Curr. Biol. CB* 22, 989–994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.063>
225. Marangos, P., Carroll, J., 2004. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reprod. Camb. Engl.* 128, 153–162. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00192>
226. Marangos, P., Stevense, M., Niaka, K., Lagoudaki, M., Nabti, I., Jessberger, R., Carroll, J., 2015. DNA damage-induced metaphase I arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nat. Commun.* 6, 8706. <https://doi.org/10.1038/ncomms9706>
227. Marci, R., Caserta, D., Lisi, F., Graziano, A., Soave, I., Lo Monte, G., Patella, A., Moscarini, M., 2013. In vitro fertilization stimulation protocol for normal responder patients. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 29, 109–112. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.712002>
228. Martin, J.H., Aitken, R.J., Bromfield, E.G., Nixon, B., 2019. DNA damage and repair in the female germline: contributions to ART. *Hum. Reprod. Update* 25, 180–201. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy040>
229. Martin, J.H., Bromfield, E.G., Aitken, R.J., Lord, T., Nixon, B., 2018. Double Strand Break DNA Repair occurs via Non-Homologous End-Joining in Mouse MII Oocytes. *Sci. Rep.* 8, 9685. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27892-2>
230. Martin, S.G., Berthelot-Grosjean, M., 2009. Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* 459, 852–856. <https://doi.org/10.1038/nature08054>

231. Mascarenhas, M., Balen, A.H., 2017. The high responder: a review of pathophysiology and outcomes during IVF treatment. *Hum. Fertil. Camb. Engl.* 20, 155–167. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1293851>
232. Masui, Y., Pedersen, R.A., 1975. Ultraviolet light-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation. *Nature* 257, 705–706. <https://doi.org/10.1038/257705a0>
233. Matson, J.P., Cook, J.G., 2017. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *FEBS J.* 284, 362–375. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>
234. Maugeri-Saccà, M., Bartucci, M., De Maria, R., 2013. Checkpoint kinase 1 inhibitors for potentiating systemic anticancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* 39, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.10.007>
235. Maybin, J., Critchley, H., 2009. Repair and regeneration of the human endometrium. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 4, 283–298. <https://doi.org/10.1586/eog.09.6>
236. Mayer, A., Baran, V., Sakakibara, Y., Brzakova, A., Ferencova, I., Motlik, J., Kitajima, T.S., Schultz, R.M., Solc, P., 2016. DNA damage response during mouse oocyte maturation. *Cell Cycle Georget. Tex* 15, 546–558. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1128592>
237. McGuinness, B.E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A.M., Helmhart, W., Kudo, N.R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., Nasmyth, K., 2009. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* 19, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.064>
238. McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M.D., Gould, K.L., 2011. State of the APC/C: Organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 118–136. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.541420>
239. Menezo, Y., Russo, G., Tosti, E., El Mouatassim, S., Benkhalifa, M., 2007. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 513–520. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9167-0>
240. Messinis, I.E., Messini, C.I., Dafopoulos, K., 2009. Luteal-phase endocrinology. *Reprod. Biomed. Online* 19 Suppl 4, 4314.

241. Mihajlović, A.I., FitzHarris, G., 2018. Segregating Chromosomes in the Mammalian Oocyte. *Curr. Biol. CB* 28, R895–R907. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.057>
242. Miller, D.C., Hollenbeck, B.K., Smith, G.D., Randolph, J.F., Christman, G.M., Smith, Y.R., Lebovic, D.I., Ohl, D.A., 2002. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology* 60, 497–501. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)01773-9](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01773-9)
243. Miller, O.J., Therman, E., 2001. Main Features of Meiosis, in: Miller, O.J., Therman, E. (Eds.), *Human Chromosomes*. Springer, New York, NY, pp. 125–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0139-4_9
244. Mira, A., 1998. Why is meiosis arrested? *J. Theor. Biol.* 194, 275–287. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0761>
245. Mitra, J., Schultz, R.M., 1996. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9), 2407–2415. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.9.2407>
246. Mohsen, I.A., El Din, R.E., 2013. Minimal stimulation protocol using letrozole versus microdose flare up GnRH agonist protocol in women with poor ovarian response undergoing ICSI. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 29, 105–108. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.730569>
247. Moreno, S., Nurse, P., Russell, P., 1990. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80 cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 344, 549–552. <https://doi.org/10.1038/344549a0>
248. Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., Nurse, P., 2009. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* 459, 857–860. <https://doi.org/10.1038/nature08074>
249. Motta, P.M., Makabe, S., Nottola, S.A., 1997. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum. Reprod. Update* 3, 281–295. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.3.281>

250. Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B.P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D.G., Vicini, E., 2013. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biol. Reprod.* 89, 60. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111682>
251. Musacchio, A., 2015. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.* CB 25, R1002-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.051>
252. Musacchio, A., Salmon, E.D., 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrm2163>
253. Nabel, C.S., Manning, S.A., Kohli, R.M., 2012. The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem. Biol.* 7, 20–30. <https://doi.org/10.1021/cb2002895>
254. Nachtigall, R.D., 2006. International disparities in access to infertility services. *Fertil. Steril.* 85, 871–875. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.066>
255. Nargund, G., Fauser, B.C.J.M., Macklon, N.S., Ombelet, W., Nygren, K., Frydman, R., Rotterdam ISMAAR Consensus Group on Terminology for Ovarian Stimulation for IVF, 2007. The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 2801–2804. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem285>
256. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., Futcher, A.B., 1988. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* 7, 4335–4346.
257. Nelson, L.R., Bulun, S.E., 2001. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, S116-124. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117432>
258. Nospikel, T., Hanawalt, P.C., 2002. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair* 1, 59–75. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(01\)00005-2](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(01)00005-2)
259. Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J., 2019. Reprint of: Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil. Steril.* 112, e93–e115. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.079>
260. Nurse, P., 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256, 547–551. <https://doi.org/10.1038/256547a0>

261. Nyboe Andersen, A., Nelson, S.M., Fauser, B.C.J.M., García-Velasco, J.A., Klein, B.M., Arce, J.-C., ESTHER-1 study group, 2017. Individualized versus conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization: a multicenter, randomized, controlled, assessor-blinded, phase 3 noninferiority trial. *Fertil. Steril.* 107, 387-396.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.033>
262. Oehninger, S., 2011. Poor responders in in vitro fertilization (IVF) therapy: the challenge continues. *Facts Views Vis. ObGyn* 3, 101–108.
263. Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., Devroey, P., 2008. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum. Reprod. Update* 14, 605–621. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn042>
264. Ombelet, W., Deblaere, K., Bosmans, E., Cox, A., Jacobs, P., Janssen, M., Nijs, M., 2003. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod. Biomed. Online* 7, 485–492. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61894-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61894-9)
265. O'Neill, C.L., Chow, S., Rosenwaks, Z., Palermo, G.D., 2018. Development of ICSI. *Reproduction* 156, F51–F58. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0011>
266. Ovarian Stimulation, T.E.G.G.O., Bosch, E., Broer, S., Griesinger, G., Grynberg, M., Humaidan, P., Kolibianakis, E., Kunicki, M., La Marca, A., Lainas, G., Le Clef, N., Massin, N., Mastenbroek, S., Polyzos, N., Sunkara, S.K., Timeva, T., Töyli, M., Urbancsek, J., Vermeulen, N., Broekmans, F., 2020. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Hum. Reprod. Open* 2020, hoaa009. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa009>
267. Pailas, A., Niaka, K., Zorzompokou, C., Marangos, P., 2022. The DNA Damage Response in Fully Grown Mammalian Oocytes. *Cells* 11, 798. <https://doi.org/10.3390/cells11050798>
268. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet Lond. Engl.* 340, 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-f)
269. Palermo, G.D., Neri, Q.V., Rosenwaks, Z., 2015. To ICSI or Not to ICSI. *Semin. Reprod. Med.* 33, 92–102. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546825>

270. Pamphlett, R., Morahan, J.M., Yu, B., 2011. Using case-parent trios to look for rare de novo genetic variants in adult-onset neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Methods* 197, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.02.028>
271. Paternot, G., Debrock, S., D’Hooghe, T.M., Spiessens, C., 2010. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 8, 83. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-83>
272. Paulson, R.J., Reichman, D.E., Zaninovic, N., Goodman, L.R., Racowsky, C., 2018. Time-lapse imaging: clearly useful to both laboratory personnel and patient outcomes versus just because we can doesn’t mean we should. *Fertil. Steril.* 109, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.042>
273. Pedersen, R.A., Mangia, F., 1978. Ultraviolet-light-induced unscheduled DNA synthesis by resting and growing mouse oocytes. *Mutat. Res.* 49, 425–429. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(78\)90113-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(78)90113-6)
274. Peng, G., Lin, S.-Y., 2011. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J. Clin. Oncol.* 2, 73–79. <https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i2.73>
275. Pereda, J., Zorn, T., Soto-Suazo, M., 2006. Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc. Res. Tech.* 69, 386–395. <https://doi.org/10.1002/jemt.20298>
276. Perrone, S., Lotti, F., Geronzi, U., Guidoni, E., Longini, M., Buonocore, G., 2016. Oxidative Stress in Cancer-Prone Genetic Diseases in Pediatric Age: The Role of Mitochondrial Dysfunction. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 4782426. <https://doi.org/10.1155/2016/4782426>
277. Peters, B.A., Kermani, B.G., Alferov, O., Agarwal, M.R., McElwain, M.A., Gulbahce, N., Hayden, D.M., Tang, Y.T., Zhang, R.Y., Tearle, R., Crain, B., Prates, R., Berkeley, A., Munné, S., Drmanac, R., 2015. Detection and phasing of single base de novo mutations in biopsies from human in vitro fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Res.* 25, 426–434. <https://doi.org/10.1101/gr.181255.114>

278. Potenski, C.J., Klein, H.L., 2014. How the misincorporation of ribonucleotides into genomic DNA can be both harmful and helpful to cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 10226–10234. <https://doi.org/10.1093/nar/gku773>
279. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, 2012. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 98, 1395–1399. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.026>
280. Racowsky, C., Martins, W.P., 2017. Effectiveness and safety of time-lapse imaging for embryo culture and selection: it is still too early for any conclusions? *Fertil. Steril.* 108, 450–452. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.1156>
281. Rahbari, R., Wuster, A., Lindsay, S.J., Hardwick, R.J., Alexandrov, L.B., Turki, S.A., Dominiczak, A., Morris, A., Porteous, D., Smith, B., Stratton, M.R., UK10K Consortium, Hurles, M.E., 2016. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat. Genet.* 48, 126–133. <https://doi.org/10.1038/ng.3469>
282. Reader, K.L., Stanton, J.-A.L., Juengel, J.L., 2017. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology* 6, 35. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>
283. Rémillard-Labrosse, G., Dean, N.L., Allais, A., Mihajlović, A.I., Jin, S.G., Son, W.-Y., Chung, J.-T., Pansera, M., Henderson, S., Mahfoudh, A., Steiner, N., Agapitou, K., Marangos, P., Buckett, W., Ligeti-Ruiter, J., FitzHarris, G., 2020. Human oocytes harboring damaged DNA can complete meiosis I. *Fertil. Steril.* 113, 1080-1089.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.029>
284. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
285. Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P., 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 40. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>

286. Rhind, N., Furnari, B., Russell, P., 1997. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev.* 11, 504–511. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.504>
287. Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Espey, L.L., 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131029>
288. Rieder, C.L., Cole, R.W., 1998. Entry into mitosis in vertebrate somatic cells is guarded by a chromosome damage checkpoint that reverses the cell cycle when triggered during early but not late prophase. *J. Cell Biol.* 142, 1013–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.4.1013>
289. Roberts, D.K., Parmley, T.H., Walker, N.J., Horbelt, D.V., 1992. Ultrastructure of the microvasculature in the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 1393–1406. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(92\)91611-d](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91611-d)
290. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
291. Rundle, S., Bradbury, A., Drew, Y., Curtin, N.J., 2017. Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. *Cancers* 9. <https://doi.org/10.3390/cancers9050041>
292. Santamaria, X., Mas, A., Cervelló, I., Taylor, H., Simon, C., 2018. Uterine stem cells: from basic research to advanced cell therapies. *Hum. Reprod. Update* 24, 673–693. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy028>
293. Scarica, C., Ubaldi, F., Orlando, G., Dovere, L., Maggiulli, R., Stoppa, M., Ievoli, E., Capalbo, A., Rienzi, L., 2015. Single step versus sequential culture medium: effects on embryo development, genetic and clinical outcomes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30, i24–i25. <https://doi.org/10.1093/humrep/30.Supplement-1.1>
294. Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Arlier, S., Kayisli, U.A., Lockwood, C.J., 2016. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding. *Hum. Reprod. Update* 22, 497–515. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw004>

295. Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
296. Sebestova, J., Danylevska, A., Novakova, L., Kubelka, M., Anger, M., 2012. Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3011–3018. <https://doi.org/10.4161/cc.21398>
297. Ségurel, L., Wyman, M.J., Przeworski, M., 2014. Determinants of mutation rate variation in the human germline. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 47–70. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-031714-125740>
298. Sepúlveda, S., Garcia, J., Arriaga, E., Diaz, J., Noriega-Portella, L., Noriega-Hoces, L., 2009. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil. Steril.* 91, 1765–1770. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.169>
299. Sfontouris IA, K.E., Lainas GT, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas TG, 2015. Similar implantation and pregnancy rates using a single medium versus sequential media for embryo culture: A randomized controlled trial. [WWW Document]. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* URL (accessed 1.1.15).
300. Sfontouris, I.A., Martins, W.P., Nastri, C.O., Viana, I.G.R., Navarro, P.A., Raine-Fenning, N., van der Poel, S., Rienzi, L., Racowsky, C., 2016. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 1261–1272. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0774-5>
301. Sharma, R.S., Saxena, R., Singh, R., 2018. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian J. Med. Res.* 148, S10–S14. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_636_18
302. Shibahara, H., Obara, H., Ayustawati, null, Hirano, Y., Suzuki, T., Ohno, A., Takamizawa, S., Suzuki, M., 2004. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *Int. J. Androl.* 27, 63–68. <https://doi.org/10.1111/j.0105-6263.2004.00437.x>

303. Shirasawa, H., Terada, Y., 2017. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. *Reprod. Med. Biol.* 16, 258–267. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12042>
304. Shrestha, D., La, X., Feng, H.L., 2015. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. *Ann. Transl. Med.* 3, 137. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.04.09>
305. Shu, Z., Row, S., Deng, W.-M., 2018. Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends Cell Biol.* 28, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.006>
306. Simoni, M.K., Mu, L., Collins, S.C., 2017. Women’s career priority is associated with attitudes towards family planning and ethical acceptance of reproductive technologies. *Hum. Reprod.* 32, 2069–2075. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex275>
307. Simopoulou, M., Giannelou, P., Bakas, P., Gkoles, L., Kalampokas, T., Pantos, K., Koutsilieris, M., 2016. Making ICSI Safer and More Effective: A Review of the Human Oocyte and ICSI Practice. *Vivo Athens Greece* 30, 387–400.
308. Simopoulou, M., Rapani, A., Grigoriadis, S., Pantou, A., Tsioulou, P., Maziotis, E., Tzanakaki, D., Triantafyllidou, O., Kalampokas, T., Siristatidis, C., Bakas, P., Vlahos, N., 2021. Getting to Know Endometriosis-Related Infertility Better: A Review on How Endometriosis Affects Oocyte Quality and Embryo Development. *Biomedicines* 9, 273. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030273>
309. Siristatidis, C., Trivella, M., Chrelias, C., Sioulas, V.D., Vrachnis, N., Kassanos, D., 2012. A short narrative review of the feasibility of adopting mild ovarian stimulation for IVF as the current standard of care. *Arch. Gynecol. Obstet.* 286, 505–510. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2347-x>
310. Siristatidis, C., Vaidakis, D., Rigos, I., Chrelias, G., Papantoniou, N., 2016. Leiomyomas and infertility. *Minerva Ginecol.* 68, 283–296.
311. Smith, O.P.M., Jabbour, H.N., Critchley, H.O.D., 2007. Cyclooxygenase enzyme expression and E series prostaglandin receptor signalling are enhanced in heavy menstruation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 1450–1456. <https://doi.org/10.1093/humrep/del503>

312. Snapp, E., 2005. Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan Bonifacino AI CHAPTER, Unit-21.4. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2104s27>
313. Solc, P., Schultz, R.M., Motlik, J., 2010. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 654–664. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq034>
314. Sonntag, B., Ludwig, M., 2012. An integrated view on the luteal phase: diagnosis and treatment in subfertility. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 77, 500–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04464.x>
315. St Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.-J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., Manfredi, J.J., 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol. Cell* 16, 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.002>
316. Stathis, A., Oza, A., 2010. Targeting Wee1-like protein kinase to treat cancer. *Drug News Perspect.* 23, 425–429. <https://doi.org/10.1358/dnp.2010.23.7.1490760>
317. Steuerwald, N., Durrett, R., Parsons, J., Hamilton, A., Kontanstinidis, M., Licciardi, F., Munne, S., 2014. Whole exome sequencing of embryo biopsies reveals clinically-significant de novo mutations. *Fertil. Steril.* 102, e25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.092>
318. Steward, R.G., Lan, L., Shah, A.A., Yeh, J.S., Price, T.M., Goldfarb, J.M., Muasher, S.J., 2014. Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 101, 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.026>
319. Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M.R., Elledge, S.J., 2003. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961–966. <https://doi.org/10.1038/nature01446>
320. Stringer, J.M., Winship, A., Liew, S.H., Hutt, K., 2018. The capacity of oocytes for DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 2777–2792. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2833-9>

321. Stringer, J.M., Winship, A., Zerafa, N., Wakefield, M., Hutt, K., 2020. Oocytes can efficiently repair DNA double-strand breaks to restore genetic integrity and protect offspring health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 11513–11522. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001124117>
322. Su, H., Yi, Y., Wei, T., Chang, T., Cheng, C., 2017. Detection of ovulation, a review of currently available methods. *Bioeng. Transl. Med.* 2, 238–246. <https://doi.org/10.1002/btm2.10058>
323. Su, Y.-Q., Sugiura, K., Woo, Y., Wigglesworth, K., Kamdar, S., Affourtit, J., Eppig, J.J., 2007. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 302, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.008>
324. Subramanian, G.N., Greaney, J., Wei, Z., Becherel, O., Lavin, M., Homer, H.A., 2020. Oocytes mount a noncanonical DNA damage response involving APC-Cdh1-mediated proteolysis. *J. Cell Biol.* 219, e201907213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201907213>
325. Sugimoto, Y., Inazumi, T., Tsuchiya, S., 2015. Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *J. Biochem. (Tokyo)* 157, 73–80. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu081>
326. Suhorutshenko, M., Kukushkina, V., Velthut-Meikas, A., Altmäe, S., Peters, M., Mägi, R., Krjutškov, K., Koel, M., Codoñer, F.M., Martínez-Blanch, J.F., Vilella, F., Simón, C., Salumets, A., Laisk, T., 2018. Endometrial receptivity revisited: endometrial transcriptome adjusted for tissue cellular heterogeneity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 2074–2086. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey301>
327. Sun, M.-H., Yang, M., Xie, F.-Y., Wang, W., Zhang, L., Shen, W., Yin, S., Ma, J.-Y., 2017. DNA Double-Strand Breaks Induce the Nuclear Actin Filaments Formation in Cumulus-Enclosed Oocytes but Not in Denuded Oocytes. *PloS One* 12, e0170308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170308>
328. Sun, M.-H., Zheng, J., Xie, F.-Y., Shen, W., Yin, S., Ma, J.-Y., 2015. Cumulus Cells Block Oocyte Meiotic Resumption via Gap Junctions in Cumulus Oocyte Complexes Subjected to DNA Double-Strand Breaks. *PloS One* 10, e0143223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143223>

329. Swain, J.E., 2014. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators. *Reprod. Biomed. Online* 28, 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.004>
330. Tanbo, T., Fedorcsak, P., 2017. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 96, 659–667. <https://doi.org/10.1111/aogs.13082>
331. te Velde, E.R., Pearson, P.L., 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update* 8, 141–154. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.2.141>
332. Terret, M.E., Wassmann, K., 2008. [Meiotic weakness: the first division]. *Med. Sci. MS* 24, 197–203. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008242197>
333. Thijssen, A., Creemers, A., Van der Elst, W., Creemers, E., Vandormael, E., Dhont, N., Ombelet, W., 2017. Predictive value of different covariates influencing pregnancy rate following intrauterine insemination with homologous semen: a prospective cohort study. *Reprod. Biomed. Online* 34, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.016>
334. Thomas, C., Cavazza, T., Schuh, M., 2021. Aneuploidy in human eggs: contributions of the meiotic spindle. *Biochem. Soc. Trans.* 49, 107–118. <https://doi.org/10.1042/BST20200043>
335. Titus, S., Li, F., Stobezki, R., Akula, K., Unsal, E., Jeong, K., Dickler, M., Robson, M., Moy, F., Goswami, S., Oktay, K., 2013. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci. Transl. Med.* 5, 172ra21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004925>
336. Tomlinson, M., Lewis, S., Morroll, D., British Fertility Society, 2013. Sperm quality and its relationship to natural and assisted conception: British Fertility Society guidelines for practice. *Hum. Fertil. Camb. Engl.* 16, 175–193. <https://doi.org/10.3109/14647273.2013.807522>
337. Trebichalská, Z., Kyjovská, D., Kloudová, S., Otevřel, P., Hampl, A., Holubcová, Z., 2021. Cytoplasmic maturation in human oocytes: an ultrastructural study †. *Biol. Reprod.* 104, 106–116. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa174>

338. Tseng, L., Gurdip, E., 1975. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 402–404. <https://doi.org/10.1210/jcem-41-2-402>
339. Tulay, P., Naja, R.P., Cascales-Roman, O., Doshi, A., Serhal, P., SenGupta, S.B., 2015. Investigation of microRNA expression and DNA repair gene transcripts in human oocytes and blastocysts. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 1757–1764. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0585-0>
340. Van De Kaa, D.J., 1987. Europe's second demographic transition. *Popul. Bull.* 42, 1–59.
341. van Loenen, A.C.D., Huirne, J.A.F., Schats, R., Hompes, P.G.A., Lambalk, C.B., 2002. GnRH agonists, antagonists, and assisted conception. *Semin. Reprod. Med.* 20, 349–364. <https://doi.org/10.1055/s-2002-36713>
342. van Rumste, M.M.E., Evers, J.L.H., Farquhar, C.M., 2004. ICSI versus conventional techniques for oocyte insemination during IVF in patients with non-male factor subfertility: a Cochrane review. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 19, 223–227. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh061>
343. van Tilborg, T., Oudshoorn, S., Eijkemans, M., Mochtar, M., van Golde, R., Hoek, A., Kuchenbecker, W., Fleischer, K., de Bruin, J., Groen, H., et al., 2017. Individualized FSH dosing based on ovarian reserve testing in women starting IVF/ICSI: a multicentre trial and cost-effectiveness analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 2485–2495. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex321>
344. Vander Borgh, M., Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
345. Veltman, J.A., Brunner, H.G., 2012. De novo mutations in human genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 13, 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrg3241>
346. Veylder, L.D., Larkin, J.C., Schnittger, A., 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* 16, 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.07.001>

347. Viguera, E., Canceill, D., Ehrlich, S.D., 2001. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 20, 2587–2595. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587>
348. Visconti, R., Grieco, D., 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 240–245.
349. Vissers, L.E.L.M., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., van Bon, B.W.M., Hoischen, A., de Vries, B.B.A., Brunner, H.G., Veltman, J.A., 2010. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* 42, 1109–1112. <https://doi.org/10.1038/ng.712>
350. Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., Elledge, S.J., 2002. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435–1438. <https://doi.org/10.1126/science.1076182>
351. Wang, C., Lv, H., Ling, X., Li, H., Diao, F., Dai, J., Du, J., Chen, T., Xi, Q., Zhao, Y., Zhou, K., Xu, B., Han, X., Liu, X., Peng, M., Chen, C., Tao, S., Huang, L., Liu, C., Wen, M., Jiang, Y., Jiang, T., Lu, C., Wu, W., Wu, D., Chen, M., Lin, Y., Guo, X., Huo, R., Liu, J., Ma, H., Jin, G., Xia, Y., Sha, J., Shen, H., Hu, Z., 2021. Association of assisted reproductive technology, germline de novo mutations and congenital heart defects in a prospective birth cohort study. *Cell Res.* 31, 919–928. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00521-w>
352. Wang, H., Luo, Y., Zhao, M.-H., Lin, Z., Kwon, J., Cui, X.-S., Kim, N.-H., 2016. DNA double-strand breaks disrupted the spindle assembly in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 132–143. <https://doi.org/10.1002/mrd.22602>
353. Wang, S., Kou, Z., Jing, Z., Zhang, Y., Guo, X., Dong, M., Wilmut, I., Gao, S., 2010. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17639–17644. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013185107>
354. Wang, X., Liu, D., He, D., Suo, S., Xia, X., He, X., Han, J.-D.J., Zheng, P., 2017. Transcriptome analyses of rhesus monkey preimplantation embryos reveal a reduced capacity for DNA double-strand break repair in primate oocytes and early embryos. *Genome Res.* 27, 567–579. <https://doi.org/10.1101/gr.198044.115>

355. Weimar, C.H.E., Post Uiterweer, E.D., Teklenburg, G., Heijnen, C.J., Macklon, N.S., 2013. In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reprod. Biomed. Online* 27, 461–476. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.002>
356. Wen, J., Jiang, J., Ding, C., Dai, J., Liu, Y., Xia, Y., Liu, J., Hu, Z., 2012. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 97, 1331-1337.e1–4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.053>
357. Weström, L.V., 1994. Sexually transmitted diseases and infertility. *Sex. Transm. Dis.* 21, S32-37.
358. Williams, S.C., Gibbons, W.E., Muasher, S.J., Oehninger, S., 2002. Minimal ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using sequential clomiphene citrate and gonadotropin with or without the addition of a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil. Steril.* 78, 1068–1072. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03374-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03374-5)
359. Wittmann, T., Hyman, A., Desai, A., 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28–E34. <https://doi.org/10.1038/35050669>
360. Woodruff, T.K., D’Agostino, J., Schwartz, N.B., Mayo, K.E., 1988. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science* 239, 1296–1299. <https://doi.org/10.1126/science.3125611>
361. Xavier, M.J., Salas-Huetos, A., Oud, M.S., Aston, K.I., Veltman, J.A., 2021. Disease gene discovery in male infertility: past, present and future. *Hum. Genet.* 140, 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02202-x>
362. Yavas, Y., Selub, M.R., 2004. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil. Steril.* 82, 1638–1647. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.061>
363. Yonekura, S.-I., Nakamura, N., Yonei, S., Zhang-Akiyama, Q.-M., 2009. Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 50, 19–26. <https://doi.org/10.1269/jrr.08080>

364. Yu, B., Doni Jayavelu, N., Battle, S.L., Mar, J.C., Schimmel, T., Cohen, J., Hawkins, R.D., 2020. Single-cell analysis of transcriptome and DNA methylome in human oocyte maturation. *PLoS ONE* 15, e0241698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241698>
365. Yuen, W.S., Merriman, J.A., O'Bryan, M.K., Jones, K.T., 2012. DNA double strand breaks but not interstrand crosslinks prevent progress through meiosis in fully grown mouse oocytes. *PloS One* 7, e43875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043875>
366. Yuzpe, A.A., Liu, Z., Fluker, M.R., 2000. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil. Steril.* 73, 1115–1119. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00522-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00522-7)
367. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organization, 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil. Steril.* 92, 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>
368. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I.D., Simpson, J.L., van der Poel, S., 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 1786–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>
369. Zeng, F., Baldwin, D.A., Schultz, R.M., 2004. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev. Biol.* 272, 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.018>
370. Zeng, Y., Forbes, K.C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnicka-Worms, H., Enoch, T., 1998. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507–510. <https://doi.org/10.1038/26766>
371. Zenzes, M.T., 2000. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum. Reprod. Update* 6, 122–131. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.122>

372. Zhang, J., Chang, L., Sone, Y., Silber, S., 2010. Minimal ovarian stimulation (mini-IVF) for IVF utilizing vitrification and cryopreserved embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* 21, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.033>
373. Zhang, T., Zhang, G.L., Ma, J.Y., Qi, S.T., Wang, Z.B., Wang, Z.W., Luo, Y.B., Jiang, Z.Z., Schatten, H., Sun, Q.Y., 2014. Effects of DNA damage and short-term spindle disruption on oocyte meiotic maturation. *Histochem. Cell Biol.* 142, 185–194. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1182-5>
374. Zheng, P., Schramm, R.D., Latham, K.E., 2005. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 72, 1359–1369. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039073>
375. Zhou, J., Yao, J., Joshi, H.C., 2002. Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci.* 115, 3547–3555. <https://doi.org/10.1242/jcs.00029>