



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Τμήμα Βιολογικών
Εφαρμογών
και Τεχνολογιών



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

**“Ταυτοποίηση βιοχημικών μορίων ενδεικτικών της
ποιότητας των ωαρίων και της έκβασης της εγκυμοσύνης στο
ωοθυλακικό περιβάλλον γυναικών που υποβάλλονται σε
υποβοηθούμενη αναπαραγωγή”**

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Υπεύθυνος Καθηγητής: κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής.
Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

**“Ταυτοποίηση βιοχημικών μορίων ενδεικτικών της
ποιότητας των ωαρίων και της έκβασης της εγκυμοσύνης στο
ωοθυλακικό περιβάλλον γυναικών που υποβάλλονται σε
υποβοηθούμενη αναπαραγωγή”**

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Επιτροπή :

κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης : Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών
και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Υπεύθυνος)

κ. Γεωργίου Ιωάννης : Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Κλινικής Εμβρυολογίας
(Μέλος)

κ. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας
Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής . (Μέλος)

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Θεολόγου Μιχαηλίδη στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Ιατρική Χημεία”.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ.Θεολόγο Μιχαηλίδη που μου έδειξε εμπιστοσύνη και με συμπεριέλαβε στο εργαστήριό του δίνοντας μου την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του και να συμμετάσχω στην παρούσα μελέτη. Τον ευχαριστώ για την επιστημονική του καθοδήγηση, την υποστήριξη, την ενεργό συμμετοχή του και για την πληθώρα γνώσεων, ιδεών και συμβουλών που μου προσέφερε καθ’ όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Επίσης, τον ευχαριστώ βαθιά και για το κουράγιο που μου μετέδωσε σε όλες τις δύσκολες στιγμές στο εργαστήριο και για την παρότρυνσή του να προσπαθούμε συνεχώς να εξελισσόμαστε και να βελτιωνόμαστε .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Γεωργίου Ιωάννη, κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο που αφιέρωσαν το χρόνο τους για να αξιολογήσουν την εργασία μου και μεσολάβησαν, για να έχουμε στην διαθεσή μας τα δείγματα που χρειαζόμαστε για την μελέτη μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Κυριακή Παπαγεωργίου και στην υποψήφια διδάκτορα και συνεργάτιδά μου Ελευθερία Σαράφη που με βοήθησαν και με συμβούλεψαν κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης, καθώς και την προπτυχιακή φοιτήτρια Θεολογία Τζίλια, η συμβολή των οποίων ήταν πολύ σημαντική στην συλλογή των δειγμάτων γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση στο ΠΓΝΙ .

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, τον Τσίγκα Ιωάννη, την Μαρή Δέσποινα, την Βούλγαρη Δέσποινα, την Λουκμακιά Σοφία, την Καρυδάκη Κωνσταντίνα -Ελίνα, την Σαρητζόγλου Σταματία , την Φούκα Αικατερίνη, την Καραμέτση Κωνσταντίνα για την άριστη συνεργασία τους και το πολύ όμορφο και ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο. Το κάθε άτομο με βοήθησε με το δικό του ξεχωριστό τρόπο να προσαρμοστώ και να εξελιχθώ τόσο στον εργαστηριακό χώρο όσο και στην επιστήμη της Μοριακής Βιολογίας.

Αμέτρητα ευχαριστώ θα ήθελα να προσφέρω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που μου συμπαραστάθηκαν στις δύσκολες στιγμές και με βοήθησαν με τις συμβουλές τους.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην απευθύνω ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλες τις γυναίκες που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και συμμετέχουν στην έρευνα αυτή, χωρίς τις οποίες δεν θα ήταν εφικτή η παρούσα μελέτη.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract.....	10
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
A.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	11
A.2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	12
A.3. ΩΟΓΕΝΕΣΗ.....	13
A.4. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	15
A.4.1 ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	16
A.4.2 ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΩΟΘΗΛΑΚΙΩΝ	18
A.5. ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	20
A.6 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	24
A.6.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ	24
A.6.2 ΗΛΙΚΙΑ	25
A.6.3 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ (POLYCYSTIC OVARY SYNDROME – PCOS)	27
A.6.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.....	30
A.6.5 ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	32
A.7 ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	35
A.7.1 ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ	35
A.7.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ	36
A.7.3 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	47
A.7.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ.....	49
A.8 ΣΤΟΧΟΣ.....	51
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
B.1. ΥΛΙΚΑ	51
B.1.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	51
B.1.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	52
B.1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	57
B.1.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	57
B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	59
B.2.1. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	59
B.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	59
B.2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER	60

B.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ	61
B.2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ	61
B.2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD	61
B.2.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN	62
B.2.8. ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ SDS - ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ COOMASSIE BLUE.....	66
B.2.9. ΧΡΩΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΜΕ PONCEAU S	67
B.2.10. ΑΠΟΜΑΚΡΥΜΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ WESTERN BLOT (STRIPPING).....	69
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
Γ.1 ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ.....	70
Γ.1.1 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	70
Γ. 1.2 ΑΡΧΙΚΑ ΠΙΛΟΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	71
Γ. 1.3 ΤΡΟΠΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT.....	73
Γ.1.4 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ . 75	
Γ.1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ WESTERN BLOT.	77
Γ.1.6 ΕΥΡΕΣΗ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT.....	79
Γ.1.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT.....	90
Γ.1.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΡΟΛΟ “ΚΛΕΙΔΙ” ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT	97
Γ.2 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ	112
Γ.2.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT	112
Γ.2.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ	

ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT	118
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
Δ1. Η ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΠΟΚΑΛΥΨΕ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.	124
Δ.2. ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΕΡΗ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΦΑΙΡΕΘΟΥΝ ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	125
Δ.3. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑΝ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΑ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΑ ΥΓΡΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	125
Δ.3.1 ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΑΙ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ	125
Δ.4. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ BCL2 ΘΑ ΜΠΟΡΟΥΣΕ ΝΑ ΘΕΩΡΗΘΕΙ ΕΝΑΣ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	126
Δ.4.1 ΣΤΙΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ BCL-2 ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ.....	126
Δ.5 Ο ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ LC3-II ΚΑΙ BCL2 ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΕΝΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΝΑ ΕΚΤΙΜΗΣΟΥΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΑΥΤΩΝ	129
Δ.5.1. ΥΨΗΛΟΤΕΡΑ ΕΠΙΠΕΔΑ LC3-II ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΑ ΕΠΙΠΕΔΑ BCL2 ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ GONAL F ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ MENOPURE.....	129
Δ.6. Ο ΛΟΓΟΣ LONP1 / VDAC ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑΝ ΧΡΗΣΙΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ , ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΤΟΣΟ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΟΣΟ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	130
Δ.6.1 Ο ΛΟΓΟΣ LONP1 / VDAC ΕΙΝΑΙ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟΣ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ GONAL F ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ MENOPURE	130
Δ.7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

Περίληψη

Η υπογονιμότητα αποτελεί ένα βασικό και ολοένα και αυξανόμενο πρόβλημα της σύγχρονης κοινωνίας που απασχολεί το 8-12% των ζευγαριών παγκοσμίως ενώ οι υπογόνιμες γυναίκες αγγίζουν το 10 % του συνολικού γυναικείου πληθυσμού. Ο Π.Ο.Υ αναγνωρίζει την υπογονιμότητα ως αναπηρία κατατάσσοντας της στην 5^η θέση των πιο σοβαρών αναπηριών του γυναικείου πληθυσμού. Τα αίτια που την προκαλούν φαίνεται να ποικίλουν και οφείλονται σε παθολογικές καταστάσεις, σε παράγοντες φυσιολογικούς, ανατομικούς, ορμονικούς ή ακόμα και κοινωνικούς που εμφανίζονται τόσο στον άνδρα όσο και στην γυναίκα. Επιδρά σημαντικά στην ψυχολογία ενός ζευγαριού και ασκεί πίεση στην μεταξύ τους σχέση. Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και οι τεχνικές που την αποτελούν έχουν δώσει λύση στο πρόβλημα αυτό και έχουν μειώσει σε σημαντικό βαθμό τα ποσοστά υπογονιμότητας. Ωστόσο τα ποσοστά επιτυχίας δεν βρίσκονται ακόμα σε επιθυμητά επίπεδα.

Προκειμένου αυτές οι μέθοδοι να γίνουν όσο το δυνατόν περισσότερο αποδοτικές είναι σημαντικό να μελετηθούν παράγοντες που μπορούν να υπονομεύσουν την ποιότητα των ωαρίων, των ωοθυλακίων. Κεντρικό ρόλο σε αυτό παίζει το περιβάλλον του ωαρίου δηλαδή το ωοθυλακικό υγρό και τα κοκκώδη κύτταρα. Συστατικά του ωοθυλακικού υγρού που προκύπτουν από την κυκλοφορία του αίματος που διαπερνούν τον ωοθυλακικό φραγμό και προϊόντα που εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες που αντανακλούν την ποιότητα του ωαρίου. Επίσης, παράγοντες των κοκκωδών κυττάρων καθώς και η απόπτωση αυτών μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες του αναπτυξιακού δυναμικού των ωαρίων και της ποιότητάς τους, καθώς είναι απαραίτητος ο κατάλληλος αριθμός κοκκωδών κυττάρων, για μια ικανοποιητική ωοθυλακική απάντηση στις γοναδοτροφίνες που καθορίζεται από το ρυθμό πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Όλα αυτά λοιπόν, αποτέλεσαν έναυσμα για να μελετήσουμε το ωοθυλακικό υγρό και τα κοκκώδη κύτταρα από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, για το ωοθυλακικό υγρό έγινε προσπάθεια εύρεσης και ανίχνευσης εκκρινόμενων πρωτεϊνών όπως η ιντερλευκίνη IL-6, ο παράγοντας VEGF, μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως ο υποδοχέας FSH-R, και πρωτεϊνών του μονοπατιού της απόπτωσης όπως η προ- αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2, με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης western blotting. Όσον αφορά τα κοκκώδη κύτταρα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος επιπέδων σημαντικών πρωτεϊνών του μονοπατιού της αυτοφαγίας όπως το LC3-I, LC3-II και της απόπτωσης όπως η Bcl2 καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή λειτουργία όπως είναι η μιτοχονδριακή πρωτεάση Lonp1 με

λειτουργικό ρόλο και η μιτοχονδριακή πορίνη VDAC, με δομικό ρόλο χρησιμοποιώντας την μέθοδο western blotting. Τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών και οι διαφορές που εντοπίστηκαν μεταξύ των υπό μελέτη γυναικών συσχετίστηκαν με διάφορα χαρακτηριστικά τους όπως η ηλικία, αλλά και το πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών με απώτερο στόχο να επιτευχθεί εγκυμοσύνη στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τέλος, επειδή το ωοθυλακικό υγρό βρίθει από πρωτεΐνες του ορού του πλάσματος οι οποίες δυσχεραίνουν την ανίχνευση άλλων πρωτεϊνών, εγκαθιδρύθηκε μία μεθοδολογία απομάκρυνσης των πρωτεϊνών αυτών και κανονικοποίησης των ζωνών που λαμβάνουμε για τα ωοθυλακικά υγρά χωρίς την χρήση ακτίνης. Συμπερασματικά, τα παραπάνω πειράματα προσέφεραν την δυνατότητα εύρεσης κάποιων πιθανών μορίων βιοδεικτών , ενδεικτικών της ποιότητας των ωοκυττάρων .

Abstract

Infertility is a major and growing problem in modern society, affecting 8-12% of couples worldwide, while infertile women account for 10% of the total female population. The WHO recognises infertility as a disability, ranking it as the 5th most serious disability in the female population. The causes appear to be varied and are due to pathological conditions, physiological, anatomical, hormonal or even social factors that occur in both men and women. It significantly affects the psychology of a couple and puts pressure on the relationship between them. Assisted reproduction and its constituent techniques have provided a solution to this problem and have significantly reduced infertility rates. However, success rates are not yet at desirable levels.

In order to make these methods as effective as possible, it is important to study factors that can undermine the quality of the oocytes and follicles. Central to this is the environment of the oocyte like the follicular fluid and granulosa cells. Components of the follicular fluid resulting from the blood circulation that pass through the follicular barrier and products secreted by granulosa cells and sheath cells could be used as potential biomarkers reflecting the quality of the oocyte. Also, granulocyte factors and granulocyte apoptosis may be predictive indicators of oocyte development potential and quality, as an adequate number of granulocytes is necessary for a satisfactory follicular response to gonadotrophins determined by the rate of proliferation and programmed cell death.

All of these, has led us to study the follicular fluid and granulosa cells from the follicles of women undergoing assisted reproduction. Specifically, for follicular fluid, an attempt was made to find and detect secreted proteins such as interleukin IL-6, VEGF factor, membrane proteins such as FSH-R receptor, and apoptosis pathway proteins such as pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl2, by immunoblotting western blotting. As for granulosa cells, levels of important autophagy pathway proteins such as LC3-I, LC3-II and apoptosis pathway proteins such as Bcl2 as well as proteins related to mitochondrial function such as mitochondrial protease Lonp1 with a functional role and mitochondrial porin VDAC, with a structural role were tested using western blotting method. The levels of these proteins and the differences detected between the women undergoing assisted reproduction were correlated with various characteristics such as age, and the ovarian stimulation protocol with the ultimate goal of achieving pregnancy in assisted reproduction programs.

Finally, because follicular fluid is full of plasma serum proteins that make it difficult to detect other proteins, a methodology was established to remove these proteins and normalize the bands obtained for follicular fluids without the use of actin. In conclusion, the above experiments offered the possibility of finding some possible biomarker molecules indicative of oocyte quality.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ως γονιμοποίηση ορίζεται η διαδικασία συνένωσης του θηλυκού και του αρσενικού γαμέτη, δηλαδή η συνένωση του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου αντίστοιχα.¹ Κάθε γαμέτης διαθέτει έναν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (23), έτσι ώστε όταν συνδυαστούν να προκύψει ένας νέος διπλοειδής οργανισμός με (46) χρωμοσώματα, το ζυγωτό, από το οποίο μετά από μιτωτικές διαιρέσεις θα σχηματιστεί το αναπτυσσόμενο έμβρυο.² Σε αντίθεση με άλλα συστήματα του ανθρώπινου σώματος, το αναπαραγωγικό σύστημα των αντρών διαφέρει σημαντικά από αυτό των γυναικών καθώς το καθένα λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο στην αναπαραγωγική διαδικασία.³

Ο ρόλος του αντρικού αναπαραγωγικού συστήματος είναι η παραγωγή ανδρογόνων όπως είναι η τεστοστερόνη για την διατήρηση της ανδρικής αναπαραγωγικής λειτουργίας, η παραγωγή κινητών σπερματοζωαρίων (σπερματογένεση) και η εναπόθεση τους στον κόλπο της γυναίκας επιτρέποντας έτσι σε κάποιο από αυτά να ταξιδέψει και να γονιμοποιήσει κάποιο ωάριο.⁴ Η παραγωγή σπέρματος ξεκινάει από την εφηβεία και έκτοτε δεν σταματάει ενώ οι άνδρες θεωρείται ότι μπορούν να κάνουν παιδί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους.⁵ Η εκτιμώμενη ημερήσια παραγωγή σπέρματος ανά άνδρα κυμαίνεται από 150 έως 275 εκατομμύρια σπερματοζωάρια.⁶

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή γαμετών που ονομάζονται ωάρια, για την παραγωγή ορισμένων φυλετικών ορμονών και τη διατήρηση των γονιμοποιημένων ωαρίων καθώς αυτά εξελίσσονται σε ώριμα έμβρυα, μέχρι να ολοκληρωθεί η εγκυμοσύνη. Τα αναπαραγωγικά χρόνια μιας γυναίκας είναι μεταξύ της εμμηναρχής (πρώτος εμμηνορροϊκός κύκλος) και της εμμηνόπαυσης (διακοπή της εμμήνου ρύσεως για 12 διαδοχικούς μήνες). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, λαμβάνουν χώρα κυκλικές αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας προκειμένου να απελευθερωθεί ένα ωοκύτταρο από το ωοθυλάκιο για να γονιμοποιηθεί από ένα σπερματοζωάριο. Αν επιτευχθεί γονιμοποίηση το γυναικείο σώμα προετοιμάζεται να υποδεχτεί το έμβρυο και να υποστηρίξει την ανάπτυξη του νέου ατόμου, ενώ αν δεν συμβεί γονιμοποίηση τότε το υποστηρικτικό περιβάλλον αποπίπτει και ξεκινάει ένας άλλος εμμηνορροϊκός κύκλος.⁷

A.2. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες, τη μήτρα, τον κόλπο, τους βοηθητικούς αδένες και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Όλα αυτά εξασφαλίζουν την αναπαραγωγή και την διαιώνιση του είδους .

Οι ωοθήκες είναι δύο αδένες ωοειδείς, σχήματος αμυγδάλου και στην ώριμη γυναίκα το μήκος τους φτάνει τα 2-5εκ., το πλάτος τα 1,5-3εκ. και το βάρος τους τα 5-10γρ. Σε μία φυσιολογική γυναικεία λεκάνη υπάρχουν δύο ωοθήκες, μία σε κάθε πλευρά της μήτρας. Η επιφάνειά τους κατά τη γέννηση και μέχρι την ήβη είναι λεία, ενώ αργότερα στιγματίζεται από οζίδια και ουλές, ως συνέπεια των ωοθυλακιορρηξιών. Με την εμμηνόπαυση επέρχεται η συρρίκνωση του αδένα.

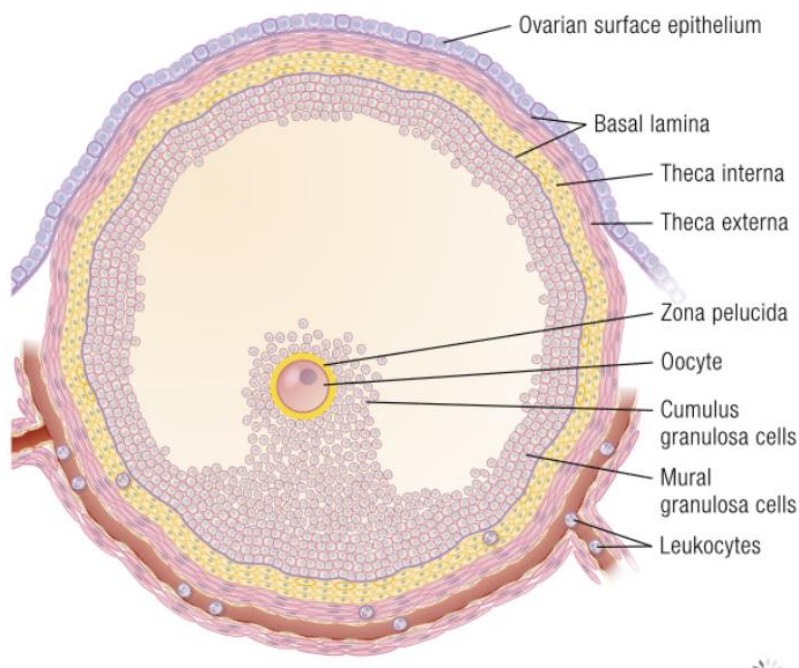
Στις ωοθήκες πραγματοποιείται η ανάπτυξη, η ωρίμανση και η αποθήκευση των ωοθυλακίων. Πρόκειται για μία δεξαμενή ωοθυλακίων που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης (αρχέγονα , πρωτογενή ή δευτερογενή) . Ο ρόλος των ωοθηκών είναι η παραγωγή και απελευθέρωση ωαρίων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας καθώς και η παραγωγή ορμονών, οιστρογόνων και προγεστερόνης οι οποίες έχουν θεμελιώδη ρόλο για την ομαλή λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και την εμφάνιση της εμμήνου ρήσεως.^{7,8}

Τα ωοθυλάκια αποτελούν την βασική λειτουργική μονάδα της ωοθήκης και περιλαμβάνουν τρία είδη κυττάρων . Αυτά είναι τα ωοκύτταρα , τα κοκκώδη κύτταρα (Granulosa cells -GC) και τα κύτταρα θήκης (Theca cells). Τα ωοκύτταρα θα δώσουν τον θηλυκό γαμέτη (ωάριο) . Τα κύτταρα θήκης, περιβάλλουν τα κοκκώδη κύτταρα και είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ανδρογόνων ενώ τα κοκκώδη κύτταρα, περιβάλλουν το ωοκύτταρο και είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, καθώς και για τη σύνθεση προγεστερόνης.⁹

Τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται με την διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης . Στα αρχικά στάδια αυτής της διαδικασίας, το ωοθυλάκιο αποτελείται από το ωοκύτταρο και μια στιβάδα επίπεδων προ- κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν. Έπειτα, τα επίπεδα κύτταρα αλλάζουν μορφολογία , γίνονται κυβοειδή και πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας πολλαπλές στιβάδες κοκκωδών κυττάρων . Παράλληλα σχηματίζονται τα κύτταρα θήκης, τα οποία περιβάλλουν τα κοκκώδη κύτταρα. Μόλις συσσωρευτούν στο ωοθυλάκιο μερικές χιλιάδες κοκκώδη κύτταρα, σχηματίζεται μια κοιλότητα γεμάτη υγρό η οποία αποκαλείται άντρο . Ως συνέπεια σχηματισμού του άντρου, δύο πληθυσμοί κοκκωδών κυττάρων γίνονται εμφανείς: τα τοιχωματικά κύτταρα (mural cells) που βρίσκονται στην εσωτερική επένδυση του τοιχώματος του

ωοθυλακίου και τα κύτταρα ωοφόρου δίσκου (cumulus cells) που περιβάλλουν το ωοκύτταρο.

Όταν το ωοθυλάκιο αναπτυχθεί πλήρως, τότε είναι έτοιμο για ωοθυλακιόρρηξία κατά την οποία το ωοκύτταρο θα απελευθερωθεί προκειμένου να γονιμοποιηθεί. Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία το ωοκύτταρο αναπτύσσεται με την διαδικασία της ωογένεσης .¹⁰



Εικόνα 1 : Η δομή ενός ώριμου ωοθυλακίου .¹¹

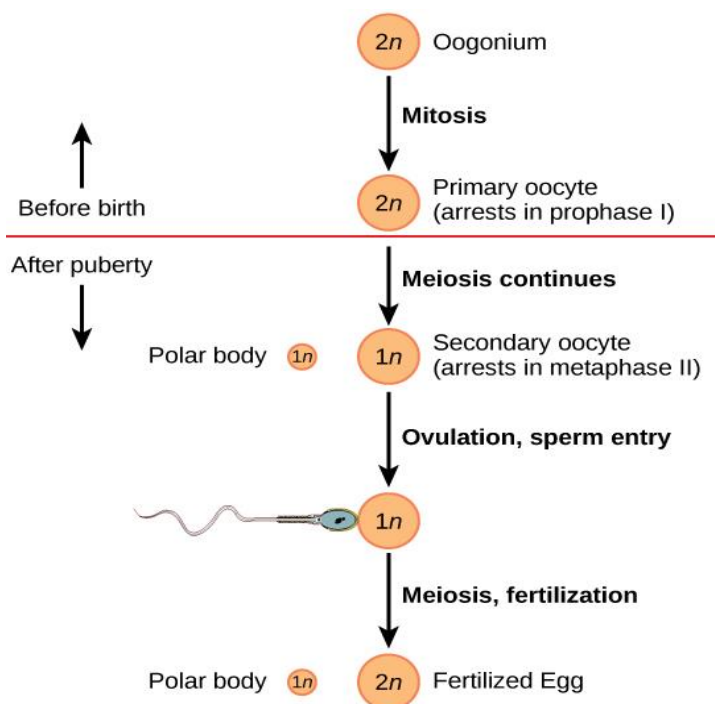
A.3. ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Το ωοκύτταρο είναι ένα θηλυκό γεννητικό κύτταρο που εμπλέκεται στην αναπαραγωγή. Είναι ένα από τα μεγαλύτερα κύτταρα του σώματος και αναπτύσσεται στο ωοθυλάκιο των ωοθηκών, κατά τη διαδικασία της ωογένεσης.

Η διαδικασία της ωογένεσης ξεκινά από την εμβρυική ζωή του ατόμου στις ωοθήκες. Το πρώτο στάδιο αρχίζει με τα αδιαφοροποίητα αρχέγονα γενετικά κύτταρα, τα ωογόνια, τα οποία είναι αυτό-ανανεώσιμα βλαστικά κύτταρα. Κάθε ωογόνιο στις εμβρυικές ωοθήκες διαιρείται και εισέρχεται στο αρχικό στάδιο της

μείωσης (μείωση I) για να γίνει το διπλοειδές πρωτογενές ωοκύτταρο . Αυτό δεν ολοκληρώνει τη μείωση I αλλά παραμένει ακινητοποιημένο στην πρόφαση της μείωσης I, στη δικτυοταινία, μέχρι την εφηβεία. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης ο πυρήνας του ωοκυττάρου ονομάζεται βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle/GV). Τα ωοκύτταρα GV εντοπίζονται εντός των αρχέγονων ωοθυλακίων. Μέχρι το τέλος της εμβρυϊκής ζωής, έχουν σχηματιστεί όλα τα πρωτογενή ωοκύτταρα και έχουν σταματήσει την ανάπτυξή τους στη δικτυοταινία. Αν και η μείωση των πρωτογενών ωοκυττάρων έχει ανασταλεί, τα χρωμοσώματά τους συνεχίζουν να παράγουν mRNA και rRNA, από τα οποία αργότερα θα σχηματιστούν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών που απαιτούνται για την περαιτέρω ωρίμανση των ωαρίων και για την ανάπτυξη τυχόν γονιμοποιημένων ωαρίων και εμβρύων.

Τα πρωτογενή ωοκύτταρα διατηρούνται και παραμένουν σε μία κατάσταση αναστολής της μείωσης για χρόνια, μέχρι την εφηβεία. Μετά την εφηβεία, μόνο 15 έως 20 πρωτογενή ωοκύτταρα ενεργοποιούνται και ξεκινάει ξανά η μειωτική τους διαίρεση σε κάθε εμμηνορροϊκό κύκλο. Ωστόσο μόνο ένα από αυτά ωριμάζει πλήρως στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο και υπόκειται σε ωορρηξία. Κατά τη διάρκεια αυτής της ωρίμανσης, το πρωτογενές ωάριο ολοκληρώνει τη μείωση I και διαιρείται σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα: ένα απλοειδές δευτερογενές ωοκύτταρο και ένα μη λειτουργικό πολικό σωματίο. Η μείωση δεν ολοκληρώνεται εντελώς, αλλά αναστέλλεται και πάλι στο στάδιο της μετάφασης II και τερματίζεται μετά την επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο αφού προκύψει το ζυγωτό και ένα δεύτερο πολικό σωματίο. Και τα δύο πολικά σωματίδια αποβάλλονται από το ωοκύτταρο.



Εικόνα 2: Η διαδικασία της ωογένεσης. ¹⁴

Οι ωοθήκες της γυναίκας περιέχουν έναν σταθερό αριθμό πρωτογενών ωοκυττάρων που έχουν δημιουργηθεί πριν από τη γέννηση και μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία της γυναίκας μέχρι την εμμηνόπαυση που εξαντλείται. Ήδη από την στιγμή της γέννησης, η γυναίκα έχει απωλέσει τον μεγαλύτερο αριθμό των ωοκυττάρων και έχει μείνει περίπου με 1.000.000 ωοκύτταρα. Κατά την εμμηναρχή, η ωοθήκη της γυναίκας έχει περίπου 300.000- 400.000 ωοκύτταρα και από αυτά μόνο 400-500 θα φτάσουν στο στάδιο της ωορρηξίας.¹² Για αυτό το φαινόμενο ευθύνεται η απόπτωση και η αυτοφαγία των ωοθυλακίων που τα οδηγούν σε ατρησία. Στις ωοθήκες των θηλαστικών, λιγότερο από το 1% των ωοθυλακίων οδηγείται σε ωορρηξία, ενώ το υπόλοιπο 99% υφίσταται ατρησία.¹³

A.4. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωοθυλακιογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται και υφίσταται μία σειρά από μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές προκειμένου να περάσουν από το στάδιο των αρχέγονων ωοθυλακίων στο στάδιο που θα υποστούν ωορρηξία ή ατρησία και θα καταστραφούν.¹⁴ Κατά την διαδικασία αυτή, ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε πρωτογενές και στην συνέχεια σε δευτερογενές καταλήγοντας τελικά σε ένα πρωορρηκτικό ωοθυλάκιο με άντρο ή αλλιώς γραφίανο. Η ωοθυλακιογένεση διακρίνεται σε δύο φάσεις, την ανεξάρτητη από γοναδοτροπίνες, που περιλαμβάνει την μετάβαση από το αρχέγονο μέχρι το δευτερογενές ωοθυλάκιο, και την εξαρτώμενη από γοναδοτροπίνες, από το δευτερογενές μέχρι το πρωορρηκτικό. Όσον αφορά την ελεγχόμενη από γοναδοτροπίνες φάση, δύο είναι αυτές που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH).¹⁶

Η ωοθυλακιογένεση στις γυναίκες είναι μία διαδικασία μεγάλης διάρκειας. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο που έχει φτάσει μέχρι το στάδιο της ωορρηξίας προέρχεται από ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο που επιστρατεύτηκε να αναπτυχθεί περίπου 1 χρόνο νωρίτερα. Το στάδιο της ωοθυλακιογένεσης που είναι ανεξάρτητο από γοναδοτροπίνες προχωρά πολύ αργά, απαιτώντας περίοδο 300 ή περισσότερων ημερών για να ολοκληρωθεί και αυτό προκύπτει από τον μεγάλο χρόνο διπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων κατά την αντιγραφή.¹⁷ Η εξαρτώμενη από γοναδοτροπίνες φάση είναι πιο γρήγορη καθώς απαιτούνται 71 ημέρες για την μετατροπή του δευτερογενούς ωοθυλακίου σε γραφιανό και άλλες 14 ημέρες ώστε ένα μόνο ωοθυλάκιο να επικρατήσει έναντι των υπολοίπων και να καταλήξει σε ωορρηξία.^{18,19}

A.4.1 ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Στο πρώτο στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας τα ωοθυλάκια αποκαλούνται **αρχέγονα (primordial follicles)**. Αποτελούνται από ένα πρωτογενές ωοκύτταρο που έχει σταματήσει την ανάπτυξή του στη μειωτική πρόφαση I και περιβάλλεται από ένα μονό στρώμα πλακωδών προκοκκιωδών κυττάρων, ενώ δεν παρατηρείται η ύπαρξη κάποιας βασικής μεμβράνης ή της zona pellucida. Αυτά τα ωοθυλάκια μπορούν να παραμείνουν σε αυτή την κατάσταση για μεγάλες περιόδους, έως και 40 χρόνια στις γυναίκες, και εντοπίζονται κυρίως στον φλοιό της ωοθήκης. Παρά το γεγονός ότι τα αρχέγονα ωοθυλάκια είναι ακινητοποιημένα στην φάση αυτή, είναι μεταβολικά ενεργά. Μερικά από αυτά βρίσκονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο ωρίμανσης πριν μεταβούν στην φάση που θα γίνουν πρωτογενή ωοθυλάκια και περιέχουν τόσο πλακώδη, όσο και κυβοειδή κοκκώδη κύτταρα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια μεταβολή στο ωοκύτταρο ή στο μεγεθός τους.

Καθώς τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται μετατρέπονται σε **πρωτογενή ωοθυλάκια (primary follicles)**, στα οποία το ωοκύτταρο περιβάλλεται από μία μονή στρώση κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων και διαχωρίζονται από αυτά μέσω της διαφανής ζώνης (zona pellucida). Αυτή η ζώνη διακόπτεται καθώς σχηματίζονται χασμοσύνδεσμοι (gap junctions) μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων. Επίσης εξωτερικά το ωοθυλάκιο οριοθετείται από την ύπαρξη μιας βασικής μεμβράνης. Τα πρωτογενή ωοθυλάκια χαρακτηρίζονται από την αυξημένη διάμετρο του ωοκυττάρου και τον αυξημένο αριθμό των κοκκωδών κυττάρων .

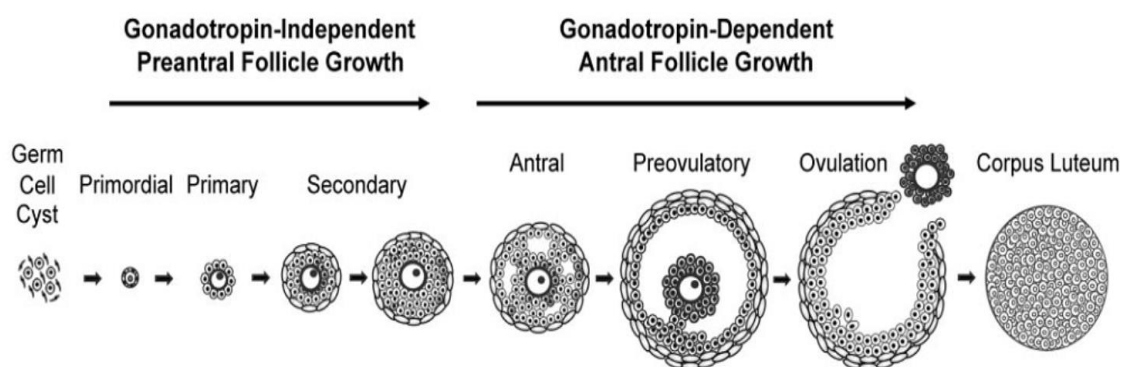
Τα δευτερογενή ωοθυλάκια που αναπτύσσονται στην συνέχεια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα πρωτογενή και αποτελούνται από το πρωτογενές ωοκύτταρο που περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη, πολλά στρώματα κοκκιωδών κυττάρων και την βασική μεμβράνη εξωτερικά. Όταν τα κοκκώδη κύτταρα αυξηθούν σε αριθμό και σχηματίσουν περίπου δύο με τρεις στρώσεις, τότε εξωτερικά της βασικής μεμβράνης τους σχηματίζεται μία διπλή στρώση από **κύτταρα θήκης**, τα έξω (theca externa) και τα έσω κύτταρα θήκης (theca interna). Κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, εμφανίζονται υποδοχείς της LH στα κύτταρα της θήκης που διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά, ενώ στα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας εμφανίζονται υποδοχείς της FSH. Κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης δημιουργούνται μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους σε μία ενιαία κοιλότητα γεμάτη υγρό, η οποία καλείται άντρο.

Η εμφάνιση του άντρου καθιστά το ωοθυλάκιο, τριτογενές ή **γρραφιανό (tertiary follicle , Graafian follicle)**. Η κοιλότητα του άντρου που σχηματίζεται καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του ωοθυλακίου και έτσι χωρίζει τα κοκκώδη κύτταρα σε υποπληθυσμούς με διαφορετική λειτουργία. Το ωοκύτταρο λοιπόν,

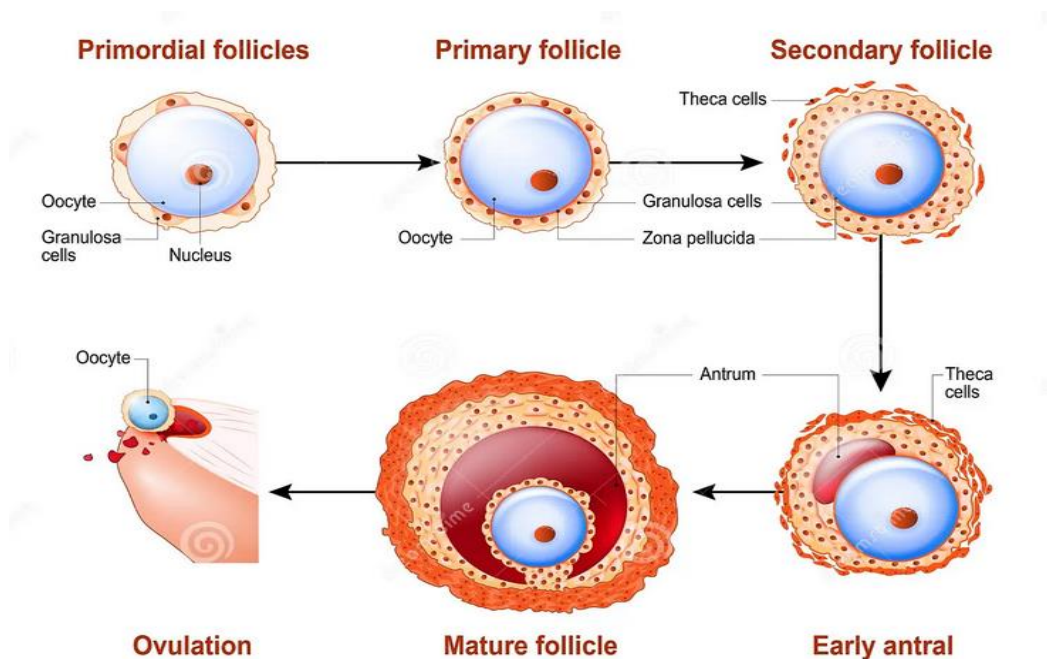
περιβάλλεται από τα κοκκώδη **κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus oophorus)** που απομακύνονται μαζί με το ωοκύτταρο κατά την ωορρηξία και πιο απομακρυσμένα από αυτά βρίσκονται τα **τοιχωματικά κοκκιώδη κύτταρα (mural Granulosa cells)**.

Παρόλο που ο μιτωτικός ρυθμός των κοκκιωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης αρχίζει να μειώνεται στα τριτογενή ωοθυλάκια, αυτά συνεχίζουν να αυξάνονται σε μέγεθος λόγω της αύξησης του όγκου του άντρου με ωοθυλακικό υγρό. Σε αυτό το στάδιο, το ωοθυλάκιο ονομάζεται **ωορρηκτικό (ovulatory follicle)**, καθώς μπορεί πλέον να υποστεί ωοθηλακιορρηξία και να απελευθερώσει το ωοκύτταρο. ²⁰

Μετά την απομάκρυνση του ωοκυττάρου κατά την ωοθυλακιορρηξία, το εναπομείναν ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε **ωχρό σωμάτιο (corpus luteum)**, το οποίο εκκρίνει μεγάλες ποσότητες προγεστερόνης σε συνδυασμό με μικρές ποσότητες οιστρογόνων στο αίμα, και συντηρεί το έμβρυο στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του, πριν σχηματιστεί ο πλακούντας. ²¹



Εικόνα 3 : Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης. ²²



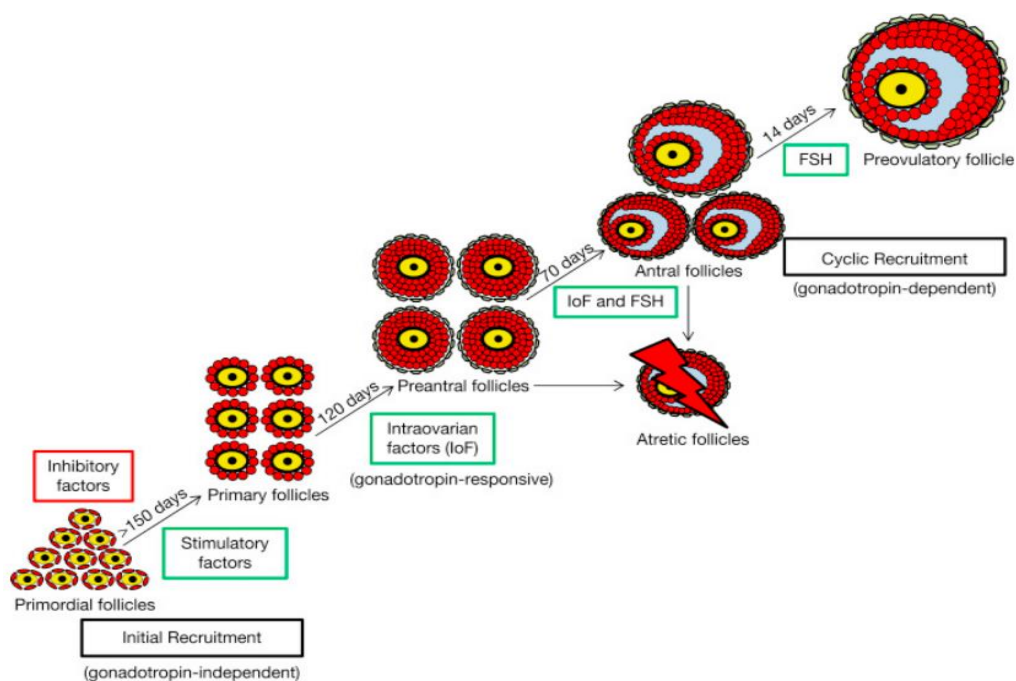
Εικόνα 4 : Πορεία διαφοροποίησης κοκκωδών κυττάρων κατά την ωοθυλακιογένεση . ¹⁰⁶

A.4.2 ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΩΟΘΗΛΑΚΙΩΝ

Ο όρος στρατολόγηση έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει δύο σημαντικά αλλά διακριτά σημεία κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Τα ωοθυλάκια μετατρέπονται από αδρανή σε αναπτυσσόμενα με την διαδικασία της στρατολόγησης, η οποία διακρίνεται στην αρχική και την κυκλική στρατολόγηση. Η αρχική στρατολόγηση είναι μια συνεχής διαδικασία και ξεκινά αμέσως μετά το σχηματισμό ωοθυλακίων, πολύ πριν από την έναρξη της εφηβείας, κατά την εμβρυική ζωή. Κατά την αρχική στρατολόγηση, οι ενδοωοθηκικοί και άλλοι άγνωστοι παράγοντες διεγείρουν ορισμένα αρχέγονα ωοθυλάκια για να ξεκινήσουν την ανάπτυξη τους, ενώ τα υπόλοιπα ωοθυλάκια παραμένουν σε μια κατάσταση ηρεμίας και αδράνειας για μήνες ή χρόνια. Η απελευθέρωση ανασταλτικών παραγόντων διατηρεί τα ωοθυλάκια σε αυτή την κατάσταση αδράνειας .

Η κυκλική στρατολόγηση ξεκινάει αμέσως μετά την έναρξη της εφηβείας και ένας αριθμός ωοθυλακίων με άντρο συνεχίζουν την ανάπτυξή τους ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της FSH, κατά την διάρκεια κάθε αναπαραγωγικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια της κυκλικής στρατολόγησης, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός ωοθυλακίων επιβιώνει και αυτά που δεν συνεχίζουν την ανάπτυξή τους εκφυλίζονται μέσω ατρησίας .

Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω η ωοθυλακιογένεση απαιτεί περίπου 12 μήνες για να ολοκληρωθεί. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια παραμένουν αδρανή υπό τη δράση των ενδοωοθηκικών ανασταλτικών παραγόντων. Η μείωση αυτών των παραγόντων και η αύξηση των ενδοωοθηκικών διεγερτικών παραγόντων οδηγεί στην ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων στο πρωταρχικό στάδιο ανάπτυξης. Η διαδικασία αυτή είναι ανεξάρτητη από γοναδοτροπίνες και ο χρόνος που χρειάζεται ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο να ενεργοποιηθεί μετά τον σχηματισμό του, διαφέρει για κάθε ωοθυλάκιο (αρχική στρατολόγηση). Η μετατροπή ενός πρωτογενούς ωοθυλακίου σε δευτερογενές διαρκεί περίπου 120 ημέρες. Για να μετατραπεί ένα δευτερογενές ωοθυλάκιο σε γραφειανό, το οποίο περιέχει μια κοιλότητα με υγρό, το άντρο απαιτούνται 70 ημέρες μέσω της δράσης ενδοωοθηκικών παραγόντων και γοναδοτροπινών. Από εκεί και πέρα απαιτούνται άλλες 14 ημέρες ώστε ένα μόνο ωοθυλάκιο να γίνει επικρατές και να καταλήξει σε ωορρηξία. Αυτό το τελικό στάδιο ανάπτυξής του ωοθυλακίου εξαρτάται από τη γοναδοτροπίνη FSH. (κυκλική στρατολόγηση).^{23, 24, 25}



Εικόνα 5: Η στρατολόγηση των ωοθυλακίων.^{24,25}

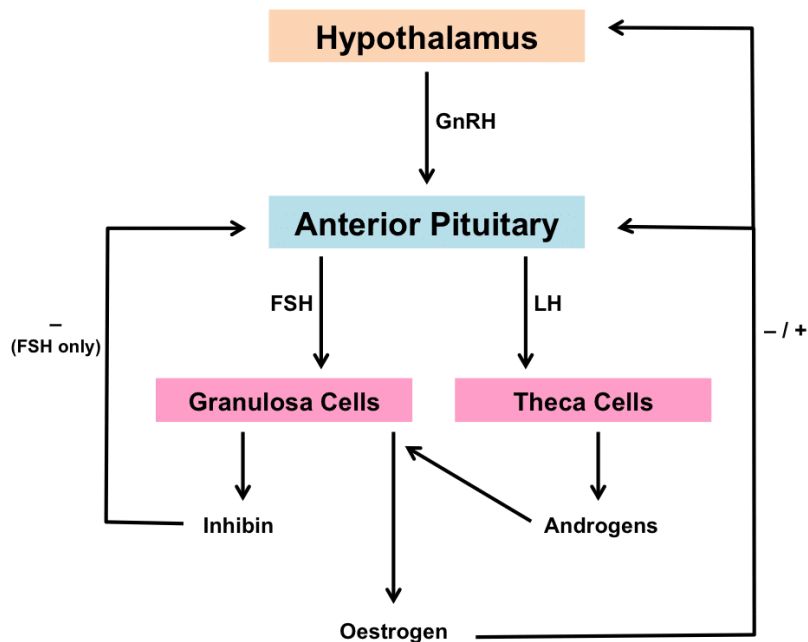
A.5. ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Το αναπαραγωγικό σύστημα μιας γυναίκας, σε αντίθεση με αυτό των ανδρών, παρουσιάζει μια σειρά από ορμονικές αλλαγές που συμβαίνουν κυκλικά κάθε μήνα από την εμμηναρχή σε ηλικία περίπου 10-15 χρονών μέχρι και την εμμηνόπαυση σε ηλικία περίπου 51 χρονών με σκοπό την προετοιμασία του σώματος για γονιμοποίηση και πιθανή εγκυμοσύνη. Στα πρωτεύοντα θηλαστικά και στον άνθρωπο, ο κύκλος είναι ένας εμμηνορροϊκός κύκλος και το πιο εμφανές χαρακτηριστικό του είναι η περιοδική κοιλιακή αιμορραγία που εμφανίζεται με την αποβολή του βλεννογόνου της μήτρας (έμμηνος ρύση).²⁶

Ο υποθάλαμος, η υπόφυση και οι ωοθήκες σχηματίζουν ένα ενδοκρινικό άξονα (Hypothalamus -Pituitary – Ovary axis , HPO axis), ο οποίος ρυθμίζει τον εμμηνορροϊκό κύκλο με ορμονικές μεταβολές και με αρνητικούς ή θετικούς βρόγχους ανατροφοδότησης των ορμονών. Αρχικά, η ορμόνη γοναδοεκλυτίνη (GnRH) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο με παλμικό τρόπο, μόλις ξεκινήσει η εφηβεία. Έπειτα, μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση και διεγείρει τα γοναδοτρόπα κύτταρα της , τα οποία συνθέτουν και εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες FSH (ωοθυλακιότροπος ορμόνη) και LH (ωχρινότροπος ορμόνη).²⁷

Οι ορμόνες αυτές μεταφέρονται στις ωοθήκες, και η LH δρα στα κύτταρα θήκης για την παραγωγή ανδρογόνων και προγεστερόνης ενώ η FSH δρα στα κοκκώδη κύτταρα για την παραγωγή οιστρογόνων (οιστραδιόλης). Καθώς τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης αυξάνονται στις ωοθήκες, ασκούν αρνητική ανάδραση στον υποθάλαμο και στην υπόφυση, για να ανασταλεί η έκκριση FSH και LH και να μειωθούν τα επίπεδά τους. Ωστόσο, κατά την διάρκεια της ωορρηξίας, μόλις παραχθεί μια κρίσιμη ποσότητα οιστρογόνων(17-βήτα-οιστραδιόλης), παρέχει θετική ανάδραση στην πρόσθια υπόφυση για την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων FSH και LH. Επιπλέον, τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν και άλλες ορμόνες, την ανασταλτίνη (inhibin) και την ακτιβίνη (activin), οι οποίες αναστέλλουν και διεγείρουν αντίστοιχα την έκκριση της FSH από την πρόσθια υπόφυση.²⁶

Επομένως, τα επίπεδα των γοναδοτροπινών και η χρονική στιγμή που εκκρίνονται, σχετίζονται με την αρνητική ανατροφοδότηση που ασκούν στον υποθάλαμο και την υπόφυση οι στεροειδείς ορμόνες (οιστραδιόλη και προγεστερόνη), καθώς και άλλοι παράγοντες όπως η ανασταλτίνη (inhibin) και η ακτιβίνη (activin).



Εικόνα 6 : Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση – ωοθήκες – HPO axis ²⁸

Ο εμμηνορροϊκός κύκλος μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις: την ωοθυλακική φάση ή φάση πολλαπλασιασμού και την ωχρινική ή εκκριτική φάση. Η διάρκεια ενός εμμηνορροϊκού κύκλου μετρείται από την πρώτη μέρα της εμμηνορροϊκής αιμορραγίας ενός κύκλου έως την έναρξη της εμμήνου ρύσεως του επόμενου κύκλου και στις περισσότερες γυναίκες είναι κατά μέσο όρο 28 ημέρες. Οι γυναίκες που εμφανίζουν καταμήνιο κύκλο που διαρκεί λιγότερο από 21 ημέρες έχουν πολυμηνόρροια, ενώ οι γυναίκες που εμφανίζουν παρατεταμένο κύκλο άνω των 35 ημερών, έχουν ολιγομηνόρροια.

Η ωοθυλακική φάση ξεκινά από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως μέχρι την ωορρηξία δηλαδή έως την 14η ημέρα του εμμηνορροϊκού κύκλου, με βάση τη μέση διάρκεια των 28 ημερών. Η μεταβλητότητα στη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου εμφανίζεται λόγω των διακυμάνσεων στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης, παρατηρείται πτώση της βασικής θερμοκρασίας του σώματος και ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η ωοθυλακιογένεση ξεκινά από τις τελευταίες ημέρες του προηγούμενου εμμηνορροϊκού κύκλου μέχρι την απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου κατά την ωοθυλακιωρρηξία. Η μείωση της παραγωγής των στεροειδών ορμονών από το ωχρο σωματίο και η δραματική πτώση της ιχνηπίνης Α επιτρέπει στην ωοθυλακιωτρόπο ορμόνη (FSH) να αυξηθεί κατά τις τελευταίες ημέρες του εμμηνορροϊκού κύκλου. Ακόμη, λόγω της μείωσης των επιπέδων οιστραδιόλης και προγεστερόνης στα τέλη του προηγούμενου κύκλου, η GnRH μπορεί να δράσει στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης και να επάγει την έκκριση της FSH.

Καθώς η ωοθυλακιωτρόπος ορμόνη FSH αυξάνεται, επιτυγχάνεται η στρατολόγηση ενός αριθμού ωοθυλακίων σε κάθε ωοθήκη, από τα οποία θα επιλεγεί

ένα ως επικρατές και θα υποστεί ωοθυλακιορρηξία. Η FSH, ενεργοποιεί στα κοκκώδη κύτταρα, το ένζυμο της αρωματάσης, το οποίο μπορεί να μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Λόγω της αρνητικής ανάδρασης των οιστρογόνων και των αρνητικών επιδράσεων της ιχνημπίνης Β που παράγεται από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, τα επίπεδα FSH αρχίζουν να μειώνονται. Η μείωση των επιπέδων της FSH οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής των ανδρογόνων μόνο στο επικρατές ωοθυλάκιο και έτσι εξασφαλίζεται και η επικράτηση του έναντι των γειτονικών ωοθυλακίων. Επίσης, τα κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων εκκρίνουν μια ποικιλία πεπτιδίων που μπορεί να παίζουν ρόλο στην αναστολή της ανάπτυξης των γειτονικών ωοθυλακίων.

Η ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου έχει περιγραφεί σε τρία στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν την στρατολόγηση των ωοθυλακίων, την επιλογή και την κυριαρχία του ωοθυλακίου που θα υποστεί ωοθυλακιορρηξία. Το στάδιο της στρατολόγησης των ωοθυλακίων λαμβάνει χώρα από την 1^η έως 4^η μέρα του εμμηνορροϊκού κύκλου. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, η FSH οδηγεί στη στρατολόγηση των ωοθυλακίων της κοόρτης από τη δεξαμενή των μη πολλαπλασιαζόμενων ωοθυλακίων. Μόνο ένα ωοθυλάκιο επιλέγεται από τη κοόρτη των συλλεγόμενων ωοθυλακίων για ωορρηξία και τα υπόλοιπα ωοθυλάκια θα υποστούν ατρησία. Αυτό λαμβάνει χώρα μεταξύ της 5^{ης} και 7^{ης} ημέρας του εμμηνορροϊκού κύκλου. Στην επιλογή του επικρατούς ωοθυλακίου, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η Αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH), που παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα. Μέχρι την 8^η ημέρα του κύκλου, ένα ωοθυλάκιο θα ασκήσει την κυριαρχία του έναντι των υπολοίπων προάγοντας τη δική του ανάπτυξη και καταστέλλοντας την ωρίμανση των άλλων ωοθυλακίων.

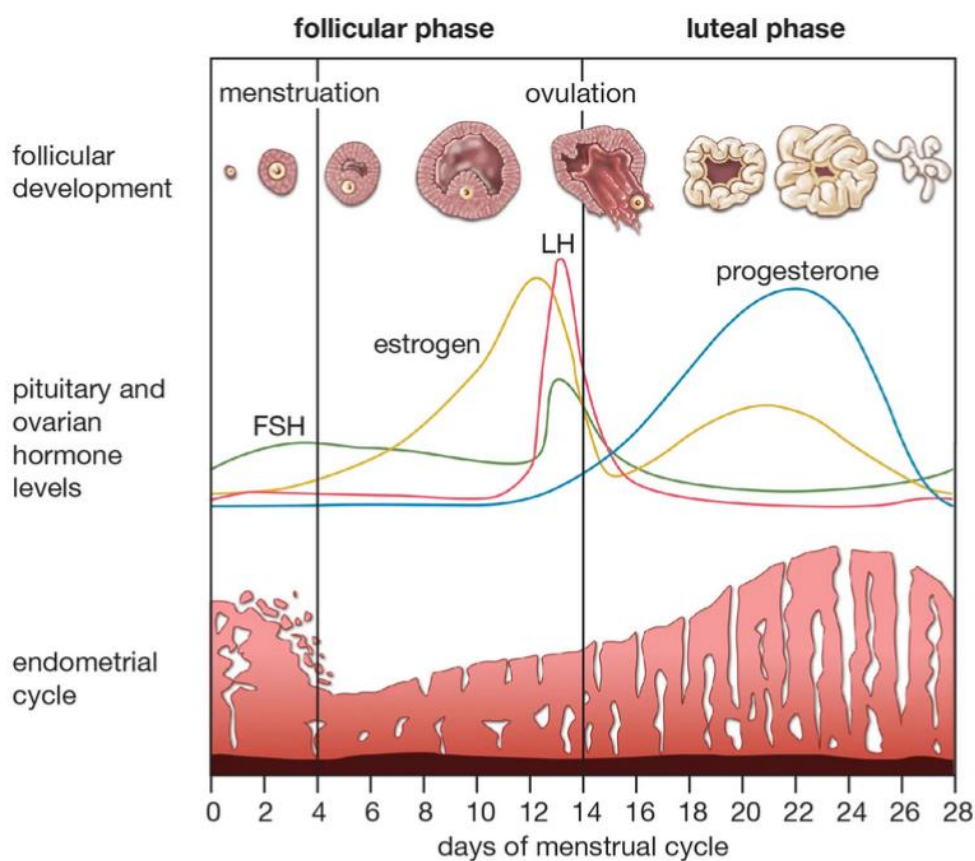
Οι υποδοχείς της FSH υπάρχουν αποκλειστικά στις μεμβράνες των κοκκωδών κυττάρων. Η αύξηση των επιπέδων της FSH κατά την όψιμη ωχρινική φάση οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της FSH και τελικά σε αύξηση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα. Η αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της FSH οφείλεται στην αύξηση του πληθυσμού των κοκκωδών κυττάρων και όχι στην αύξηση της συγκέντρωσης των υποδοχέων της FSH ανά κοκκώδες κύτταρο. Κάθε κοκκώδες κύτταρο έχει κατά μέσο όρο 1500 υποδοχείς FSH στο δευτερογενές στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων και ο αριθμός των υποδοχέων FSH παραμένει σχετικά σταθερός κατά την διάρκεια της υπόλοιπης ανάπτυξης. Η αύξηση της έκκρισης οιστραδιόλης προκαλεί την αύξηση των υποδοχέων της στα κοκκώδη κύτταρα. Παρουσία οιστραδιόλης, η FSH διεγείρει τον σχηματισμό υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα.

Στο τέλος της φάσης πολλαπλασιασμού, τα επίπεδα οιστραδιόλης είναι σε υψηλά επίπεδα λόγω της ωρίμανσης των ωοθυλακίων και της αυξημένης παραγωγής της ορμόνης. Μόνο κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η οιστραδιόλη παρέχει θετική ανατροφοδότηση για την παραγωγή της FSH και της LH. Αυτό συμβαίνει όταν τα επίπεδα της οιστραδιόλης υπερβούν μια κατωφλιακή τιμή πάνω από 200 pg/ml. Τα υψηλά επίπεδα FSH και LH που υπάρχουν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου

ονομάζονται κύμα LH. Ως αποτέλεσμα της αιχμής της LH, το ώριμο ωοθυλάκιο σπάει και ένα ωκύτταρο απελευθερώνεται. Η ωορρηξία συμβαίνει περίπου 10-12 ώρες μετά την κορύφωση της LH. Στο τέλος της ωορρηξίας τα επίπεδα της οιστροδιόλης πέφτουν .

Η ωχρινική φάση διαρκεί περίπου 14 ημέρες στις περισσότερες γυναίκες . Μετά την ωορρηξία, τα εναπομείναντα κοκκιώδη κύτταρα που δεν απελευθερώνονται με το ωκύτταρο συνεχίζουν να αυξάνονται σε μέγεθος και γεμίζουν με μια κίτρινη χρωστική ουσία που ονομάζεται λουτεΐνη. Τα ωχρινοποιημένα κοκκιώδη κύτταρα μαζί με τα κύτταρα θήκης σχηματίζουν μία δομή που ονομάζεται ωχρο σωματίο . Το ωχρο σωματίο είναι ένα παροδικό ενδοκρινικό όργανο που εκκρίνει κυρίως προγεστερόνη και μικρότερες ποσότητες οιστρογόνων και η κύρια λειτουργία του είναι να προετοιμάσει το ενδομήτριο για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Η προγεστερόνη που διεγείρεται από την LH είναι η κυρίαρχη ορμόνη κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης.

Καθώς η ωχρινική φάση ολοκληρώνεται, αν δεν συμβεί γονιμοποίηση, η προγεστερόνη ασκεί αρνητική ανατροφοδότηση στην πρόσθια υπόφυση και μειώνει τα επίπεδα της FSH και της LH και τα επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Αυτή η πτώση των ορμονών δίνει το έναυσμα για την έναρξη του νέου κύκλου και την εκ νέου αύξηση των επιπέδων της FSH, ενώ το ωχρο σωματίο αποπίπτει. Σε περίπτωση που το γονιμοποιημένο ωάριο εμφυτευθεί στο ενδομήτριο, το ωχρο σωματίο θα διατηρήσει τα επίπεδα των ορμονών και δεν θα χαθεί.^{29,30} Τα ανθρώπινα έμβρυα παράγουν ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG, η οποία έχει παρόμοια δομή με την ωχρινότροπο ορμόνη LH , και μπορεί να διατηρήσει το ωχρο σωματίο. Η ορμόνη αυτή είναι μοναδική για το έμβρυο και για αυτό οι περισσότερες εξετάσεις εγκυμοσύνης βασίζονται στην ανίχνευση της. Επίσης, αν επιτευχθεί εμφύτευση, το ωχρο σωματίο θα συνεχίσει να παράγει προγεστερόνη και να διατηρεί υψηλές τις βασικές θερμοκρασίες του σώματος μέχρι και 12 εβδομάδες, ενώ μετά αναλαμβάνει ο πλακούντας, αυτή την λειτουργία .^{29,31}



Εικόνα 7 : Ο εμμηνορυσιακός κύκλος και οι ορμονικές μεταβολές .³²

Α.6 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Α.6.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ

Ως υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία ενός ζευγαριού να τεκνοποιήσει ύστερα από 12 ή και περισσότερους μήνες τακτικής σεξουαλικής επαφής χωρίς αντισυλληπτική προστασία.³³ Υπολογίζεται ότι η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 8- 12% των ζευγαριών αναπαραγωγικής ηλικίας παγκοσμίως.³⁴ Δυστυχώς, σε παγκόσμιο επίπεδο, το ποσοστό υπογονιμότητας αυξάνεται αρκετά τα τελευταία χρόνια λόγω διαφορετικών παραγόντων. Το 30-35 % των περιπτώσεων

υπογονιμότητας οφείλονται σε γυναικίους παράγοντες, ενώ το 30-40 % των περιπτώσεων οφείλονται σε ανδρικούς παράγοντες. Το 20 % οφείλεται στο συνδυασμό των παραπάνω ή έχουν αδιευκρίνιστα αίτια.³⁵

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Ως πρωτογενής υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού να συλλάβει, όταν δεν έχει συλλάβει ποτέ, ενώ η δευτερογενής υπογονιμότητα αναφέρεται στην αδυναμία σύλληψης από ένα ζευγάρι που έχει συλλάβει στο παρελθόν ανεξάρτητα από την έκβαση της σύλληψης. Με μεγαλύτερη συχνότητα φαίνεται να εμφανίζεται η δευτερογενής υπογονιμότητα.

Σήμερα από το σύνολο των υπογόνιμων ζευγαριών, περίπου το 85% έχουν κάποια αναγνωρίσιμη αιτία, ενώ μόνο το υπόλοιπο 15% αναγνωρίζονται από μη ανεξήγητη υπογονιμότητα. Η γονιμότητα μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από τον τρόπο ζωής του ατόμου π.χ. κάπνισμα, παχυσαρκία, χρήση νικοτίνης, αλκοόλ, κατάχρηση καφεΐνης, από περιβαλλοντικούς παράγοντες, από ανδρικούς παράγοντες υπογονιμότητας και από γυναικίους. Συγκεκριμένα στις γυναίκες οι παράγοντες που είναι δυνατό να οδηγήσουν σε μειωμένη γονιμότητα είναι η δυσλειτουργία των ωοθηκών (π.χ PCOS, πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια), η δυσλειτουργία του υποθαλάμου ή της υπόφυσης, ο σαλπινγικός παράγοντας, οι διαταραχές της μήτρας ή του κόλπου, η ενδομητρίωση, τα αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και η ηλικία της γυναίκας.^{36,37, 38}

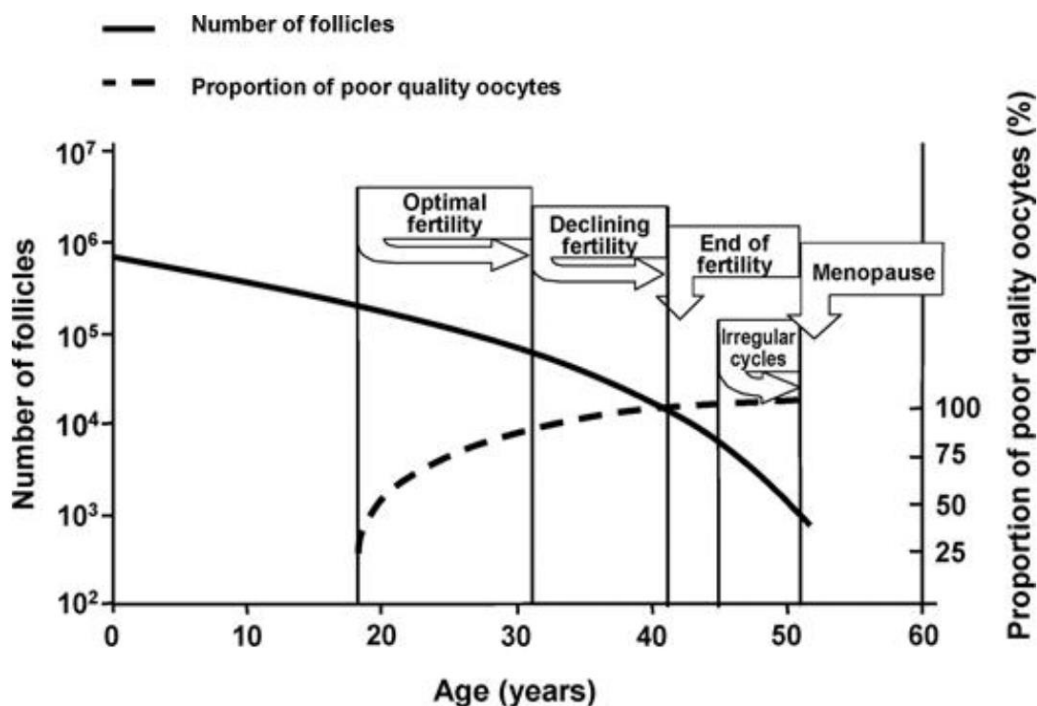
A.6.2 ΗΛΙΚΙΑ

Είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό ότι όσο αυξάνεται η ηλικία μιας γυναίκας, μειώνεται η γονιμότητα της, δηλαδή η ικανότητα παραγωγής απογόνων, και αυτό ισχύει για τις περισσότερες γυναίκες. Το ποσοστό των γυναικών που αδυνατούν να τεκνοποιήσουν αυξάνεται προοδευτικά με την αύξηση της ηλικίας και ανέρχεται στο 6% για γυναίκες ηλικίας 20 έως 24 ετών, 9% για γυναίκες ηλικίας 25 έως 29 ετών, 15% για γυναίκες ηλικίας 30 έως 34 ετών, 30% για γυναίκες ηλικίας 35 έως 39 ετών και 64% για γυναίκες άνω των 40 ετών.

Αν και η γονιμότητα μειώνεται με την ηλικία τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών, ο κίνδυνος υπογονιμότητας έχει ισχυρότερη συσχέτιση με την ηλικία της μητέρας. Τα αίτια της υπογονιμότητας που σχετίζονται με την ηλικία είναι πολυπαραγοντικά. Καθώς αυξάνεται η ηλικία της γυναίκας, μειώνεται τόσο ο αριθμός των ωοθυλακίων όσο και ο αριθμός και η ποιότητα των ωαρίων. Επίσης, το ποσοστό των αποβολών και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυξάνεται. Ωστόσο οι μοριακοί μηχανισμοί πίσω από την σταδιακή πτώση του ωοθυλακικού αποθέματος και τη μειωμένη ποιότητα και ποσότητα των ωαρίων δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η γήρανση συνδέεται επίσης με την αύξηση των διαταραχών που μπορούν να

βλάψουν την γονιμότητα μιας γυναίκας όπως είναι οι σαλπινγικές παθήσεις, τα λειομυώματα και η ενδομητρίωση.^{39,40}

Οι ωοθηκικές εφεδρείες σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία. Μια γυναίκα είναι γνωστό ότι γεννιέται με περίπου 2.000.000 αρχέγονα ωοθυλάκια, αλλά ήδη από την έναρξη της έμμηνου ρήσεως έχουν απομείνει περίπου 400.000, λόγω της φυσιολογικής ατρησίας των ωοθυλακίων. Στα μέσα της ηλικίας των 30 ετών, ο ρυθμός μείωσης των ωοθυλακίων αυξάνεται σημαντικά και έως τα τέλη της δεκαετίας των 30 τα εναπομείναντα ωοθυλάκια είναι περίπου 25.000. Στη συνέχεια καθώς συνεχίζεται η μείωση, ακολουθεί η εμμηνόπαυση. Είναι λογικό λοιπόν, με την ηλικία, το απόθεμα των ωοθηκών να μειώνεται φυσικά και φυσιολογικά, χωρίς παθολογικές αλλαγές, αφού γυναίκες σε μεταγενέστερα στάδια έχουν φυσιολογικά χαμηλότερο ωοθηκικό απόθεμα, σε σχέση με γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Η μείωση αυτή των ωοθηκικών αποθεμάτων είναι μία μη αναστρέψιμη κατάσταση, ενώ ο ρυθμός μείωσης αυτών ποικίλλει ανάμεσα στις γυναίκες. Η διαδικασία της αναπαραγωγικής γήρανσης βασίζεται στο γεγονός ότι τα ωάρια βρίσκονται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την εμβρυική ηλικία, ενώ στη συνέχεια υφίστανται ωορρηξία και ατρησία και δεν αναγεννούνται, με αποτέλεσμα την εξάντληση των ωοθηκικών εφεδρειών και τη σηματοδότηση της εμμηνόπαυσης. Όσον αφορά τη μείωση της ποιότητας και του αριθμού των ωαρίων, που σχετίζεται με την ηλικία, δεν υπάρχει κάποια θεραπεία διότι προς το παρόν, δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί. Ωστόσο, η πτώση και η μετέπειτα απώλεια της γυναικείας γονιμότητας αποτελεί ένα εξελικτικό παράδοξο.^{39, 40,41}



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων που υπάρχουν στις ωοθήκες και της ποιότητας των ωαρίων σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας και τα αντίστοιχα αναπαραγωγικά συμβάντα.⁴⁰

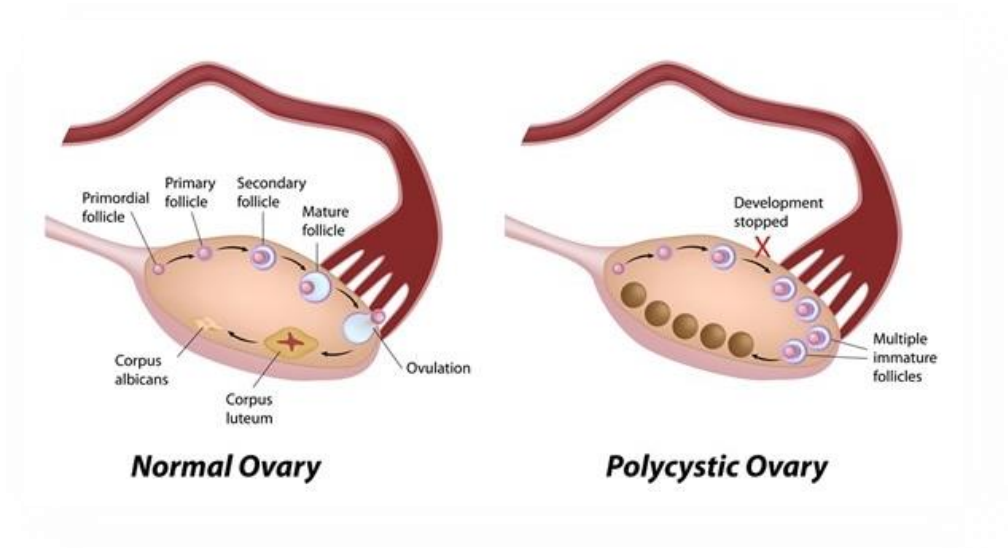
A.6.3 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ (POLYCYSTIC OVARY SYNDROME –PCOS)

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια ενδοκρινική και αναπαραγωγική διαταραχή που επηρεάζει το 7 έως 15% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Stein και Leventhal το 1935. Η αιτιολογία του συνδρόμου PCOS, είναι πολυπλοκή και παραμένει μέχρι και σήμερα αμφιλεγόμενη. Συμπεριλαμβάνει γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής της γυναίκας. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ανδρογόνων, από αμηνόρροια ή ολιγομηνόρροια και μικρές κύστες στη μία ή και στις δύο ωοθήκες. Με άλλα λόγια, οι μη φυσιολογικές ορμονικές διαταραχές, δηλαδή τα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης, τον σχηματισμό μικροκύστεων στις ωοθήκες, αδυναμία ωορρηξίας και ακανόνιστο εμμηνορρυσιακό κύκλο. Είναι η πιο κοινή αιτία μη ωορρηξίας στις γυναίκες, και τις καθιστά υπογόνιμες. Υπολογίζεται ότι το 70 με 80 % των γυναικών που πάσχουν από πολυκυστικές ωοθήκες είναι υπογόνιμες.^{42,43,44}

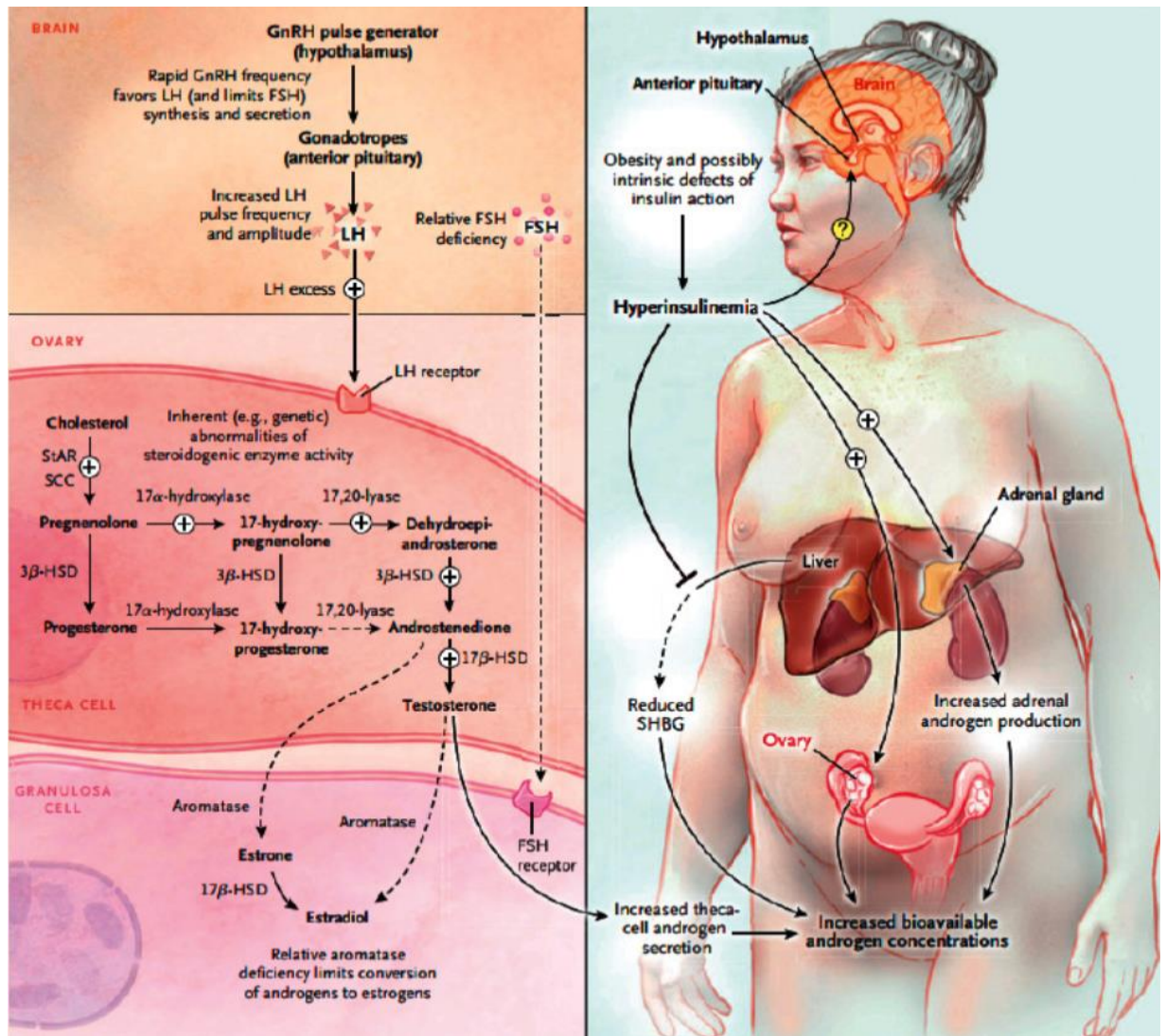
Η παθογένεση του συνδρόμου PCOS οφείλεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων, τα οποία προκύπτουν λόγω των υψηλών επιπέδων των ορμονών LH και GnRH, καθώς ο άξονας του υποθαλάμου και της υπόφυσης διαταράσσεται. Η έκκριση της γοναδοτροπίνης (GnRH) που απελευθερώνεται παλμικά από τον υποθάλαμο διαταράσσεται στις γυναίκες με PCOS. Η γοναδοτροπίνη (GnRH) εκκρίνεται συνεχώς, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται αυξημένα επίπεδα της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) ενώ η έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) είναι ανεπαρκής. Αυτό οδηγεί σε αυξημένες εκκρίσεις των ανδρογόνων και δυσλειτουργία ωορρηξίας. Τα ωοθυλάκια στις πολυκυστικές ωοθήκες παγιδεύονται σε ένα ανώριμο στάδιο και δεν υπάρχει η δυνατότητα ωορρηξίας. Με άλλα λόγια, η υπερανδρογοναιμία διακόπτει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και του κυρίαρχου ωοθυλακίου και οδηγεί σε ολιγο – αμηνόρροια.

Καθώς όμως, το ανθρώπινο σώμα είναι ένα πολύπλοκο σύστημα και οι μεταβολίτες είναι λειτουργικά αλληλένδετοι, η διαταραχή σε έναν μεταβολίτη μπορεί να επηρεάσει και τους άλλους. Έτσι, προκύπτουν διαταραχές και σε άλλες ορμόνες όπως προλακτίνη, αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH), κορτιζόλη, νευροδιαβιβαστές (ντοπαμίνη), πεπτίδια, λιπίδια, πρωτεΐνες και γλυκόζη που σχετίζονται με την εκδήλωση PCOS. Επίσης, η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι ένα σύμπτωμα που εμφανίζεται στις γυναίκες με PCOS. Έχει ως αποτέλεσμα

υπερινσουλιναίμια , δηλαδή αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και μπορεί να οδηγήσει σε σακχαρώδη διαβήτη. Τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης ευθύνονται και για την εναπόθεση λίπους γύρω από την κοιλιά. Στην πλειονότητα των γυναικών με PCOS, ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι 30 ή μεγαλύτερος. Η αύξηση της ινσουλίνης οδηγεί στην μείωση της ορμόνης SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) στο ήπαρ, μία κατάσταση στην οποία επίσης προάγεται η σύνθεση ανδρογόνων. ^{45,46,47}



Εικόνα 9 : Το Σύνδρομο των Πολυκυστικών Ωοθηκών . ⁴⁸



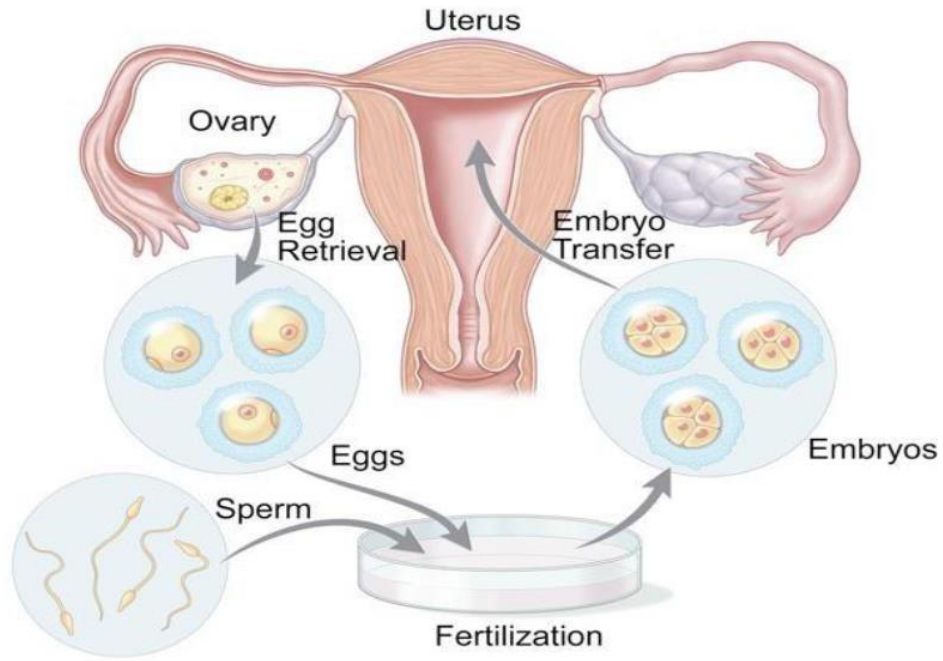
Εικόνα 10 : Ο μηχανισμός υπερπαραγωγής ανδρογόνων στο σύνδρομο PCOS . ⁴⁶

A.6.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

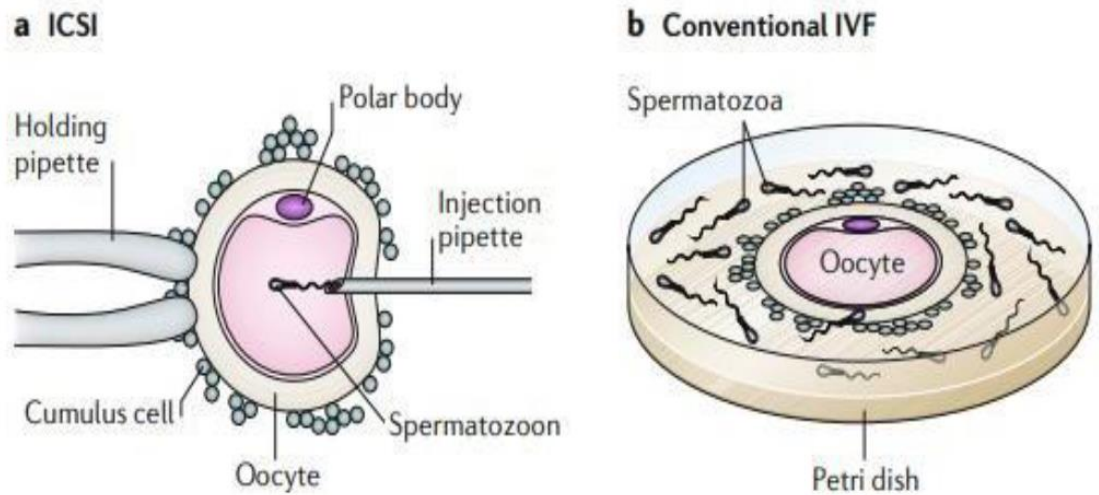
Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η υπογονιμότητα είναι ένα ολοένα και αυξανόμενο πρόβλημα υγείας που επηρεάζει περίπου το 10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και χρήζει θεραπείας από τα μέλη της επιστημονικής κοινότητας.⁴⁹ Στις 25 Ιουλίου του 1978, γεννήθηκε στο Νοσοκομείο Όλνταμ της Αγγλίας το πρώτο παιδί που ήρθε στον κόσμο με εξωσωματική γονιμοποίηση το οποίο έμεινε στην ιστορία ως "το πρώτο παιδί του σωλήνα". Αυτή ήταν η αρχή για την ανάπτυξη μιας θεραπείας της υπογονιμότητας με βάση την οποία εκτιμάται ότι σχεδόν 40 χρόνια μετά έχουν γεννηθεί πάνω από 5,4 εκατομμύρια παιδιά.⁵⁰

Ο όρος τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ART περιλαμβάνει όλες τις μεθόδους, συμπεριλαμβανομένου του in vitro χειρισμού ανθρώπινων ωαρίων, σπερματοζωαρίων και εμβρύων για σκοπούς αναπαραγωγής. Μεταξύ αυτών των παρεμβάσεων είναι και η in vitro γονιμοποίηση (IVF), η εμβρυομεταφορά (ET), η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος, και η κρυοσυντήρηση είτε γαμετών είτε εμβρύων. Ο ευρύτερος όρος ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (MAR) αναφέρεται επίσης σε μεθόδους γονιμοποίησης, είτε με σπέρμα συντρόφου ή σπέρμα δότη.⁵¹

Η πιο γνωστή και κοινή μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η εξωσωματική γονιμοποίηση (In Vitro Fertilization – IVF) κατά την οποία τα ωάρια αφού ωριμάσουν in vivo στην ωοθήκη, γονιμοποιούνται «in vitro» σε ένα τρυβλίο Petri, έξω από το σώμα και το ζυγωτό εμφυτεύεται στη συνέχεια στη μήτρα όπου εξελίσσεται σε έμβρυο.⁵² Άλλες μέθοδοι που δεν είναι τόσο διαδεδομένες είναι η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών (Gamete intrafallopian transfer – GIFT), η οποία μοιάζει με τη διαδικασία της φυσιολογικής σύλληψης αφού η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα στο σώμα της γυναίκας καθώς το σπέρμα με το ωάριο μεταφέρονται στη σάλπιγγα της γυναίκας για να γίνει η γονιμοποίηση και η ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτών, στην οποία το ζυγωτό μεταφέρεται απευθείας στη σάλπιγγα. Όσον αφορά, την ενδοκυτταροπλασματική σπερματέγχυση (Intracytoplasmic Sperm Injection – ICSI), περιλαμβάνει την ένεση ενός μόνο σπερματοζωαρίου σε ένα κυτταρόπλασμα ωοκυττάρου χρησιμοποιώντας μια γυάλινη μικροπιπέτα. Η συγκεκριμένη μέθοδος μαζί με την IVF αποτελούν τις πιο διαδεδομένες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η μέθοδος εισήχθη αρχικά το 1992 ως τροποποίηση της συμβατικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και η ανάπτυξη της, είναι ίσως ένα από τα πιο εκπληκτικά επιτεύγματα στον τομέα της τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, καθώς επιτρέπει σε άνδρες με χαμηλή ποσότητα και ποιότητα σπέρματος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με αζωοσπερμία, να γίνουν βιολογικοί γονείς.^{53,54,55}



Εικόνα 11 : Σχηματική αναπαράσταση της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) . ⁵⁶



Εικόνα 12: Η διαδικασία της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (αριστερά) σε αντιπαράθεση με την κλασική τεχνική της εξωσωματικής γονιμοποίησης (δεξιά). ⁵⁷

A.6.5 ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής IVF και ICSI περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

Στάδιο 1^ο:

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται καταστολή (down regulation) της υποφυσιακής λειτουργίας, με την χρήση φαρμάκων προκειμένου να διακοπεί η παραγωγή και η έκλυση της FSH και της LH από τον υποθάλαμο. Αυτό συμβαίνει για να διακοπούν οι ορμονικές εναλλαγές που συμβαίνουν κατά την μηνιαία απελευθέρωση του ωοκυττάρου από της ωοθήκης της γυναίκας και να καθοριστεί με ακρίβεια η μέρα της ωορρηξίας . Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρησιμοποιούνται αγωνιστές της ορμόνης γοναδοεκλυτίνης GnRH (φάρμακο Daronda) ή ανταγωνιστές της ορμόνης γοναδοεκλυτίνης GnRH (φάρμακο Cetrotide).

Οι αγωνιστές GnRH έχουν παρόμοια χημική δομή με την ορμόνη GnRH και προσδένονται παρατεταμένα στους υποδοχείς της . Με τον τρόπο αυτό, μειώνονται οι διαθέσιμες θέσεις για την ορμόνη GnRH, οπότε δεν μπορεί να προσδεθεί και να ασκήσει την δράση της στα γοναδοτρόπα κύτταρα του υποθαλάμου και έτσι διακόπτεται η έκλυση των γοναδοτροπινών από αυτά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσα σε 2-3 εβδομάδες για την καταστολή της λειτουργίας της υπόφυσης και αξιολογείται με την μέτρηση των επιπέδων της οιστραδιόλης E2 και της ωχρινότροπου ορμόνης LH στον ορό του αίματος και με την παρατήρηση της στρώματος της μήτρας. Οι αγωνιστές GnRH χορηγούνται συνήθως στο τέλος του προηγούμενου κύκλου για τον λόγο ότι απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να προκαλέσουν την απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της GnRH.

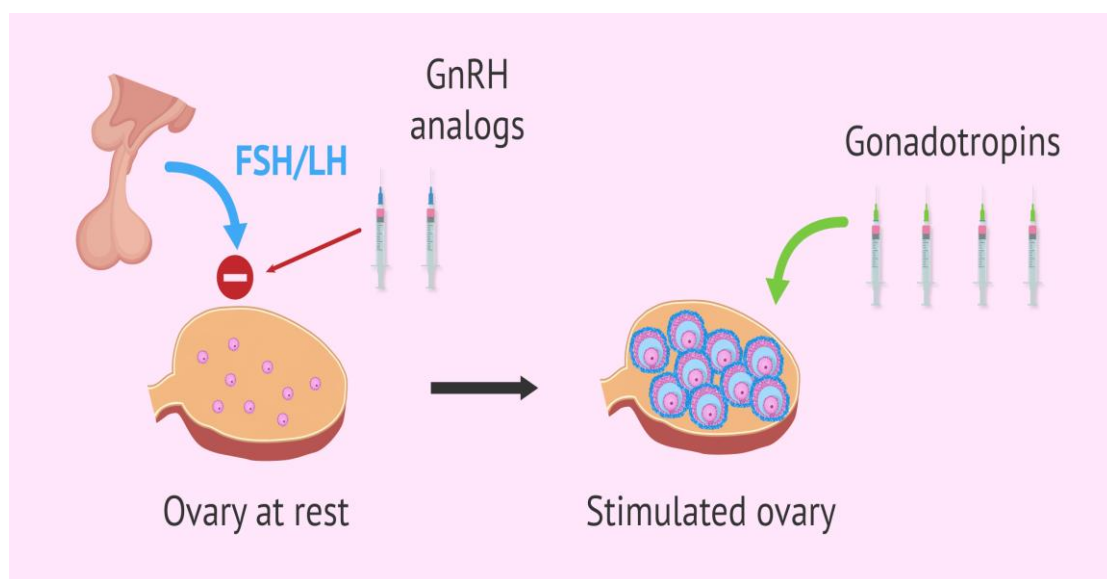
Οι ανταγωνιστές GnRH, όπως αναφέρει και το όνομά τους, ανταγωνίζονται την φυσική ορμόνη GnRH για την πρόσδεση στους υποδοχείς της και καταλαμβάνουν σχεδόν αμέσως μετά την χορήγησή τους τις θέσεις πρόσδεσης της GnRH. Έτσι οι υποδοχείς απενεργοποιούνται άμεσα και οδηγούν στην καταστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών και την ωορρηξία. Οι ανταγωνιστές χορηγούνται για 3-6 ημέρες προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης μέχρι την χορήγηση της hCG και σχεδόν ταυτόχρονα με τις γοναδοτροπίνες καθώς η δράση τους είναι άμεση στην διακοπή της πρόωρης ωορρηξίας .

Υπάρχουν 3 βασικά πρωτόκολλα πολλαπλής ανάπτυξης των ωοθυλακίων και αυτά είναι το μακρύ και το βραχύ , τα οποία διαφέρουν ως προς την περίοδο χορήγησης της GnRH και το πρωτόκολλο των ανταγωνιστών . Η επιλογή του πρωτοκόλλου γίνεται ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του κύκλου της κάθε γυναίκας, την ανταπόκριση των ωοθηκών σε προηγούμενες προσπάθειες, την ηλικία και

άλλους παράγοντες που αξιολογεί ο ιατρός. Για παράδειγμα, το βραχύ πρωτόκολλο επιλέγεται κυρίως για γυναίκες με πτωχή ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων.

Στάδιο 2^ο:

Το επόμενο στάδιο είναι η χορήγηση γοναδοτροπινών προκειμένου να διεγερθούν οι ωοθήκες της γυναίκας και να παραχθούν πολλά ώριμα ωοκύτταρα για να γονιμοποιηθούν. Για το σκοπό αυτό μπορούν να χορηγηθούν δύο είδη σκευασμάτων τα οποία είναι είτε ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτοπίνες (human Menopausal Gonadotrophins, hMG) που αντιστοιχούν στο φάρμακο Menopure -Meriofert και προέρχονται από τα ούρα μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών και περιέχουν τόσο FSH και LH , είτε ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες (rec-FSH) που αντιστοιχούν στο φάρμακο Gonal F και παράγονται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ωοθήκης χάμστερ και περιέχουν μόνο FSH . Οι γοναδοτροπίνες χορηγούνται ημερησίως με ενέσιμη μορφή για 10-12 ημέρες για την διέγερση των ωοθηκών και ανάλογα και με τις ανάγκες της κάθε γυναίκας απαιτούνται 150-450 IU ημερησίως για την απόκτηση ώριμων ωοκυττάρων .



Εικόνα 13: Στάδιο καταστολής της υπόφυσης μέσω αναλόγων GnRH και στάδιο διέγερσης των ωοθηκών μέσω γοναδοτροπινών .⁶⁰

Στάδιο 3^ο:

Όταν τουλάχιστον 3 ωοθυλάκια φτάσουν το μέγεθος των 18 mm, η χορήγηση των ορμονών σταματάει και ξεκινάει η χορήγηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) προκειμένου να επαχθεί ωορρηξία καθώς λόγω της ομοιότητας της με την LH μπορεί να προσδεθεί στους υποδοχείς της και να μιμηθεί την δράση της προκαλώντας ωοθυλακιωρρηξία μέσα στο διάστημα των 36 ωρών. Χορηγείται σε ενέσιμη μορφή μία δόση (5000–10000 IU) της hCG και 36 ώρες μετά την χορήγησή της πραγματοποιείται η ωοληψία. Η ανάκτηση ωαρίων πραγματοποιείται με χρήση υπερηχογραφικής καθοδήγησης διακολπικής αναρρόφησης και ενδοφλέβιας καταστολής. Οι ωοθήκες απεικονίζονται χρησιμοποιώντας έναν κολπικό καθετήρα υπερήχων και ένας προσαρτημένος οδηγός βελόνας βοηθά τον γιατρό να κατευθύνει τη βελόνα σε κάθε ωοθυλάκιο και να αναρροφήσει το ωοκύτταρο και το ωοθυλακικό υγρό. Στην συνέχεια ακολουθεί η γονιμοποίηση των ωαρίων είτε με την τεχνική IVF κατά την οποία πενήντα έως εκατό χιλιάδες σπερματοζωάρια επώάζονται με ένα ωάριο για 12-18 ώρες σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό σε επωαστήριο, είτε με την τεχνική ICSI κατά την οποία ένα ακινητοποιημένο σπέρμα εγχέεται απευθείας στο ωάριο και αυτό παρακάμπτει την ανάγκη για το σπέρμα να διεισδύσει στη διαφανή ζώνη της γλυκοπρωτεΐνης που περιβάλλει το ωοκύτταρο .

Στάδιο 4^ο:

Μετά την γονιμοποίηση των ωαρίων από τα σπερματοζωάρια, τα έμβρυα που θα προκύψουν, θα εισαχθούν με την βοήθεια καθετήρα στην μήτρα υπό διακοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση. Τα γονιμοποιημένα έμβρυα μεταφέρονται στο στάδιο της διάσπασης (3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση) ή στο στάδιο της βλαστοκύστης (5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση). Ο αριθμός των εμβρύων που θα μεταφερθούν θα εξαρτηθεί από το στάδιο του εμβρύου, την ποιότητα του εμβρύου, την ηλικία της μητέρας και την προτίμηση του ασθενούς.

Επίσης, μετά την διαδικασία της εμβρυομεταφοράς, χορηγείται στην γυναίκα προγεστερόνη για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης, την αναπτυξη και διατήρηση του ωχρού σωματίου .^{49, 55,58,59}

A.7 ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Στόχος των κέντρων εξωσωματικής γονιμοποίησης αποτελεί η όσο το δυνατόν καλύτερη ανάπτυξη των εμβρύων *in vitro*, προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση στα ποσοστά γέννησης ζώντων νεογνών.⁶¹ Γι' αυτόν τον λόγο γίνεται προσπάθεια εύρεσης μορίων δεικτών που αντανακλούν την ποιότητα των ωαρίων, και μπορούν να προβλέψουν την εν δυνάμει αναπτυξιακή τους πορεία σε έμβρυα ικανά προς επίτευξη κύησης. Οι κλασσικές μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας των ωαρίων στηρίζονται σε μορφολογικά κριτήρια, αλλά η χρήση τους δε μπορεί να προβλέψει την αναπτυξιακή πορεία του ωαρίου⁶² και έτσι προέκυψε η ανάγκη για πιο αντικειμενικούς και ακριβείς δείκτες, όπως για παράδειγμα, παράγοντες των κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο και παράγοντες του ωοθυλακικού υγρού.

Τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για την ωοθυλακιογένεση, καθώς παράγουν σημαντικούς παράγοντες (όπως στεροειδή και αυξητικούς παράγοντες) για την ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμανση. Η επικοινωνία ωοκυττάρου-κοκκωδών κυττάρων είναι διπλής κατεύθυνσης και θεμελιώδους σημασίας για τη σωστή λειτουργία και ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς τα κοκκώδη κύτταρα μεταφέρουν σήματα για την αύξηση του ωοκυττάρου και αντίστροφα το ωοκύτταρο εκκρίνει παράγοντες που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων, καθορίζεται από το ρυθμό πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται απόπτωση. Για αυτό ακριβώς, θεωρείται απόλυτα λογικό η απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων αλλά και τα χαρακτηριστικά του ωοθυλακικού υγρού να αποτελούν προγνωστικούς δείκτες του αναπτυξιακού δυναμικού των ωοκυττάρων. Οι παράγοντες των κοκκωδών κυττάρων και αυτοί που εκκρίνονται στο ωοθυλακικό υγρό είναι ιδανική πηγή μη επεμβατικών προγνωστικών παραγόντων.^{63,64}

A.7.1 ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Το ωοθυλακικό υγρό έχει διαπιστωθεί ότι σε κάποιο βαθμό βρίσκεται σε ισορροπία με το κυκλοφορικό σύστημα.⁶⁵ Είναι παράγωγο της μεταφοράς των συστατικών από το πλάσμα του αίματος, που διαπερνούν το ωοθυλακικό φραγμό (blood follicular barrier) αλλά και παράγωγο των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης μέσω ενεργής έκκρισης.

Το ωοθυλακικό υγρό παρέχει ένα πολύ σημαντικό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Μερικά βιοχημικά χαρακτηριστικά του παίζουν

καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του ωαρίου αλλά και στο δυναμικό του για επιτυχία γονιμοποίησης και εμβρυικής ανάπτυξης.

Το υγρό αυτό είναι εύκολα διαθέσιμο καθώς αναρροφάται μαζί με το ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της ωοληψίας στις τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης χωρίς να διακυβεύεται το ωάριο. Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί μελέτη του περιεχομένου του ωοθυλακικού υγρού με σκοπό τον προσδιορισμό μιας ή περισσότερων ουσιών που προέρχονται από διαφορετικά ωοθυλάκια και που συνδέονται με την τύχη των ωοκυττάρων αυτών για την ανάπτυξη βιοδεικτών. Όμως, για να μπορέσουμε να συσχετίσουμε την ποιότητα του ωαρίου με τις ουσίες που συναντώνται στο ωοθυλακικό υγρό καθίσταται αναγκαία η αναρρόφηση κάθε φορά ενός μόνο ωοθυλακίου.

Δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο εάν η συγκέντρωση μιας δεδομένης ουσίας στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζεται με την ποιότητα του ωοθυλακίου και κατ' επέκταση με την ποιότητα του ωαρίου ή με τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς όπως η ηλικία, το κάπνισμα ή ο τύπος της διέγερσης των ωοθηκών γι' αυτό είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών για τη διασαφήνιση αυτής της συσχέτισης.

Τα χημικά συστατικά του ωοθυλακικού υγρού μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες που περιλαμβάνουν ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες της οικογένειας TGF- beta, άλλους αυξητικούς παράγοντες, ιντερλευκίνες, αντι-αποπτωτικούς παράγοντες, πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα, δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), σάκχαρα, προστανοειδή.

Όλες αυτές οι ενώσεις αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές της επικοινωνίας μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων στο ωοθυλάκιο με άντρο και μπορούν και να συνιστούν θρεπτικά συστατικά που μεταφέρονται στο ωοκύτταρο. Καθώς λοιπόν, το ωοθυλακικό υγρό περιλαμβάνει συστατικά που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη, την ωρίμανση και την ποιότητα του ωοκυττάρου, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό μέσο στις τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης.^{66,67}

A.7.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Ορμόνες

Γοναδοτροπίνες

Οι ενδοθυλακικές συγκεντρώσεις της FSH και της LH καθορίζονται από τα επίπεδα κυκλοφορίας τους στο αίμα. Στους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης οι

συγκεντρώσεις αυτές καθορίζονται από την ποσότητα γοναδοτροπινών που χορηγούνται εξωγενώς και από το βαθμό καταστολής της υπόφυσης ενώ η έκκριση ενδογενών γοναδοτροπινών είναι σχετικά μειωμένη .

Υψηλές συγκεντρώσεις των FSH, hCG και LH φάνηκε πως προάγουν την ωρίμανση των ωαρίων και σχετίζονται με έμβρυα καλής ποιότητας που έχουν πολλές πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης .⁶⁷ Ακόμη βρέθηκε πως η LH του ωοθυλακικού υγρού ήταν υψηλότερη στα ωοθυλάκια που περιείχαν ωάρια που κατέληξαν σε επιτυχείς προσπάθειες IVF.⁶⁸

Αυξητική ορμόνη (GH)

Η αυξητική ορμόνη (GH) ενισχύει την παραγωγή οιστραδιόλης E2 στα κοκκιώδη κύτταρα η οποία εξαρτάται από την FSH καθώς και τον σχηματισμό των υποδοχέων FSH και LH στα κύτταρα αυτά. Καθώς η σύνθεση της ορμόνης GH πραγματοποιείται στα ωοθυλάκια, η ορμόνη αυτή μπορεί να δράσει σε συνεργασία με τις γοναδοτροπίνες για να αυξήσουν τα επίπεδα οιστρογόνων στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου οδηγώντας σε καλύτερης ποιότητας ωοκύτταρα .

Παρόλο που η ορμόνη GH έχει εντοπιστεί στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε IVF, δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση των επιπέδων συγκέντρωσης της ενδοθυλακικής ορμόνης GH με την έκβαση της εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά μεταξύ τους καθώς κάποιες μελέτες δείχνουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης GH στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών οδηγούν σε επιτυχημένες προσπάθειες IVF ενώ κάποιες άλλες μελέτες δείχνουν χαμηλά επίπεδα της ορμόνης GH στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με θετική έκβαση εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες που εμφάνισαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης .⁶⁷

Οιστρογόνα-Προγεστερόνη και ανδρογόνα

Είναι γνωστό ότι το οιστρογονικό περιβάλλον στο ωοθυλάκιο σχετίζεται με καλή αναπτυξιακή πορεία αυτού και δεν οδηγεί σε ατρησία. Επίσης, η οιστραδιόλη E2 βελτιώνει την κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων. Τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης (E2) και η αναλογία E2/P στο ωοθυλακικό υγρό υποδηλώνουν πιο εξελιγμένο στάδιο της ωοθυλακικής ανάπτυξης και σχετίζονται και με μεγαλύτερη πιθανότητα επίτευξης εγκυμοσύνης . Ωστόσο αυτό δεν επιβεβαιώνεται από άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί.

Τα στοιχεία από μελέτες που αφορούν την σημασία των επιπέδων προγεστερόνης στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ποιότητα του ωαρίου είναι αντικρουόμενα. Από την μία, τα υψηλά επίπεδα της προγεστερόνης δρουν θετικά για το ωάριο και την επακόλουθη εμφύτευση και ανάπτυξή του. Από την άλλη, τα ωοκύτταρα τα οποία προέκυψαν από ωοθυλάκια τα οποία εμφάνισαν υψηλά

επίπεδα προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό σχετίστηκαν με έμβρυα που γονιμοποιήθηκαν ανώμαλα. Επομένως, φαίνεται ότι υπάρχει μία βέλτιστη έκθεση σε προγεστερόνη που έχει θετικές επιδράσεις στα χαρακτηριστικά των ωαρίων, ενώ η υπερβολική έκθεση σε αυτή οδηγεί σε μη ποιοτικά ωοκύτταρα. Το όριο στις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό, που συμβαίνει αυτό δεν έχει καθοριστεί ακόμα.

Τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων σχετίζονται με πτωχή ποιότητα ωαρίων και συγκεκριμένα με ωάρια που τείνουν να έχουν χαμηλά ποσοστά φυσιολογικής διαίρεσης και ίσως να οδηγηθούν και σε ατρησία. Με άλλα λόγια, το ανδρογονικό περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε πρώιμη ωοθυλακική ατρησία γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα του ωοκυττάρου και περιορίζει τις πιθανότητες γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης. Ωστόσο μία ποσότητα ενδοωοθηλακικών ανδρογόνων είναι απαραίτητη για την ευνοϊκή ανάπτυξη των ωοθυλακίων.⁶⁷

Αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας TGF-beta

Οι ιχνημπίνες παράγονται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα επίπεδα τους στο ωοθυλακικό υγρό αντανakλούν τον αριθμό και την δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων του κάθε ωοθυλακίου. Η inhibin A αυξάνεται στο ωοθυλακικό υγρό ενώ η inhibin B μειώνεται στο ωοθυλακικό υγρό κατά την ωοθυλακική φάση. Επίσης τα επίπεδα της ιχνημπίνης A είναι σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες που εμφανίζουν ενδομητρίωση.⁶⁷ Υψηλά επίπεδα της ιχνημπίνης A και B συνδέονται με την πιθανότητα λήψης ωαρίων κατά την ωοληψία όχι όμως με την ποιότητα που θα έχουν αυτά και με το αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επομένως είναι δείκτες της ωοθυλακικής απάντησης και όχι της ποιότητας των εμβρύων ή των ωαρίων.⁶⁹

Η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP-15) βρέθηκε ότι επηρεάζει την ωρίμανση και την ποιότητα των ωαρίων. Υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης BMP-15 παρατηρήθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό γονιμοποιημένων ωαρίων, με φυσιολογική διαίρεση σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις αυτού του μορίου σε μη γονιμοποιημένα και μη διαιρεμένα ωάρια.⁷⁰

Άλλοι αυξητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες

Οι αυξητικοί παράγοντες ινσουλίνης I και II (IGF-I και -II) είναι πολυπεπίδια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση σε αρκετούς ιστούς. Η βιολογική τους διαθεσιμότητα ρυθμίζεται από τους παράγοντες δέσμησης πρωτεϊνών IGF (IGF-binding proteins) που είναι οι παράγοντες IGFBP-1 έως IGFBP-

6.⁶⁷ Τα ενδοθυλακικά επίπεδα των IGF-II, IGFBP-3 και IGFBP-4 βρέθηκαν να συσχετίζονται σημαντικά με τη γονιμοποίηση, την διαίρεση των ωαρίων και την ανάπτυξη του εμβρύου. Ο συνδυασμός των υψηλών επιπέδων του IGFBP-3 και 4 με τα χαμηλά επίπεδα της σχετιζόμενης με την εγκυμοσύνη πρωτεΐνης του πλάσματος- A PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A), στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκε σημαντικά με τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου.⁷² Ακόμη, σε άλλες μελέτες, τα επίπεδα τόσο του IGF-I όσο και του IGFBP-1 στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκαν θετικά με την ποιότητα και την ωριμότητα των ωαρίων. Η αναλογία IGF-1/IGFBP-1 αποδείχθηκε ότι είναι σημαντικά υψηλότερη τόσο στον ορό όσο και στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με επιτυχημένη εξωσωματική γονιμοποίηση .⁶⁹

Οι ιντερλευκίνες αντιπροσωπεύουν μια ομάδα από πολυλειτουργικά μόρια αναγνωρισμένα για την ικανότητα τους να ρυθμίζουν φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις στο πλαίσιο φυσιολογικών αλλά και παθολογικών καταστάσεων. Τα ανοσοδραστικά κύτταρα της ωοθήκης όπως τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνες συμπεριλαμβανομένης της IL-1 , IL-6, IL-8, οι οποίες έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου, την ωορρηξία και την παραγωγή προγεστερόνης. Υψηλότερα επίπεδα της IL-1 beta του ωοθυλακικού υγρού συνδέθηκαν με φυσιολογική γονιμοποίηση αλλά τα επίπεδα αυτής της ιντερλευκίνης ήταν χαμηλότερα στο ωοθυλακικό υγρό των ωοθυλακίων που περιείχαν ωάρια τα οποία οδήγησαν σε επιτυχημένη προσπάθεια IVF. Είναι πιθανό ότι η IL-1 beta οδηγεί σε κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου και φυσιολογική γονιμοποίηση αλλά δεν παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, μετά την γονιμοποίηση.⁶⁷ Η καλή ποιότητα των ωοκυττάρων συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων G- CSF (granulocyte-colony stimulating factor) , των ιντερλευκινών IL-12, IL-6, IL-8, και IL-18 καθώς και με μειωμένα επίπεδα της ιντερλευκίνης IL-1 και της IL-12. Επίσης , η IL-18 συσχετίστηκε με ανταπόκριση στην ωοθηκική διέγερση και οδήγησε σε επιτυχημένη έκβαση της εγκυμοσύνης μετά από IVF. ⁷²

Δραστικές μορφές οξυγόνου, Reactive Oxygen Species (ROS)

Η αγγείωση των ωοθυλακίων, το ενδοωοθυλακικό περιεχόμενο οξυγόνου και η μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι παράγοντες που ελέγχουν την βέλτιστη ανάπτυξη των ωαρίων . Μελέτες για την ωοθυλακική αγγείωση και την οξυγόνωση μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την αναπτυξιακή ικανότητα των ωοκυττάρων Το οξειδωτικό στρες, επάγει την καταστροφή του DNA και πυροδοτεί την απόπτωση. Πράγματι, τα ωοθυλάκια που υπόκεινται σε συνθήκες υποξίας περιέχουν ωάρια με υψηλή συχνότητα ανωμαλιών της μιτωτικής ατράκτου και επακόλουθη αυξημένη πιθανότητα ανευπλοειδίας του εμβρύου. Τα χαμηλά επίπεδα ROS στο ωοθυλακικό υγρό ίσως αντιπροσωπεύουν ένα πιθανό θετικό δείκτη που να

προβλέπει επιτυχία στην IVF, καθώς τα υψηλά επίπεδα ROS αντανakλούν ποικιλία παθολογικών καταστάσεων που επηρεάζουν τη γονιμότητα.

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εξαρτώμενη από σελήνιο (SeGPx), τα οποία προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά και δεν τα αφήνουν να οξειδωθούν από δραστικές μορφές οξυγόνου, υπάρχουν στο ωοθυλακικό υγρό και σχετίζονται με το δυναμικό γονιμοποίησης των ωοκυττάρων.⁶⁷ Υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου SOD και χαμηλά επίπεδα του ενζύμου SeGPx συσχετίστηκαν με ωάρια που απέτυχαν να γονιμοποιηθούν.^{73,74} Αντίθετα, στο ωοθυλακικό υγρό ωοθυλακίων που περιείχαν ωάρια τα οποία γονιμοποιήθηκαν βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του ενζύμου SeGPx.

Γενικά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του ωοθυλακικού υγρού είναι σημαντικά υψηλότερη σε ωοθυλάκια που φέρουν ωοκύτταρα ικανά για γονιμοποίηση από ό,τι σε ωοθυλάκια που δεν έχουν ωάρια ικανά για γονιμοποίηση.⁷⁵ Η παρουσία υψηλότερων ποσοτήτων TAC στο ωοθυλακικό υγρό από ότι στον ορό πιθανώς αντανakλά την αντιοξειδωτική δράση των κοκκιωδών κυττάρων.⁷⁶ Τα αυξημένα επίπεδα TAC θα μπορούσαν να θεωρηθούν ένας δείκτης ωρίμανσης του ωοθυλακίου, ο οποίος σχετίζεται με την ανάπτυξη ωοκυττάρων υψηλής ποιότητας.

Η υπερβολική παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακικού υγρού μπορεί να οδηγήσει το ωοθυλάκιο σε απόπτωση πριν γίνει η γονιμοποίηση και επομένως να επηρεάσει αρνητικά την ωοθυλακική ωρίμανση και την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού βρέθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση ή υδρόσάλπιγγα, καταστάσεις που σχετίζονται με ωάρια χαμηλού δυναμικού για επιτυχή γονιμοποίηση.⁶⁷

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Η ποιότητα και ο βαθμός ωρίμανσης ενός ωαρίου επηρεάζεται από τα επίπεδα του ενδοθυλακικού οξυγόνου που είναι ανάλογα με το βαθμό αγγείωσης των ωοθυλακίων. Η ανάπτυξη ενός επαρκούς δικτύου τριχοειδών αγγείων φαίνεται να εξαρτάται τουλάχιστον εν μέρει από τη δράση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντας (VEGF). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης και έχει σημαντικό ρόλο στην περιωοθυλακική αγγειογένεση και στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων στις ωοθήκες καθώς και στην ρύθμιση των επιπέδων του ενδοωοθυλακικού οξυγόνου. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης, η έκκριση του VEGF, η οποία επάγεται από τις γοναδοτροπίνες, καθορίζει τον σχηματισμό ενός δικτύου αγγείωσης

στη στιβάδα των κυττάρων θήκης του ωοθυλακίου. Ο παράγοντας VEGF εντοπίζεται στο ωοθυλακικό υγρό ως προϊόν έκκρισης των κυττάρων του ωοθυλακίου.⁷⁷

Μία μελέτη αναφέρει ότι η συγκέντρωση του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν το ωάριο αποτύγχανε να γονιμοποιηθεί. Υψηλά επίπεδα του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί με πτωχή μορφολογία εμβρύων και πτωχά ποσοστά σύλληψης σε προγράμματα IVF. Ο λόγος για τον οποίο τα επίπεδα του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό εμφανίζονται ως αρνητικός δείκτης της ποιότητας του ωαρίου θα μπορούσε να είναι η ενεργοποίηση της σύνθεσης του ως απάντηση στην υποξία του συμπλέγματος ωοκύτταρο – κοκκώδη κύτταρα. Μια υποξική κατάσταση σε αυτό το επίπεδο θα μπορούσε να ευθύνεται από την μία για την υψηλή συγκέντρωση του πεπτιδίου αυτού στο ωοθυλακικό υγρό και από την άλλη για την πτωχή ποιότητα των ωοκυττάρων. Στα προγράμματα IVF, τα οποία περιλαμβάνουν επιλογή ωοκυττάρων, τα επίπεδα του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης απόρριψης των ωοκυττάρων τα οποία εξελίχθηκαν σε υποξικό περιβάλλον.⁶⁷

Τα επίπεδα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται σημαντικά με τον βαθμό περιωθυλακικής αγγείωσης.⁷⁹ Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα ωοκύτταρα που λαμβάνονται από ωοθυλάκια με υψηλότερο βαθμό αγγείωσης εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης, και οδήγησαν σε υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης. Τα ωοθυλάκια αυτά εμφάνισαν και υψηλότερα επίπεδα του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό. Τα υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα αυτού στο ωοθυλακικό υγρό θα μπορούσαν να αντικατοπτρίζουν την μεγαλύτερη ικανότητα του ωοθυλακίου να δημιουργεί το δικό του αγγειακό δίκτυο εξασφαλίζοντας ένα καλύτερο ωοθυλακικό μικροπεριβάλλον για το αναπτυσσόμενο ωάριο, καθώς επιτυγχάνεται καλύτερη κυκλοφορία του αίματος και των συστατικών του, όπως μορίων οξυγόνου, αυξητικών παραγόντων, γοναδοτροπινών και θρεπτικών συστατικών. Επομένως, η ικανότητα του ωοθυλακίου να αναπτύσσει ένα αγγειακό δίκτυο φαίνεται να σχετίζεται αρκετά με την ικανότητα του να εκφράζει τον παράγοντα VEGF. Τέλος, εφόσον ο VEGF παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του περιωθυλακικού δικτύου τριχοειδών αγγείων μπορεί να είναι δείκτης της ποιότητας του ωοθυλακικού μικροπεριβάλλοντος και κατ' επέκτασιν της ποιότητας των ωοκυττάρων που προκύπτουν.⁷⁷

Αντιαποπτωτικοί παράγοντες

Οι αλλαγές που προκύπτουν λόγω της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου μπορούν να επηρεάσουν την έκβαση της IVF. Υψηλά επίπεδα αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων σχετίστηκαν με χαμηλής ποιότητας γονιμοποιημένα ωάρια, ενώ χαμηλά επίπεδα με έμβρυα καλής ποιότητας.⁸⁰ Ο

βαθμός απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ωοφόρου δίσκου (cumulus cells) βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά υψηλότερος στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, και χαμηλότερος στις νεότερες σε ηλικία γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF, με θετική έκβαση εγκυμοσύνης. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ποιότητα του εμβρύου είναι αντιστρόφως ανάλογη του βαθμού απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων.⁸¹

Η ενεργοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών μονοπατιών όπως αυτά που αφορούν τους TNF (Tumor Necrosis Factor) και FasL είναι πολύ σημαντικά στον καθορισμό της απόπτωσης μέσα στο ωοθυλάκιο. Ακόμα, και το ίδιο το ωοκύτταρο εκφράζει κάποιους υποδοχείς, οι οποίοι είναι ειδικοί κάποιων αποπτωτικών μονοπατιών όπως τους TNF-R και τον Fas .⁶⁷

Οι Fas και FasL είναι πρωτεΐνες που υπάρχουν τόσο ως διαμεμβρανικές όσο και ως διαλυτές μορφές. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Fas που λειτουργεί ως υποδοχέας πυροδοτεί την απόπτωση μέσω της σύνδεσης και της αλληλεπίδρασης της με το FasL, που λειτουργεί ως προσδέτης του υποδοχέα, ενώ το διαλυτό fas (sfas) αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από το fas -fasL σύστημα και έτσι συμπεριφέρεται ως λειτουργικός ανταγωνιστής της απόπτωσης . Η αλληλεπίδραση του Fas -FasL είναι ένα από τα βασικότερα γεγονότα για την επαγωγή της απόπτωσης ενώ ο ακριβής ρόλος των διαλυτών (soluble) μορφών δεν είναι πλήρως κατανοητός στο αναπαραγωγικό σύστημα.⁸²

Τόσο το διαλυτό fas (sFas) όσο και ο προσδέτης του sFas-L έχουν ανιχνευτεί στο ωοθυλακικό υγρό και πιθανώς ρυθμίζουν τόσο την ατρησία των ωοθυλακίων καθώς και την ωρίμανση των ωαρίων κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις του sfas στο ωοθυλακικό υγρό ήταν υψηλότερες σε ωοθυλάκια με ώριμα ωοκύτταρα απ' ότι σε ωοθυλάκια με μη ώριμα ωοκύτταρα, γεγονός που συνάδει με έναν προστατευτικό ρόλο αυτού του μορίου κατά της απόπτωσης και της προαγωγής ωρίμανσης των ωαρίων.^{83,84} Από την άλλη, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του sFas και οι υψηλές συγκεντρώσεις του sFas-L στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται με υψηλό επίπεδο απόπτωσης στο ωοθυλάκιο και πτωχή ποιότητα ωαρίου.⁸⁵

Σε άλλη μελέτη, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις του sFas και του sFas-L στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με πολυκυστικές ωοθήκες (PCOS) που υποβλήθηκαν σε IVF δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών που είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και αυτών που είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Στην περίπτωση αυτή, οι συγκεντρώσεις του sFas και του sFas-L δεν είχαν κάποια προγνωστική αξία όσον αφορά την ποιότητα των ωαρίων.⁸² Φαίνεται πως η συγκέντρωση του sFas στο ωοθυλακικό υγρό δεν είναι αξιόπιστος δείκτης της ποιότητας του ωαρίου και του εμβρύου που λαμβάνονται από αυτό. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με τα επίπεδα των διαλυτών αποπτωτικών παραγόντων σε κύκλους IVF και για το αν έχουν κάποια προγνωστική αξία σε κλινικά αποτελέσματα.

Proteomics

Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει διάφορες πρωτεΐνες που προέρχονται από το πλάσμα του αίματος ή εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης.⁸⁷ Η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης του ωοθυλακικού υγρού έχει ως στόχο την ταυτοποίηση μορίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και της ποιότητας του ωαρίου.⁸⁷

Η μελέτη των πρωτεϊνικών συστατικών του ωοθυλακικού υγρού έγινε ανιχνεύοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ποιότητα του ωαρίου. Τα τελευταία χρόνια όλο και πιο σύνθετες μοριακές τεχνικές έχουν εξελιχθεί, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη μελέτη δεκάδων πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε ένα βιολογικό υγρό.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα στην πρωτεομική ανάλυση σύνθετων βιολογικών υγρών είναι ότι η πρωτεϊνική τους σύνθεση είναι πολύπλοκη και δυναμική με αποτέλεσμα να απαιτούνται πολύ ευαίσθητες τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών. Η γενικότερη κατανόηση σχετικά με τις πρωτεΐνες και τον ρόλο τους στην ωοθυλακική ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου είναι ακόμη περιορισμένη.⁶⁷

Αντιγόνο CD44

Το CD44 είναι μια πρωτεΐνη ενσωματωμένη στη μεμβράνη των κυττάρων ενώ μπορεί να βρεθεί και με την διαλυτή μορφή της sCD44 σε πολλά σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου και του ωοθυλακικού υγρού. Η χορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης hCG μπορεί να προκαλέσει αποβολή του CD44 από κοκκώδη κύτταρα και μάλιστα η συγκέντρωση του sCD44 στο ωοθυλακικό υγρό ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση χορήγησης της hCG. Η συγκέντρωση του sCD44 βρέθηκε να είναι χαμηλότερη στο ωοθυλακικό υγρό των ωοθυλακίων που περιείχαν ώριμα ωάρια τα οποία στην συνέχεια γονιμοποιήθηκαν δίνοντας καλής ποιότητας έμβρυα. Το αν μπορούν ή όχι τα υψηλά επίπεδα του CD44 να επηρεάσουν άμεσα δυσμενώς το ωάριο δεν είναι γνωστό μέχρι στιγμής.⁸⁸

Λεπτίνη

Η λεπτίνη των ωοθυλακίων σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με το ωοθυλακικό αρτηριακό οξυγόνο (pO₂), και φαίνεται να είναι ένας δείκτης ωοθυλακικής υποξίας, κακής ποιότητας των ωαρίων και χαμηλής πιθανότητας εγκυμοσύνης.⁸⁹ Ωστόσο κάποιες άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της λεπτίνης στο ωοθυλακικό υγρό δεν

μπορούν να θεωρηθούν δείκτης της ποιότητας του ωαρίου και του αναπτυξιακού του δυναμικού.⁹⁰ Προς το παρόν, η συγκέντρωση της λεπτίνης στο ωοθυλακικό υγρό δεν φαίνεται να αντικατοπτρίζει την ποιότητα του ωαρίου και να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για την επιλογή των ωαρίων σε προγράμματα IVF.

Ομοκυστεΐνη (HCY)

Η ομοκυστεΐνη (HCY), μη πρωτεϊνικό αμινοξύ και μεταβολίτης της μεθειονίνης, παρατηρήθηκε στο ωοθυλακικό υγρό και βρέθηκε πως μόνο τα ωάρια που εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις HCY, έχουν καλύτερη ποιότητα και βαθμό ωρίμανσης. Εφόσον, το φολικό οξύ μειώνει τις συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης στο ωοθυλακικό υγρό αλλά και στον ορό, αυτό μπορεί να εξηγήσει και το θετικό αποτέλεσμα της χορήγησης φολικού οξέος πριν τη θεραπεία IVF.^{91,92}

Λακτοφερρίνη

Η λακτοφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη δέσμησης σιδήρου, η οποία αρχικά απομονώθηκε από το γάλα. Υπάρχει στο ωοθυλακικό υγρό σε ανιχνεύσιμες ποσότητες και βρέθηκε ότι τα επιτεδά της είναι σημαντικά υψηλότερα στα μεγαλύτερα σε μέγεθος ωοθυλάκια τα οποία περιέχουν καλής ποιότητας ωάρια ικανά να γονιμοποιηθούν και να δώσουν καλής ποιότητας έμβρυα.⁹³

Σακχαρα

Υαλουρονάνη

Η υαλουρονάνη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από D-γλυκουρονικό οξύ και D-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Μπορεί να βρεθεί στους ιστούς και στις εξωκυττάρια μήτρες. Είναι μείζονος σημασίας για την ανθρώπινη αναπαραγωγή καθώς εμπεριέχεται στην μήτρα των κοκκωδών κυττάρων που εδράζεται γύρω από το ωοκύτταρο πριν την ωορρηξία. Καθώς η παραγωγή της υαλουρονάνης αυξάνεται μετά το κύμα της LH και την χορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης hCG μπορεί να διαταρράξει τους χασμοσυνδέσμους των περιβαλλόντων κοκκωδών κυττάρων. Σχηματίζει μια εξωκυττάρια μήτρα που προκαλεί την αποκόλληση του συμπλέγματος ωοκυτάρου-κοκκωδών κυττάρων και απελευθερώνεται στο ωοθυλακικό υγρό λίγο πριν την ωορρηξία.

Η συγκέντρωση της υαλουρονάνης στο ωοθυλακικό υγρό ελέγχθηκε σε σχέση με τον βαθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν ως πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες της έκβασης της IVF. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της υαλουρονάνης εμφάνισαν μία θετική συσχέτιση με τον βαθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ο οποίος ήταν υψηλότερος στα ωοθυλάκια που περιείχαν μη γονιμοποιημένα ωοκύτταρα ενώ για τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα συνέβαινε το αντίθετο.⁹⁴

Μυοϊνοσιτόλη

Τα υψηλά επίπεδα της μυοϊνοσιτόλης στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα της οιστραδιόλης E2 και με την ποιότητα των εμβρύων που προέρχονται από τα αντίστοιχα ωοκύτταρα. Ωστόσο, η μυοϊνοσιτόλη δεν θεωρείται περισσότερο αξιόπιστος δείκτης της ποιότητας του ωαρίου από την οιστραδιόλη E2.⁹⁵

Metabolomics

Η Metabolomics είναι η μελέτη μορίων (αμινοξέων, λιπιδίων, νουκλεοτιδίων) τα οποία βρίσκονται στα βιολογικά υγρά. Ο αριθμός τους είναι μικρότερος από τον αριθμό των γονιδίων και των πρωτεϊνών σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό. Έτσι λοιπόν, μία πλήρη μεταβολομική ανάλυση μπορεί να γίνει σχετικά πιο γρήγορα από μία γενομική ή πρωτεομική ανάλυση.

Η Metabolomics είναι μία τεχνολογία η οποία βρίσκει εφαρμογή σε πολλά βιολογικά συστήματα καθώς και στην μελέτη ανθρώπινων εμβρύων και ωοκυττάρων. Σκοπός της είναι να προσδιορίσει ποιοτικά και ποσοτικά τους μεταβολίτες σε ένα βιολογικό υγρό όπως είναι το ωοθυλακικό υγρό κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη Metabolomics πρέπει να είναι πολύ ευαίσθητες και ικανές να ανιχνεύσουν μεγάλο αριθμό μορίων σε σύντομο χρόνο. Αυτές είναι η φασματοσκοπία μάζας σε συνδυασμό με τεχνικές όπως υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UPLC) οι οποίες μπορούν να προσφέρουν την μέγιστη αποδοτικότητα.

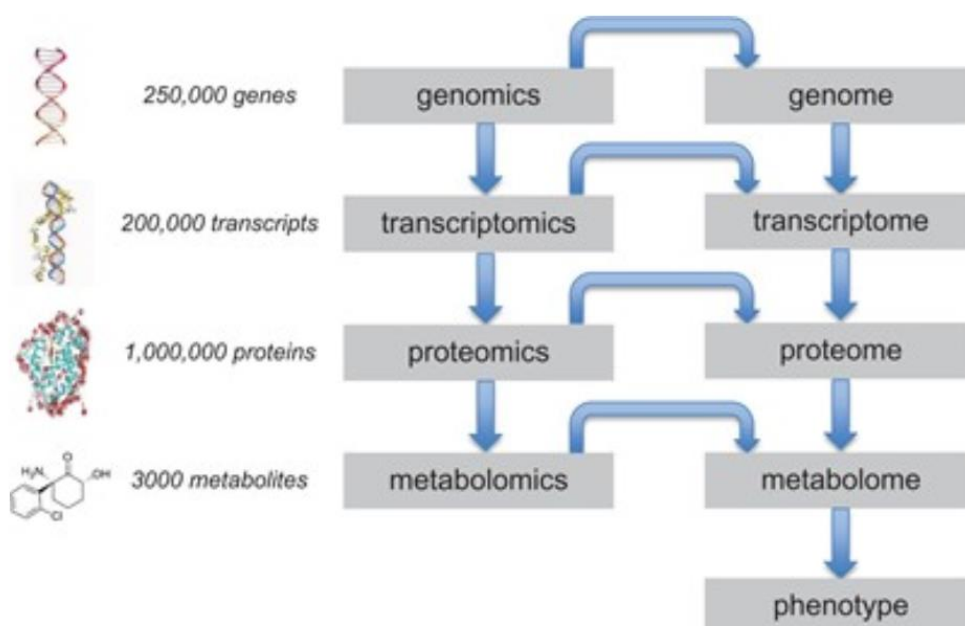
Η Metabolomics στο ωοθυλακικό υγρό είναι η δυναμική ποσοτική εκτίμηση χαμηλού μοριακού βάρους ουσιών οι οποίες είναι παρούσες στο ωοθυλακικό υγρό μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Καθώς είναι τα τελικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, αυτοί οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες αποκαλύπτουν την απάντηση του ωοθυλακίου σε όλες τις επιδράσεις που επηρεάζουν την εξέλιξή του. Πιθανώς οι μεταβολίτες να παρέχουν περισσότερες πληροφορίες απ' ό,τι η απευθείας μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (genomics) των mRNAs ή των πρωτεϊνών (proteomics). Στην πραγματικότητα, η αυξημένη γονιδιακή δραστηριότητα με μία

επακόλουθη σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών δεν αντιστοιχεί απαραίτητα σε κάποια τροποποιημένη λειτουργία ή μορφολογία του κυττάρου ενώ οι μεταβολίτες αποκαλύπτουν την πραγματική λειτουργική κατάσταση ενός βιολογικού συστήματος και των κυττάρων του.

Η ανάπτυξη του ωκυττάρου ρυθμίζεται από προϊόντα τα οποία συγκεντρώνονται κατά την φάση της ανάπτυξης. Όλα τα μόρια mRNA είναι απαραίτητα να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες ή μεταβολίτες, τα οποία μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις γίνονται οι πραγματικοί βιοδείκτες της κυτταρικής λειτουργικότητας. Οι μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν τα τελικά προϊόντα των ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου. Πλέον, είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι μεταβολίτες που εκκρίνονται από το ωκύτταρο στο περιβάλλον μέσο με διερεύνηση του ωοθυλακικού υγρού καθώς και οι ενώσεις που εκκρίνονται από το ωκύτταρο στο μέσο καλλιέργειας στο οποίο αιωρείται το ωκύτταρο κατά την διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας για την ανάκτηση του σε προγράμματα IVF. ("exometabolomics" ή "secretomics"). Τόσο το μεταβολικό προφίλ του ωοθυλακικού υγρού όσο και αυτό του μέσου καλλιέργειας του ωκυττάρου θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων.⁶⁷

Έρευνες δείχνουν ότι το μεταβολικό προφίλ του ωοθυλακικού υγρού που συλλέχθηκε από μεγάλα ωοθυλάκια με άντρο είναι πιο ομοιογενές από το μεταβολικό προφίλ του ωοθυλακικού υγρού που συλλέχθηκε από μικρά ωοθυλάκια. Οι διαφορές στο βιοχημικό προφίλ σχετίζονται με το στάδιο ωρίμανσης του ωαρίου.⁹⁶ Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα ωκύτταρα που μπορούν να απορροφήσουν μεγαλύτερες ποσότητες της γλυκόζης και να τη μετατρέψουν ενεργά σε γαλακτικό οξύ δείχνουν μεγαλύτερο δυναμικό γονιμοποίησης. Κάποιες μελέτες έχουν επικεντρώσει στην αξιολόγηση του μεταβολισμού των ωαρίων μέσω της μέτρησης των ενεργειακών υποστρωμάτων ή της κατανάλωσης οξυγόνου σε μέσα καλλιέργειας. Η συγκέντρωση του οξυγόνου μπορεί να αντικατοπτρίζει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα που είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας που απαιτείται για την ανάπτυξη των ωαρίων, και φαίνεται να σχετίζεται και με την βιωσιμότητα του.⁹⁷

Συνολικά, τα metabolomics θα μπορούσαν να αποτελέσουν ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες για την ζωτικότητα και την ποιότητα των ωκυττάρων. Ωστόσο, απαιτούνται ακόμη μεγάλης κλίμακας έρευνες για να συσχετίσουν το μεταβολικό προφίλ του ωοθυλακικού υγρού με το αναπτυξιακό δυναμικό των ωκυττάρων και για να εφαρμοστούν αυτές οι μη επεμβατικές τεχνολογίες στην κλινική.



Εικόνα 14 : Ο καταρράκτης «omics» περιγράφει τη ροή βιολογικών πληροφοριών σε έναν οργανισμό. ⁹⁸

A.7.3 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

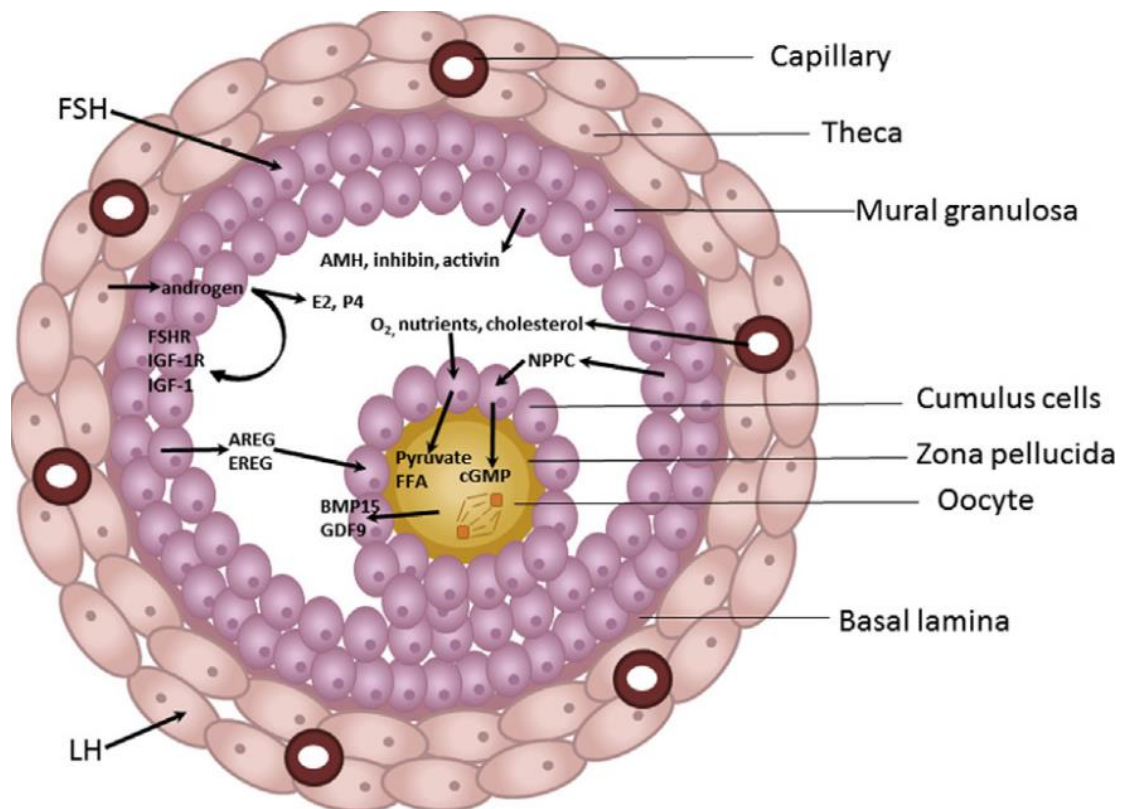
Τα κοκκώδη κύτταρα είναι ενδοκρινικά κύτταρα τα οποία εμπεριέχονται στο ωοθυλάκιο και σχηματίζουν ποικίλες στιβάδες οι οποίες κατανέμονται γύρω από το ωοκύτταρο. Καθώς τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται και σχηματίζεται το άντρο, τα κοκκώδη κύτταρα διακρίνονται σε δύο υποπληθυσμούς κοκκωδών κυττάρων με διαφορετικά λειτουργικά και ανατομικά χαρακτηριστικά.

Τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα (MGC), τα οποία επενδύουν το τοίχωμα του ωοθυλακίου, παράγουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις οιστρογόνων που προκαλούν τελικά την αιχμή της LH και την ωορρηξία. Τα κοκκώδη κύτταρα ωοφόρου δίσκου περιβάλλουν το ωοκύτταρο, σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων και ωαρίου(COC), και αλληλεπιδρούν μέσω χασμοσυνδέσμων (gap junctions) με το ωοκύτταρο επάγοντας την ανάπτυξή του. Μέσω των χασμοσυνδέσμων (gap junctions) επιτρέπεται η μεταφορά μορίων μικρού μοριακού βάρους μεταξύ των ωοκυττάρων και των κοκκωδών κυττάρων, καθώς και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια μεταφέρονται με ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων. Τα μόρια που διακινούνται μέσω των χασμοσυνδέσμων περιλαμβάνουν

ιόντα, μεταβολίτες αμινοξέα και μικρά ρυθμιστικά μόρια που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ωαρίων.

Ένας άλλος τρόπος επικοινωνίας μεταξύ των ωοκυττάρων και των κοκκιωδών κυττάρων είναι μέσω της παρακρινούς σηματοδότησης. Καθ' όλη τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης, οι πρωτεΐνες της οικογένειας του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα -b (TGFb) που εκκρίνονται από τα ωκύτταρα όπως η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 15 (BMP15) και ο παράγοντας διαφοροποίησης 9 (GDF9) αλληλεπιδρούν με τα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα και συμβάλλουν στην ρύθμιση βασικών κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων και η διαφοροποίηση των κυττάρων θήκης. Η αλληλεπίδραση κοκκωδών κυττάρων και ωαρίου εμποδίζει την ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων προωθώντας την ανάπτυξη, ρυθμίζοντας την στεροειδογένεση και την σύνθεση ανασταλτίνης και καταστέλλοντας την έκφραση του υποδοχέα της ωχρινοτρόπου ορμόνης. Τα κοκκώδη κύτταρα με την σειρά τους παράγουν και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες όπως ανασταλτίνη, ακτιβίνη, TGFa, AMH, που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου.

Τα κοκκώδη κύτταρα αλληλεπιδρούν αμφίδρομα με το ωκύτταρο επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τις διαδικασίες διαφοροποίησης του ωοθυλακίου, την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, την ωοθυλακιόρρηξη, την γονιμοποίηση και την εμφύτευση του εμβρύου.^{99, 100} Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης όλων αυτών των παραγόντων που προαναφέρθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό, τα οποία εκκρίνονται τόσο από τα κοκκώδη κύτταρα όσο και από τα ωκύτταρα μπορεί να βοηθήσει την επιστημονική κοινότητα στην βαθύτερη κατανόηση της επιτυχημένης γονιμοποίησης των ωοκυττάρων. Επιπλέον, η απομόνωση κοκκωδών κυττάρων από ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υπόκεινται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και η εύρεση μορίων δεικτών αυτοφαγίας, απόπτωσης, μιτοχονδριακής λειτουργίας και μορίων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως για παράδειγμα του mTOR μπορεί να δώσει πληροφορίες που αφορούν την λειτουργία και την ποιότητα των κοκκωδών κυττάρων και κατ' επέκτασιν και την ποιότητα του ωοκυττάρου. Τέλος, η συσχέτιση των παραπάνω μορίων δεικτών με τα χαρακτηριστικά των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF και την έκβαση της τεχνητής γονιμοποίησης μπορεί να βοηθήσει στην δημιουργία πιο αποδοτικών μεθόδων πρόκλησης ωοθυλακιόρρηξης.



Εικόνα 15: Η αλληλεπίδραση κοκκωδών κυττάρων και ωοκυττάρων επηρεάζει το αναπτυξιακό δυναμικό των ωοκυττάρων μέσω της διαδικασίας της στεροειδογένεσης, του μεταβολισμού και της κυτταρικής σηματοδότησης στα προωρρηκτικά ωοθυλάκια .¹⁰⁰

A.7.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Η ποιότητα των ωοκυττάρων επηρεάζει σημαντικά την γονιμοποίηση και την επακόλουθη ανάπτυξη των εμβρύων. Έτσι η έρευνα έχει στραφεί στην εύρεση αξιόπιστων δεικτών ενδεικτικών του αναπτυξιακού δυναμικού και της ποιότητας των ωοκυττάρων. Η αξιολόγηση της ποιότητας των ωοκυττάρων μπορεί να γίνει είτε μέσω μορφολογικών κριτηρίων είτε μέσω μοριακών και κυτταρικών δεικτών. Συγκριτικά, με τα μορφολογικά κριτήρια που θεωρούνται διφορούμενα, οι κυτταρικοί και μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες είναι πιο ακριβείς και αντικειμενικοί για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωοκυττάρων.¹⁰¹

Τα υψηλά επίπεδα απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων συνοδεύονται με μη επιθυμητή έκβαση εγκυμοσύνης στις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF. Ακόμη, τα υψηλά επίπεδα απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου σχετίζονται με ανώριμα ωοκύτταρα, χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης και αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης.¹⁰⁰ Ο έλεγχος του βαθμού απόπτωσης των κοκκωδών

κυττάρων γίνεται με τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του λόγου Bcl-2/Bax, στα κοκκώδη κύτταρα. Ο προ-αποπτωτικός παράγοντας Bax δρα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και προάγει την απόπτωση ενώ ο αντι-αποπτωτικός παράγοντας Bcl-2, βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, ανταγωνίζεται την δράση του Bax και καταστέλλει τις αποπτωτικές διεργασίες μέσω παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.¹⁰² Παρόλο που η βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου καθορίζει την ποιότητα των ωοκυττάρων, η απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων δεν μπορεί να θεωρηθεί κλινικά ένας αξιόπιστος δείκτης του αναπτυξιακού δυναμικού και της ποιότητας των ωοκυττάρων.

Το μεταγράφημα των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου έχει μελετηθεί ως ένας μη επεμβατικός δείκτης του αναπτυξιακού δυναμικού των ωοκυττάρων. Έχουν προσδιοριστεί γονίδια τα οποία εκφράζονται διαφορετικά σε κοκκώδη κύτταρα τα οποία περιβάλλουν ένα καλής ποιότητας ωοκύτταρο από ότι σε αυτά που περιβάλλουν ένα κακής ποιότητας ωοκύτταρο. Τα γονίδια των κοκκωδών κυττάρων που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες συμπεριλαμβανομένων των iNOS, HO-1 και εκείνων που ρυθμίζουν το μονοπάτι NF-kB, σχετίζονται με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης των ωαρίων σε τεχνικές ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI). Άλλα γονίδια των κοκκωδών κυττάρων που αποτελούν δείκτες της ποιότητας του ωοκυττάρου συμπεριλαμβάνουν το COX2, GREM1, HAS2, και PTX3. Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων HAS2, GREM1, και COX2 αλλά όχι απαραίτητα του PTX3 είναι υψηλότερα σε κοκκώδη κύτταρα τα οποία περιβάλλουν ωάρια που αναπτύσσονται σε καλής ποιότητας έμβρυα, από ότι στα κοκκώδη κύτταρα που περιβάλλουν ωάρια που δεν γονιμοποιούνται ή αναπτύσσονται σε κακής και πτωχής ποιότητας έμβρυα.¹⁰⁰

Μία διαφορετική προσέγγιση που συμπεριλαμβάνει την χρήση των κοκκωδών κυττάρων ως προγνωστικό παράγοντα της ποιότητας των ωαρίων είναι η εξέταση του μήκους των τελομερών. Τα τελομερή προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων των ωαρίων κατά τη διάρκεια της μείωσης. Βρέθηκε, ότι τα τελομερή είναι μακρύτερα στα κοκκώδη κύτταρα ωοφόρου δίσκου, τα οποία περιβάλλουν ωοκύτταρα που σχηματίζουν καλής ποιότητας βλαστοκύστες από ότι σε αυτά που περιβάλλουν ωοκύτταρα που σχηματίζουν κακής ποιότητας βλαστοκύστες, παρόλο που μόνο λίγα κύτταρα μπορούν να εξετάζονται ανά ωοκύτταρο. Τέλος, η ανάλυση των τελομερών δεν έχει αποδειχθεί αρκετά αξιόπιστη για να χρησιμοποιηθεί και κλινικά.¹⁰³

A.8 ΣΤΟΧΟΣ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς και πρωτεϊνών με ρόλο “κλειδί” στο μονοπάτι της απόπτωσης, στο ωοθυλακικό υγρό που απομονώνεται από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητη η ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου για την απαλλαγή των πρωτεϊνών του πλάσματος, οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα στο ωοθυλακικό υγρό και δυσκολεύουν την εύρεση και την ανίχνευση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Επίσης, στόχο αποτελεί και ο έλεγχος επιπέδων σημαντικών πρωτεϊνών του μονοπατιού της αυτοφαγίας και της απόπτωσης καθώς και ο έλεγχος επιπέδων σημαντικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή λειτουργία στα κοκκώδη κύτταρα που απομονώνονται από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Τέλος, θα γίνει προσπάθεια συσχέτισης των παραπάνω αποτελεσμάτων με τα χαρακτηριστικά των υπό μελέτη γυναικών όπως είναι η ηλικία, και το δοθέν πρωτόκολλο κατά την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών στην διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης, για την επιλογή κατάλληλης αγωγής διέγερσης των ωοθηκών για κάθε διαφορετικό τύπο γυναίκας και με απώτερο στόχο να επιτευχθεί εγκυμοσύνη.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΥΛΙΚΑ

B.1.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon 50 ml και 15 ml (Sarstedt)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου eppendorf 1.5 ml (Sarstedt)
- Τρυβλία 60 mm επίπεδου πυθμένα , επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες. (Greiner Bio one).
- Ορολογικές πιπέτες 10 ml, 5 ml , 2 ml, αποστειρωμένες για χρήση σε κυτταροκαλλιέργειες. (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur πλαστικές, μη αποστειρωμένες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur γυάλινες
- Μικροπιπέτες 0,2-1 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl (Gilson)
- ❖ Πλαστικά ρύγχη για μικροπιπέτες (tips) 0,2 -1 μl (Greiner bio one)

- Πλαστικά ρύγχη για μικροπιπέτες (tips) 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1000 μl (Sarstedt).
- Αιμοκυτταρόμετρο Newbauer (HBG)
- Γυάλινες καλυπτρίδες στρογγυλες διαμέτρου 11 mm (Thermo Scientific , Cat. No: 12688116)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες 26 X 76 mm (Deltalab)
- Φίλτρα cell strainers 40 μm Nylon (Falcon REF 352340)
- Φίλτρα cell strainers 70 μm Nylon (Falcon REF 352340)

B.1.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 20 X

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος συμπύκνωσης 20 X, χρειάζονται :

- ❖ 160 gr NaCl
- ❖ 4 gr KCl
- ❖ 28,8 gr Na₂HPO₄
- ❖ 4,8 gr KH₂PO₄

Όλα τα συστατικά αναμειγνύονται σε 800 ml H₂O . Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με την προσθήκη NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με δις απεσταγμένο H₂O. Τέλος το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 ° C και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών TGS 10 X

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος 10 X απαιτούνται :

- ❖ 30 gr Tris (Sigma- Aldrich, T1503)
- ❖ 144 gr γλυκίνης
- ❖ 10 gr SDS

Τα συστατικά διαλύονται σε 800 ml δις απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.3 με HCl . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συλλέγεται μετά την χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μία φορά.

- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4 X (Laemmli)

Για την παρασκευή 12 ml διαλύματος, που χρησιμοποιείται για φόρτωση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης, αναμινύονται :

- ❖ 2,2 ml Tris 1M , Ph:6,8
- ❖ 4,4 ml γλυκερόλη 100 %
- ❖ 4,4 ml SDS 10 %
- ❖ 0,5 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- ❖ 0,5 ml β- μερκαπτοαιθανόλη

- Διάλυμα υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών 10 X (Transfer Buffer)

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος για την ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών χρειάζονται :

- ❖ 111,66 gr γλυκίνης
- ❖ 29,32 gr Tris

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 1 L δις απεσταγμένο H₂O. Για να χρησιμοποιηθεί , αραιώνεται σε 1X με καθαρή μεθανόλη και νερό. Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος 1 X απαιτούνται 100 ml από το Transfer Buffer 10X , 200 ml μεθανόλη και 700 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (~ 4 ° C).

- Διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS) 20 X

Είναι ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στο Western Blot . Για την παρασκευή 1 L διαλύματος συμπύκνωσης 20 X αναμινύονται :

- ❖ 160 gr NaCl
- ❖ 4 gr KCl

- ❖ 60 gr Tris base

Όλα τα συστατικά αναμειγνύονται σε 800 ml H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με την προσθήκη HCl και ο όγκος του συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με δις απεσταγμένο H₂O. Τέλος το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 ° C και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα TBS – Tween -20 0,1 %

Με σκοπό την παρασκευή 500 ml διαλύματος πλύσης των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης χρειάζονται :

- ❖ 5 ml Tween -20 10 %
- ❖ 495ml TBS 1x

Το διάλυμα αναδεύεται για περίπου 10 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα αποκλεισμού (Blocking Buffer)

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος αποκλεισμού απαιτούνται :

- ❖ 5 gr γάλα σκόνη
- ❖ 95 ml TBS 1X
- ❖ 1 ml Tween 20 x 10 %

Πριν την χρήση το διάλυμα αναδεύεται για περίπου 15 λεπτά και στην συνέχεια μπορεί να διατηρηθεί στους 4 ° C για περίπου 3-4 ημέρες .

- Διάλυμα γάλακτος (5 %) για την επαναιώρηση των δευτερογενών αντισωμάτων

Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος, 25 gr σκόνης γάλακτος διαλύονται σε 480 ml TBS- Tween-20 0,1 % (1x)

- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10 %

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος, 1 gr APS (Sigma – Aldrich, A3678) διαλύεται σε 10 ml δις απεσταγμένο H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου .

- Διάλυμα για την επαναιώρηση των πρωτογενών αντισωμάτων

Τα πρωτογενή αντισώματα για την ανοσοαποτύπωση μπορούν να αραιωθούν σε 3 διαλύματα.

1. Το πρώτο διάλυμα περιέχει :
 - ❖ 2 % Gelatin (10 %)
 - ❖ 0,1 % TWEEN
 - ❖ TBS 1X

Επομένως, για 2 ml διαλύματος επαναιώρησης αναμειγνύονται 400 μl gelatin, 20 μl TWEEN και 1580 μl TBS 1X. Στη συνέχεια ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος.

2. Το δεύτερο διάλυμα περιέχει :
 - ❖ 5 % BSA
 - ❖ 0,1 % TWEEN
 - ❖ TBS 1X

Επομένως, για 2 ml διαλύματος επαναιώρησης αναμειγνύονται 0,1 g γάλα, 20 μl TWEEN και 1980 μl TBS 1X. Στη συνέχεια ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος. Σε κάθε περίπτωση, το διάλυμα με το αντίσωμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί εφόσον φυλάσσεται στους -20 °C.

- Διάλυμα SDS 10 %

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος, 10 gr SDS διαλύονται σε 80 ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tris – HCl 1.5 M, Ph 8.8

Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος 20.85 gr Tris διαλύονται σε 450 ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με HCl. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121 ° C για 15 λεπτά και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tris – HCl 1.5 M, Ph 6.8

Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος 60,56 gr Tris διαλύονται σε 450 ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 με HCl. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121 ° C για 15 λεπτά και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Coomassie Blue (Abcam ab 146260)

Stain Buffer :

Coomasie blue 2 g

Methanol 450 ml

dH₂O 450 ml

Glacial acetic acid 100 ml

Destain Buffer :

MetOH 300 ml

AcOH 50 ml

H₂O 650 ml

- Διάλυμα stripping (mild)

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος stripping buffer χρειάζονται :

- 15 g γλυκίνης
- 1 g SDS

- 10 ml Tween 20
- 800 ml απεσταγμένο νερό

Τέλος, πραγματοποιείται προσαρμογή του PH του διαλύματος στο 2,2 και συμπλήρωση του όγκου του διαλύματος με απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L.

B.1.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

- Αιθανόλη (EtOH) υπερκάθαρη (Fluka E / 0650DF/17)
- Αντιδραστήριο Bradford 5x (Bio- Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate # 5000006)
- Αντιδραστήριο TEMED (N,N ,N', N' – Tetramethylethylenediamine – Carl Roth , 2367)
- Διάλυμα Acrylamide / Bis - Acrylamide 30 % (29: 1) (Carl Roth # 3029.1)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Nippon Genetic # MWP04)
- Υπόστρωμα ECL για την εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση (Lumilight western blotting Substrate , Roche # 1201520001)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών (GE Healthcare # 10600002)

B.1.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση (Western blot) είναι τα εξής :

❖ Πρωτογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρία
Caspase 3	1: 1000	Genetex GTX110543
VEGF	1: 1000	Genetex GTX113574
Tim 23	1: 1000	BD Transduction Laboratories 611222
Bax	1: 500	GeneTex GTX635715
Bcl2	1: 200	Santa- Cruz sc-7382
b-actin	1:10.000	Millipore
FSH-R	1: 1000	Origene TA323724
ADMA	1: 1000	cell signaling 13522
LC3B	1: 1000	Genetex GTX127375
TrkC	1: 1000	cell signaling 3376
Lonp1	1:10.000	SIGMA HPA002192
VDAC	1: 1000	Santa -Cruz sc-390996
IL-6	1: 500	Gene Tex GTX110527
Histone 3	1: 500	Millipore 06-755

Πίνακας 1 : Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης

❖ Δευτερογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρεία
Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κουνελιού , συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου (goat anti- mouse)	1:2500	Thermo Scientific #31462
Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) ποντικίου, συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου (goat anti- mouse)	1:2500	Thermo Scientific #31432

Πίνακας 2 : Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης

B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό μελέτης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα είναι το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο συλλέχθηκε από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση στην μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Κατά την διαδικασία της ωοληψίας, αφού γίνει αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού από τις ωοθήκες, πραγματοποιείται διαχωρισμός των ωοκυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό. Αφού διαχωριστούν τα ωοκύτταρα από το υγρό και απομακρυνθούν, το υγρό αντί να απορριφθεί, συλλέγεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια και μεταφέρεται με προσοχή στο Ινστιτούτο Βιοιατρικών Ερευνών για να επεξεργαστεί .

B.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Καθώς το ωοθυλακικό υγρό είναι αναμεμειγμένο με συστατικά του αίματος όπως ερυθροκύτταρα και λευκοκύτταρα αλλά και τμήματα ιστού προέκυψε η ανάγκη απομάκρυνσης αυτών με την χρήση ειδικών φίλτρων 40 μm και 70 μm . Με την μέθοδο απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων με την χρήση φίλτρων, απομακρύνεται η πλειοψηφία των ανεπιθύμητων κυττάρων, τα οποία αναμείχθηκαν με το ωοθυλακικό υγρό, κατά την διαδικασία της ωοληψίας.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση κοκκωδών κυττάρων με την χρήση φίλτρων αποτελείται από τα εξής στάδια:

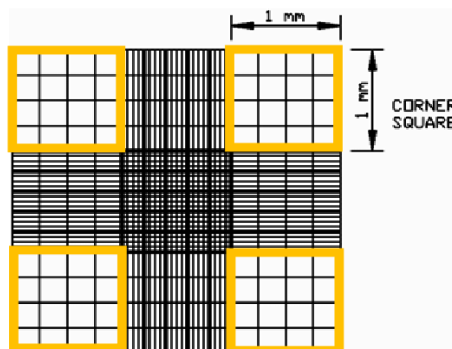
1. Το ωοθυλακικό υγρό που συλλέγεται, διέρχεται από το φίλτρο το οποίο διαθέτει πόρους 40 μm . Με τον τρόπο αυτό παραμένουν στην επιφάνεια του φίλτρου τα συσσωματώματα των κοκκωδών κυττάρων ενώ στο έκλουσμα περνούν τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα αλλά και όσα άλλα κύτταρα μικρού μεγέθους περιέχονται στο υγρό. Το έκλουσμα λοιπόν, ως επί το πλείστον περιέχει ερυθροκύτταρα και συμβολίζεται ως RBC (Red Blood Cells).
2. Από το έκλουσμα φυλάσσονται 20 ml για φυγοκέντρηση, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο ορός του αίματος.
3. Το φίλτρο των 40 μm καθαρίζεται με 10 ml PBS 1X, το οποίο έχει θερμανθεί στους 37 °C για 15 λεπτά πριν τη χρήση του .

4. Ακολουθεί αντίστροφο πλύσιμο του φίλτρου (backwash) με 10 ml PBS 1X και τα συσσωματώματα κοκκωδών συλλέγονται σε ένα τρυβλίο 10 cm.
5. Προκειμένου τα κοκκώδη κύτταρα να γίνουν μονήρη, υπόκειται 10 φορές μηχανική θραύση (trituration).
6. Παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα όντως είναι μονήρη.
7. Το υγρό διέρχεται από φίλτρο διαμέτρου 70 μm έτσι ώστε τα μονήρη κοκκώδη κύτταρα να περάσουν στο έκλουσμα και στην επιφάνεια του φίλτρου να μείνουν συσσωματώματα που δεν διαχωρίστηκαν αλλά και ανεπιθύμητα τμήματα κυτταρικού ιστού.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 1900 rpm για 5 λεπτά
9. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 0,5 ή 1 ml PBS.
10. Υπολογίζεται ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων του δείγματος με τη χρήση του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer .

B.2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER

Τα στάδια που ακολουθούνται για την μέτρηση των κοκκωδών κυττάρων που απομονώνονται είναι τα εξής:

1. Στην πλάκα Neubauer προστίθενται 10 μl του δείγματος κοκκωδών κυττάρων που απομονώθηκαν .
2. Η μέτρηση των κοκκωδών κυττάρων γίνεται στα 4 μεγάλα τετράγωνα που βρίσκονται στο κέντρο της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά αποτελούνται το καθένα από 16 μικρότερα τετράγωνα .
3. Υπολογίζεται το άθροισμα των κοκκωδών κυττάρων τα οποία βρίσκονται στο καθένα από τα 4 μεγάλα τετράγωνα .
4. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει αφού διαιρεθεί το άθροισμα δια του 4 και πολλαπλασιαστεί $\times 10^4$. Ο αριθμός που προκύπτει αποτελεί τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων τα οποία περιέχονται σε 1 ml δείγματος.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer.

B.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Μετά την απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό, αυτό φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 5 λεπτά στους 4 ° C και 10 ml του υπερκείμενου φυλάσσονται στους - 80 ° C .

B.2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα, κυρίως κοκκώδη και ερυθροκύτταρα, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα λύσης RIPA. Η διαδικασία αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- ❖ Φυγοκέντρηση εκλούσματος κυττάρων στα 800 g για 5 λεπτά
- ❖ Απομάκρυνση υπερκείμενου
- ❖ Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος RIPA 1X στο οποίο έχει προστεθεί μείγμα αναστολέων πρωτεασών (1:10) (400 μl για το έκλουσμα ερυθροκυττάρων λευκοκυττάρων (RBC) και 100 μl για το έκλουσμα κοκκωδών κυττάρων (GC)
- ❖ Επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά στον πάγο
- ❖ Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση νουκλεικών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 4 sec, με εναλλάξ 0,5 sec θραύση και 0,5 sec παύση και ένταση 30 %
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 14000 g για 10 λεπτά στους 4° C.
- ❖ Συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο περιλαμβάνει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και αποθήκευση στους -20 ° C προσωρινά ή στους -80 ° C.

B.2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Φωτομετρώντας το δείγμα στα 595 nm υπολογίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την μέθοδο αυτή είναι η εξής :

- ❖ Σχηματίζεται μία πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 1 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 µg πρωτεΐνης). Το μείγμα παραμένει για 5 λεπτά και ακολουθεί φωτομέτρηση. Για να γίνει η φωτομέτρηση πρέπει πρώτα το φωτόμετρο να μηδενιστεί με δείγμα που περιέχει τον διαλύτη της εκάστοτε πρωτεΐνης ο οποίος στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το νερό. Υπάρχει περίπτωση όμως οι πρωτεΐνες να έχουν ως διαλύτη το διάλυμα λύσης RIPA, οπότε στην περίπτωση αυτή το φωτόμετρο μηδενίζεται με RIPA.
- ❖ 5µl από κάθε δείγμα αραιώνονται με 45µl νερό (nanopure)
- ❖ Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 950µl διαλύματος Bradford 1X. Έπειτα από 5 λεπτά παραμονής τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595 nm.

B.2.7 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Η ανοσοαποτύπωση (ή αλλιώς Western blot) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- ❖ Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου
- ❖ Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- ❖ Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα
- ❖ Ανίχνευση των πρωτεϊνών

Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-PAGE και ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου. Οι πρωτεΐνες απομονώνονται και αποδιατάσσονται με θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά, με τη χρήση αποδιατακτικών αναγωγικών παραγόντων (SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη) που περιέχονται στο Laemmli buffer. Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και το SDS καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές

τις συνθήκες καταστρέφεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να έχουν όμοιες αναλογίες φορτίου/μεγέθους. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS – πολυπεπτιδίου μετακινούνται στη πηκτή πολυακρυλαμίδιου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) πραγματοποιείται σε ένα διακοπόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό PH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί η πηκτή. Τα συμπλέγματα SDS – πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς το θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω της πηκτής επιστοίβαξης (stacking) η οποία είναι αρκετά πορώδης, τα συμπλέγματα στοιβάζονται σε μία πιο λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού (separating).

Για την κατάλληλη ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απαιτείται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) το οποίο αποτελείται από 2 διαφορετικά gel :

- ❖ **Stacking gel 5%:** Σκοπός του είναι να στοιβάξει τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να
- ❖ ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση από το ίδιο σημείο.
- ❖ **Separation gel 10 έως 15%** (ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θα ανιχνευθούν): Σκοπός του είναι να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες.

Τα συστατικά και οι αναλογίες για κάθε τύπο πηκτής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα :

Πηκτή διαχωρισμού (separating)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
Acryl:bis (29:1)	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml	0.67ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	
1M Tris pH 6.8					0,5ml
H ₂ O (υπερκάθαρο)	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml	2.7ml
10 % SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
10 % APS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
TEMED	6μl	4μl	4μl	4μl	4 μl
Τελικός όγκος	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

Πίνακας 3 : Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδιου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με την μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

- ❖ Συναρμολογείτε κατάλληλα η συσκευή γυάλινων πλακών που θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD).
- ❖ Κατασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού στην κατάλληλη πυκνότητα (Πίνακας 3)
- ❖ Το μείγμα τοποθετείται πολύ γρήγορα στο σύστημα των γυάλινων πλακών, στην επιφάνεια του προστίθεται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμιση του υγρού.
- ❖ Το πήκτωμα αφήνεται σε ηρεμία ~20λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός
- ❖ Κατασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 5%
- ❖ Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με νερό και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης.
- ❖ Τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για την δημιουργία πηγαδιών ,αφήνεται σε ηρεμία για ~15 λεπτά να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στο στάδιο αυτό το πήκτωμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 ° C ή να χρησιμοποιηθεί την ίδια μέρα μετά το πέρας τουλάχιστον 45 λεπτών.
- ❖ Η κατασκευή με το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
- ❖ Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 λίτρο περίπου 1X SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
- ❖ Ανάμειξη πρωτεϊνών με διάλυμα Laemmli το οποίο περιέχει 4.2% β-μερκαπτοαιθανόλη
- ❖ Θέρμανση των δειγμάτων στους 95 ° C για 5 λεπτά.
- ❖ Αφαιρείται το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοιβάξης και φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτή, με τελικό όγκο 24 μl.
- ❖ Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (μάρτυρας μοριακών βαρών), έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν. Οι ζώνες του δείκτη είναι χρωματισμένες και είναι εύκολο να ελεγχθεί η πορεία της ηλεκτροφόρησης.
- ❖ Η δεξαμενή καλύπτεται και η διάταξη λειτουργεί στα 110 Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής να περάσει στο stacking gel και συνεχίζει στα 150 Volt μέχρι το τέλος.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση παραλαμβάνεται η πηκτή και αρχίζει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών.

Τα στάδια που ακολουθούνται κατά την υγρή ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών είναι τα εξής :

- ❖ Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) νερό.
- ❖ 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.
- ❖ τοποθέτηση στην συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω των εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, άλλα 2 χαρτιά Whatman και τέλος 1 ακόμη «σφουγγαράκι»
- ❖ Η συσκευή συναρμολογείται και μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών η οποία γεμίζει με 1L υγρό μεταφοράς.
- ❖ Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (8oC). Ανάλογα με το μέγεθος των υπό ανίχνευση πρωτεϊνών, η μεταφορά γίνεται στα 200mA για 2 ώρες .

Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών:

Χρησιμοποιούνται 2 αντισώματα για την ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για την υπό εξέταση πρωτεΐνη ενώ το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό και αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα. Επίσης είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxide). Με την αξιοποίηση μίας τεχνικής χημειοφωταύγειας (ECL), το HRP αντιδρά με το παρεχόμενο υπόστρωμα και παράγει φως.

Για την απεικόνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται φωτογραφικά φιλμ , τα οποία καίγονται από το παραγόμενο φως και απεικονίζονται σε αυτά η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη πριν επωαστεί με τα αντισώματα, επώάζεται με διάλυμα γάλακτος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Αυτό γίνεται γιατί η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων, αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο τις θέσεις που βρίσκονται οι πρωτεΐνες .

Η διαδικασία επώασης με τα αντισώματα έχει ως εξής :

- ❖ Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη επάζεται με διάλυμα γάλακτος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking).
- ❖ Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T (TBSbuffer/Tween 20).
- ❖ Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4 °C ή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Το πρωτογενές αντίσωμα επαναιωρείται σε διάλυμα TBS-T+Gelatin 2% ή σε διάλυμα γάλακτος.
- ❖ Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T.
- ❖ Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα επαναιωρείται σε διάλυμα γάλακτος.
- ❖ Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T.
- ❖ Ακολουθεί ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το kit: Clarity Western ECL Substrate της εταιρείας Biorad. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- ❖ Επώαση της μεμβράνης με 800 μl από το κάθε διάλυμα εμφάνισης του kit για 5 λεπτά σε συνθήκες σκότους για 5 λεπτά.
- ❖ Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα στην κασέτα εμφάνισης .
- ❖ Τοποθέτηση φωτογραφικού φιλμ πάνω στη μεμβράνη για 0,5-45 λεπτά.
- ❖ Επώαση του φιλμ για 1-3 λεπτά σε εμφανιστικό υγρό (developer).
- ❖ Πλύση του φιλμ σε νερό για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του developer.
- ❖ Επώαση του φιλμ για 1-2 λεπτά σε υγρό σταθεροποίησης σήματος (fixer).
- ❖ Πλύση του φιλμ με νερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη φυλάσσεται στους -20°C. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα φιλμ σκανάρονται και γίνεται επεξεργασία των πρωτεϊνικών ζωνών.

B.2.8. ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ SDS - ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ COOMASSIE BLUE

Μόλις οι πρωτεΐνες διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση μπορούν να οπτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης σε πηκτή. Οι πρωτεΐνες χρωματίζονται με οργανικές χρωστικές για να οπτικοποιηθούν και για να

μπορέσουν να γίνουν οι συγκρίσεις μεταξύ της έντασης των ζωνών των πρωτεϊνών για την παρατήρηση και τον προσδιορισμό των διαφορών στην σύγκριση των πρωτεϊνών.

Η πιο κοινή μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών σε πηκτή είναι η χρώση με βαφή Coomassie. Το Coomassie – Brilliant Blue είναι μια βαφή που χρησιμοποιείται συνήθως για την απεικόνιση πρωτεϊνών που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση με βάση τα μοριακά βάρη τους. Αποτελεί μια απλή διαδικασία χρώσης προσφέρει υψηλή ποσοτικοποίηση και είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη .

Η βαφή Coomassie μπορεί να χρωματίσει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες εντός 1 ώρας και απαιτείται μόνο νερό για αποχρωματισμό. Σε όξινες συνθήκες, η βαφή Coomassie συνδέεται με βασικά και υδρόφοβα υπολείμματα πρωτεϊνών, αλλάζοντας το χρώμα από ένα θαμπό κοκκινοκαφέ σε έντονο μπλε .

Η διαδικασία που ακολουθείται για την χρώση πηκτής SDS - πολυακρυλαμιδίου με coomassie blue είναι η εξής :

- ❖ Τοποθέτηση της πηκτής σε ~ 25 ml διαλύματος μονιμοποίησης (Fixation solution) για 1 h υπό ανακίνηση .
- ❖ Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 4 πλύσεις με δις απεσταγμένο H₂O διάρκειας 15 λεπτών η κάθε μια .
- ❖ Η πηκτή καλύπτεται από ~ 25 ml διαλύματος Coomassie Blue και αφήνεται σε σκοτάδι ολονυχτίς (O/ N)
- ❖ Την επόμενη μέρα ακολουθούν 4 πλύσεις με δις απεσταγμένο H₂O διάρκειας 15 min η κάθε μια.
- ❖ Τέλος η πηκτή τοποθετείται ανάμεσα από 2 ζελατίνες και σκανάρεται . Η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί στους 4 ° C.

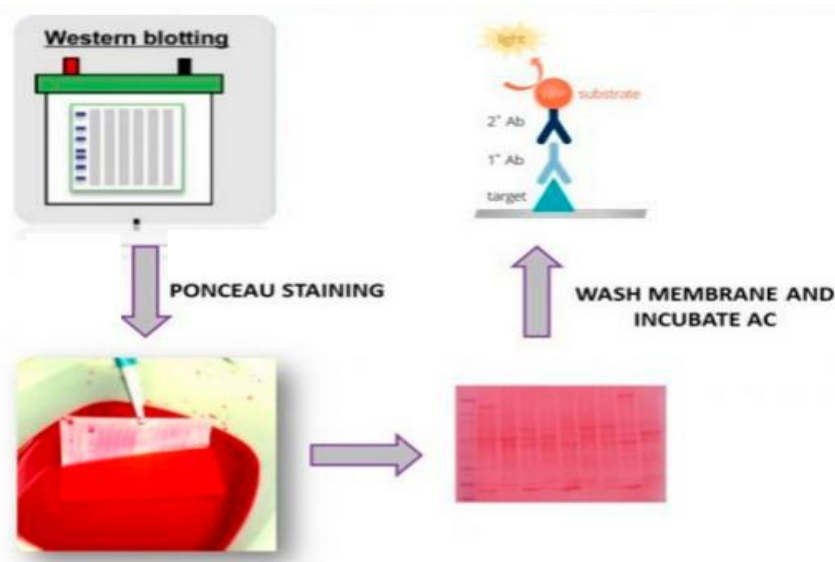
B.2.9. ΧΡΩΣΗ MEMBRANΗΣ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΜΕ PONCEAU S

Η χρώση Ponceau S είναι μία ταχεία και αναστρέψιμη μέθοδος χρώσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το Ponceau S είναι μια αρνητικά φορτισμένη χρώση που συνδέεται με τις θετικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες της πρωτεΐνης (άμινο ομάδες) και τις μη πολικές περιοχές της πρωτεΐνης. Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται για τη μέτρηση μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών καθώς λαμβάνονται κόκκινου χρώματος πρωτεϊνικές ζώνες. Το γεγονός ότι η χρώση των πρωτεϊνών με διάλυμα Ponceau S είναι αναστρέψιμη καθιστά την μεμβράνη χρήσιμη για περαιτέρω ανοσολογική ανίχνευση.

Η χρώση Ponceau S είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό και την αναγνώριση των πρωτεϊνών που μεταφέρονται με ηλεκτροφόρηση στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης πριν γίνει η επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, καθώς η χρωστική δεν παρεμβαίνει στην ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω αντισωμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την χρώση της μεμβράνης με διάλυμα Ponceau S είναι η εξής:

- ❖ Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα σε νερό , μέχρι να καλυφθεί η μεμβράνη με το νερό .
- ❖ Ακολουθούν τρεις πλύσεις της μεμβράνης με νερό, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μια .
- ❖ Η μεμβράνη καλύπτεται με διάλυμα Ponceau S και αφήνεται σε αυτό 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό προκειμένου να χρωματιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών στην μεμβράνη και να είναι ευδιάκριτες .
- ❖ Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με νερό διάρκειας 30 δευτερολέπτων έως ενός λεπτού .
- ❖ Στεγνώνουμε την μεμβράνη στον αέρα , καλύπτεται με μία ζελατίνη και ακολουθεί φωτογράφιση και σκανάρισμα της μεμβράνης.
- ❖ Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T, προκειμένου να αποχρωματιστούν οι κόκκινες ζώνες των πρωτεϊνών και έπειτα η μεμβράνη είναι έτοιμη για blocking και επώαση αντισωμάτων .



Εικόνα 17: Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που ανιχνεύονται μέσω ανοσοαποτύπωσης Western .¹⁰⁴

B.2.10. ΑΠΟΜΑΚΡΥΜΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ WESTERN BLOT (STRIPPING)

Ο όρος stripping χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απομάκρυνση πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Western blot. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη στην περίπτωση ανίχνευσης πολλών πρωτεϊνών στην ίδια μεμβράνη και έχει το πλεονέκτημα της εξοικονόμησης δειγμάτων, αντιδραστηρίων, υλικών και χρόνου.

Επίσης είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δεν είναι σκόπιμο να γίνονται ποσοτικές συγκρίσεις των επιπέδων των πρωτεϊνών που ελέγχθηκαν πριν και μετά την μέθοδο stripping, καθώς κατά την διαδικασία αυτή απομακρύνεται ένα μέρος από την αρχική ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε .

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το stripping της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης Western Blot είναι η εξής:

- ❖ Ξεπάγωμα των μεμβρανών από τους -20°C , οι οποίες επώαστηκαν ήδη με αντισώματα για την ανίχνευση πρωτεϊνών .
- ❖ Επώαση των μεμβρανών με το stripping buffer για 10 λεπτά.
- ❖ Απόρριψη του stripping buffer.
- ❖ Επανάληψη επώασης της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με stripping buffer για δέκα λεπτά.
- ❖ Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα TBS 1 X (3 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μια).
- ❖ Πραγματοποιούνται πλύσεις της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα TBS-T (3 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μία).
- ❖ Στο σημείο αυτό έχουν απομακρυνθεί τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση της μεμβράνης .
- ❖ Η μεμβράνη πλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκ νέου επώαση με αντισώματα .

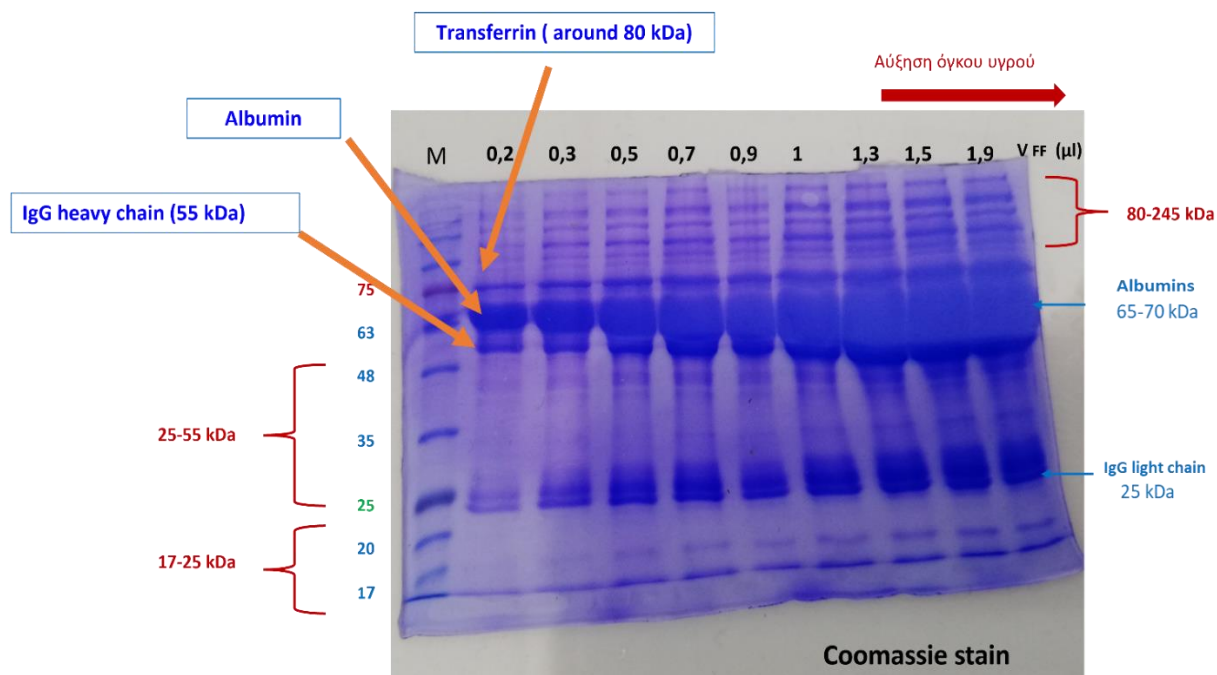
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Γ.1.1 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης ποσότητας ωοθυλακικού υγρού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε western blot, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί όγκοι ωοθυλακικού υγρού από 0,2 μl έως 1,9 μl ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια μιας γυναίκας που υποβλήθηκε σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των διαφορετικών όγκων του ωοθυλακικού υγρού σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 % και στην συνέχεια η πηκτή χρωματίστηκε με διάλυμα Coomassie blue, οπότε εμφανίστηκαν οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του ωοθυλακικού υγρού. Όσο αυξάνεται ο όγκος του ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιείται αυξάνεται και η ποσότητα των πρωτεϊνών που απαρτίζουν το ωοθυλακικό υγρό και αυτό αποτυπώνεται στην πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου με την χρώση των ζωνών των πρωτεϊνών.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται, ότι το ωοθυλακικό υγρό είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες του ορού του πλάσματος. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ωοθυλακικό υγρό είναι οι εξής: η ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 25 kDa, η βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 55 kDa, οι αλβουμίνες που εμφανίζονται στα 65 – 70 kDa και η τρανσφερίνη που εμφανίζεται περίπου στα 80 kDa . Το γεγονός ότι το ωοθυλακικό υγρό βρίθει από πρωτεΐνες του πλάσματος οι οποίες εμφανίζονται σε διαφορετικά μοριακά βάρη, καλύπτοντας ένα αρκετά μεγάλο εύρος μοριακών βαρών, περιορίζει αρκετά το εύρος της περιοχής μοριακών βαρών που μπορούμε να μελετήσουμε για την ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών και παραγόντων του ωοθυλακικού υγρού που θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει βιοδείκτες της ποιότητας των ωαρίων. Επομένως η περιοχή των μοριακών βαρών που απομένει να μελετήσουμε είναι οι εξής : από 17 έως 25 kDa, από 25 έως 55 kDa και από 80 έως 245 kDa .



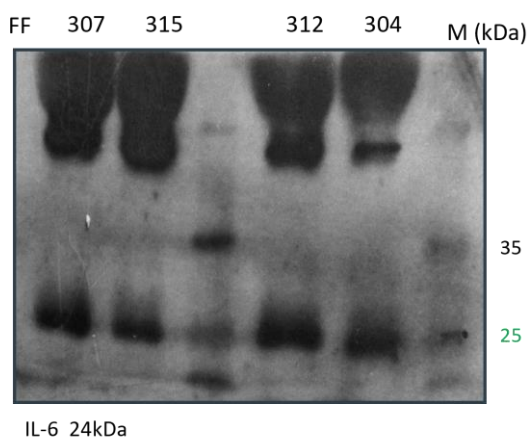
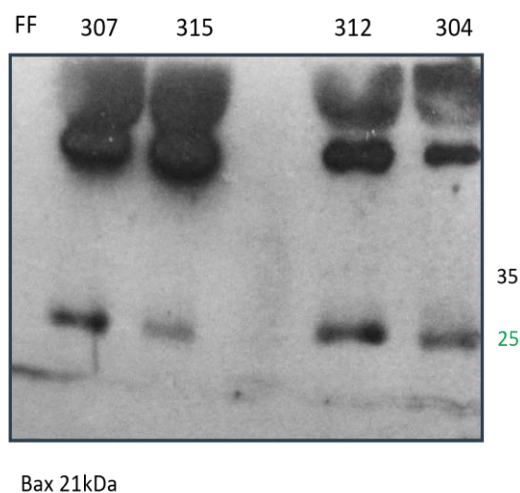
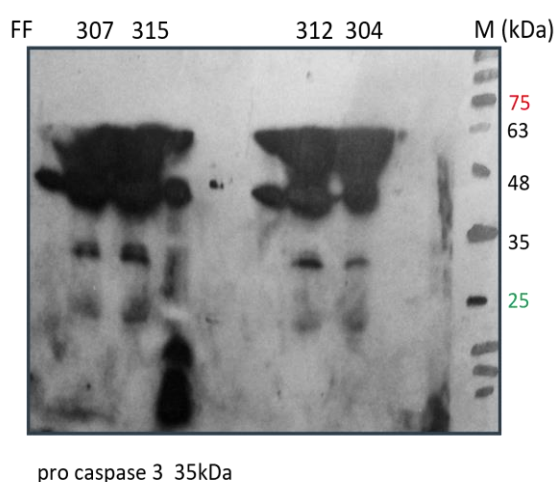
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση διαφορετικών όγκων από 0,2 έως 1,9 μl ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 % και χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue.

Γ. 1.2 ΑΡΧΙΚΑ ΠΙΛΟΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ .

Στην προσπάθεια εύρεσης μιας βέλτιστης ποσότητας ωοθυλακικού υγρού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια διαφορετικών γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 % και χρησιμοποιήθηκε 1 μl ωοθυλακικού υγρού από κάθε δείγμα. Η επιλογή των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού ήταν τυχαία, καθώς δεν μας ενδιέφερε σε ένα αρχικό στάδιο η συσχέτιση με το βιολογικό αποτέλεσμα αλλά να διαπιστώσουμε αν τα αντισώματα που διαθέτουμε αναγνωρίζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του ωοθυλακικού υγρού.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προκειμένου να επωαστούν με τα αντισώματα που μας ενδιαφέρουν. Ελέγχθηκαν δυο πρωτεΐνες του μονοπατιού της απόπτωσης. Αυτές είναι η pro - caspase που εμφανίζεται στα 35 kDa μαζί με την ενεργοποιημένη μορφή της, τη caspase -3 που εμφανίζεται στα 12 και 17 kDa και αποτελεί τον εκτελεστή της απόπτωσης καθώς βρίσκεται στο τελευταίο στάδιο και προκαλεί τον

κατακερματισμό του DNA. Ο άλλος παράγοντας που ελέγχθηκε είναι ο προ-αποπτωτικός παράγοντας Bax που εμφανίζεται στα 23 kDa, δρα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και επάγει την απόπτωση. Επιπλέον, ελέγχθηκε και μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη στο ωοθυλακικό υγρό, η IL-6 που εμφανίζεται στα 24 kDa.



Εικόνα 19 : Έλεγχος των παραγόντων απόπτωσης pro-caspase 3, caspase 3, bax και της εκκρινόμενης IL-6 στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή με την μέθοδο western blot.

Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν αναγνώρισαν μόνο τις πρωτεΐνες που μας ενδιέφεραν να ελέγχουμε αλλά και τις πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς εμφανίστηκαν και άλλες ζώνες εκτός αναμενόμενες. Αυτές οι ζώνες αντιστοιχούν τόσο στις αλβουμίνες όσο και στην

ανοσοσφαιρίνη IgG. Όσον αφορά τον έλεγχο της pro-caspase 3 και της ενεργοποιημένης μορφής της caspase 3, λήφθηκαν ζώνες στα 35 kDa που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν στην pro-caspase 3 αλλά δεν λήφθηκαν ζώνες στα 12 και 17 kDa που αντιστοιχούν στην ενεργοποιημένη μορφή της caspase -3. Όσον αφορά τον έλεγχο του παράγοντα Bax που εμφανίζεται στα 21 kDa, λήφθηκε μια ζώνη περίπου στα 25 kDa που θα μπορούσε να αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Bax . Ωστόσο είναι περισσότερο πιθανό η ζώνη αυτή να αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 25 kDa παρά στη Bax . Η ανοσοσφαιρίνη IgG δυσκολεύει την ανίχνευση και τον εντοπισμό της Bax καθώς φαίνεται να καλύπτει το σήμα για την Bax . Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και για την IL-6, η οποία εμφανίζεται στα 24 kDa. Οι ζώνες που εμφανίζονται στα 25 kDa είναι περισσότερο πιθανό να αντιστοιχούν στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG παρά στην IL-6.

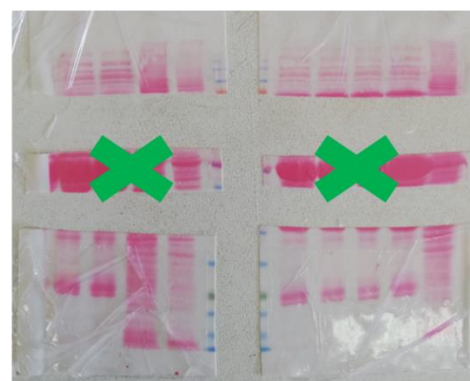
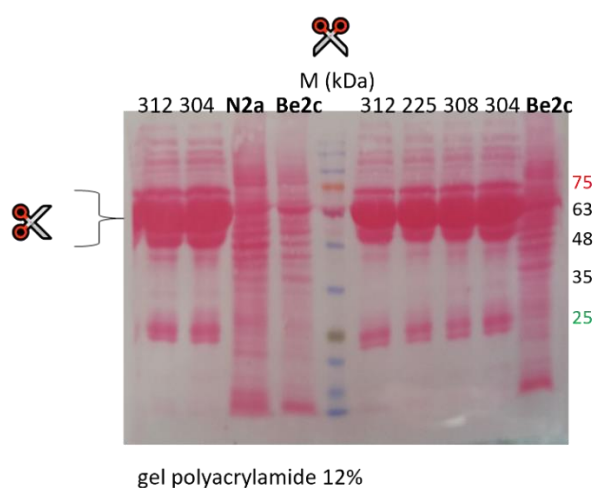
Γ. 1.3 ΤΡΟΠΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT.

Όπως φάνηκε και παραπάνω, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Αυτό συνέβη κυρίως για δυο λόγους. Ο πρώτος είναι ότι χρησιμοποιήθηκε μεγάλος όγκος δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού όπως φάνηκε από το εύρος των ζωνών, και ο δεύτερος είναι ότι όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για να αναγνωρίσουν τις πρωτεΐνες που μας ενδιέφεραν, αναγνώρισαν επίσης και τις πρωτεΐνες του πλάσματος (αλβουμίνες και ανοσοσφαιρίνη IgG) με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να θεωρήσουμε το σήμα που λαμβάνεται αξιόπιστο. Προέκυψε λοιπόν, η ανάγκη να βρεθούν τρόποι βελτίωσης της μεθόδου ανίχνευσης πρωτεϊνών σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού.

Αρχικά, φορτώθηκε όγκος δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού μικρότερος από 1 μl, αφού η ποσότητα του ενός μικρολίτρου δεν κρίθηκε κατάλληλη. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 0,7 μl ωοθυλακικού υγρού. Η ποσότητα αυτή επιλέχθηκε με βάση τις ποσότητες που φορτώθηκαν στην πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 % που χρωματίστηκε με Coomassie brilliant blue . Επίσης, ήταν απαραίτητη η χρήση θετικού μάρτυρα για τον έλεγχο των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν προκειμένου να γνωρίζουμε ότι οι ζώνες που λαμβάνονται είναι ειδικές για τις πρωτεΐνες που ελέγχονται και δεν αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές

νευροβλαστώματος ποντικού Neuro2A (N2A) καθώς και από κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος ανθρώπου Be2c, στις οποίες γνωρίζουμε ότι εκφράζονται οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο ωοθυλακικό υγρό. Έτσι λοιπόν, μαζί με τα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού φορτώθηκε και ποσότητα κυτταρικών εκχυλισμάτων N2A και Be2c που αντιστοιχεί σε 30 μg πρωτεΐνης.

Ακολούθησε χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα ponceau S προκειμένου να αποκαλυφθούν οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ετσι, οι πρωτεΐνες βάφτηκαν με κόκκινο χρώμα, και ακολουθήσε προσεκτικό κόψιμο της μεμβράνης στην περιοχή των μοριακών βαρών που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Αυτός ήταν ένας εύκολος τρόπος να απαλλαχθούμε από τις πρωτεΐνες αυτές χωρίς να χρησιμοποιηθεί κάποιο εμπορικό kit. Τέλος, έγινε η προσθήκη αντισωμάτων στις εναπομείνουσες μεμβράνες για τον έλεγχο των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν.



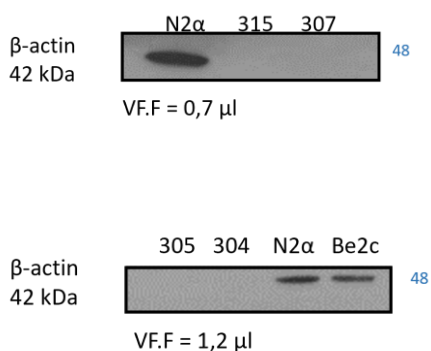
Εικόνα 20: Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S και απομάκρυνση της περιοχής μοριακών βαρών της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες του πλάσματος

Γ.1.4 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Τα βιολογικά δείγματα ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και είχαμε στην διάθεσή μας να μελετήσουμε ήταν διαφορετικά μεταξύ τους όσον αφορά την πρωτεϊνική τους συγκέντρωση. Έτσι, προέκυψε η ανάγκη να βρεθεί ένας τρόπος να ελεγχθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων, για να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους και να πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση των ζωνών.

Ένας συνηθισμένος και αξιόπιστος μάρτυρας, τα επίπεδα του οποίου δεν μεταβάλλονται μεταξύ βιολογικών δειγμάτων είναι η ακτίνη. Η ακτίνη υπάρχει άφθονη σε όλα τα κυτταρικά εκχυλίσματα, και αν γίνει κανονικοποίηση στην ποσότητα αυτής της πρωτεΐνης, οποιαδήποτε διαφορά παρατηρείται στα υπόλοιπα δείγματα ωοθυλακικού υγρού θα οφείλεται σε υπάρχουσες διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων.

Χρησιμοποιήθηκε όγκος 0,7 μ l από ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς και κυτταρικά εκχυλίσματα N2A ως θετικός μάρτυρας προκειμένου να ανιχνευτεί ακτίνη. Η προσπάθεια ανίχνευσης της ακτίνης ήταν ανεπιτυχής καθώς εμφανίστηκε ζώνη μόνο για τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2A. Σε επόμενη προσπάθεια αυξήθηκε ο όγκος ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκε στα 1,2 μ l και χρησιμοποιήθηκαν και κυτταρικά εκχυλίσματα N2A και Be2c. Ωστόσο και αυτή η προσπάθεια αποδείχθηκε ανεπιτυχής για την ανίχνευση ακτίνης στα ωοθυλακικά υγρά καθώς εμφανίστηκαν ζώνες μόνο για τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2A και Be2c.

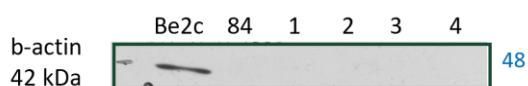


Εικόνα 21: Προσπάθεια ανίχνευσης ακτίνης σε διαφορετικές ποσότητες δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού, γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Τέλος, έγινε επεξεργασία των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού με διάλυμα Rira 1X και αναστολείς πρωτεασών, προκειμένου να πραγματοποιηθεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης υπολειμμάτων κυττάρων που ενδεχομένως παρέμειναν στο ωοθυλακικό υγρό και δεν απομακρύνθηκαν. Φορτώθηκαν διαφορετικοί όγκοι ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού με διάλυμα Rira 1X και αναστολείς πρωτεασών από 1,16 μl έως και 6 μl μέχρι τελικού όγκου 15 μl. Ο σκοπός ήταν να ανιχνευτεί η ακτίνη η οποία θα απελευθερωνόταν από τα υπολείμματα κυττάρων που ενδεχομένως παρέμειναν στο ωοθυλακικό υγρό. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση η προσπάθεια δεν ήταν επιτυχής για την ανίχνευση ακτίνης στα επεξεργασμένα δείγματα ωοθυλακικού υγρού καθώς λήφθηκε μόνο μία ζώνη για τα κυτταρικά εκχυλίσματα Be2c. Επομένως, αξιοποιήθηκε η ένταση των ζωνών όπως αυτή φαίνεται με την χρώση ponceau, για την κανονικοποίηση των blot .

Συμβολισμός δείγματος	Όγκος F.F με Rira 1x (μL)	Τελικός ογκος με Rira 1X (μl)
1	1,16	15
2	1,5	15
3	3	15
4	6	15

Πίνακας 4: Όγκοι ωοθυλακικού υγρού που φορτώθηκαν με Rira 1X και αναστολείς πρωτεασών .



Εικόνα 22: Προσπάθεια ανίχνευσης ακτίνης σε δείγμα ωοθυλακικού υγρού που επεξεργάστηκε με διαφορετικούς όγκους Rira 1X και αναστολείς πρωτεασών .

Γ.1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ WESTERN BLOT.

Το εργαστήριο Μοριακής Γενετικής διαθέτει μια τράπεζα ωοθυλακικών υγρών. Συγκεκριμένα διατίθενται πάνω από 500 δείγματα ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, τα οποία συλλέγονται από το 2018 έως και σήμερα από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, σε συνεργασία με την μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα δείγματα που συλλέγονται, υφίσταται επεξεργασία και διατηρούνται στους -80°C .

Έτσι λοιπόν, διαθέτουμε επαρκή αριθμό και ποικιλία δειγμάτων για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μας καθώς τα δείγματα που συλλέγονται προέρχονται από γυναίκες που εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Διατίθενται επαρκής ποσότητα ωοθυλακικού υγρού από κάθε δείγμα αφού απομονώνονται συνολικά 15 ml ωοθυλακικού υγρού από τα οποία χρησιμοποιούνται μόλις 0,7 ml για την ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο Western. Τα δείγματα ωοθυλακικού υγρού είναι εύκολα διαθέσιμα καθώς αναρροφώνται ταυτόχρονα με το ωάριο την στιγμή της ωοληψίας, χωρίς να διακυβεύεται το ωάριο. Επίσης, η σωστή οργάνωση και η φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C είναι απαραίτητη έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε το ίδιο δείγμα ωοθυλακικού υγρού περισσότερες από μία φορά ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος.

Τα δείγματα ωοθυλακικού υγρού καταγράφονται σε ένα αρχείο excel, με όλες τις πληροφορίες που χρειάζεται να έχουμε στην διάθεσή μας. Ενδεικτικά κάποιες από αυτές είναι: α) η ηλικία της γυναίκας, β) η παθολογική της κατάσταση (ύπαρξη ή όχι συνδρόμου PCOS), γ) το πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών (Menopure ή Gonal F), δ) ο δείκτης μάζας σώματος (BMI), ε) τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών, στ) τα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Αυτό μας επιτρέπει, να γίνει συσχέτιση όλων αυτών των χαρακτηριστικών με τους βιοχημικούς δείκτες που ενδεχομένως υπάρχουν στο ωοθυλακικό υγρό και την έκβαση της εγκυμοσύνης των γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Αριθμός	ΑΡΧΙΚΑ ΟΝΟΜΑΤΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ	Πρωτόκολλο	Pregnancy	No of oocytes	No of 2nd division	FSH	LH	AMH ng/ml	PROG. ng/ml	ESTR. pg/ml	BMI (kg/m2)
2	84	ΠΟ	24	Cetrotide - Menopur 150gr	YES	16	7	4			1,9	5000	
3	160	PM	23	Cetrotide- Menopur 150g	NO	12	2	5,6		0,02	1,05	1811	
4	178	BA	30	Cetrotide- Menopur 225gr	YES	8	3	2,2	4,67		0,5	2415	100 ? (obese class III)
5	185	ΠΓ	34	Cetrotide- Menopur 300gr	NO	14	10	5,5		15,85pmol/l			
6	187	TX	32	Cetrotide- Menopur 225gr	YES	8	4	7,46	5,25	32,7pmol/l			
7	195	ΔΕ	35	Cetrotide- Menopur 225gr	NO	8	2	4,19	3,92	0,77	1,4	2784	
8	216	ΔΕ	30	Cetrotide- Menopur 225gr	NO	11	7	4,45	4,56	17,5pmol/l	1,15	3953	27.1 (overweight)
9	224	ΚΕ	36	Cetrotide- Menopur 250gr	YES	4	4	12,7	8,8	1,2ng/ml	0,88	1408	24.8 (normal)
10	231	ΚΟ	29	Cetrotide- Menopur 225gr	NO	6	4	8,4		17,2pmol/l	1,02	1939	35.9 (obese class II)
11	72	ΛΦ - PCOS	30	Cetrotide - Menopur 200gr	YES	11	10	6,1			0,06	1719	
12	78	ΠΔ - PCOS	31	Cetrotide - Menopur 225gr	YES	21	15	6,5		2,6	0,5	1732	
13	96	ΖΠ - PCOS	29	Cetrotide- Menopur 250g	YES	9	5	7,8			0,56	3728	
14	110	ΣΑ - PCOS	36	Cetrotide- Menopur 225g	NO	15	3	7,1		0,88	0,38	6460	

Εικόνα 23: Ενδεικτικό αρχείο excel που παρουσιάζει την οργάνωση δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθώς και τις πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των γυναικών αυτών .

Έγινε επιλογή ομοιογενών δειγμάτων γυναικών με πλήρες ιστορικό, για τις οποίες γνωρίζαμε την έκβαση της εγκυμοσύνης . Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ωοθυλακικού υγρού για την ανίχνευση πρωτεϊνών με Western blot, για τα οποία ελήφθησαν υπόψη τα χαρακτηριστικά των γυναικών, έτσι ώστε να συσχετιστούν με τους βιοχημικούς δείκτες που ενδεχομένως ανιχνευτούν στο ωοθυλακικό υγρό και την έκβαση της εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα τα 3 βασικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 είναι η ηλικία , η πάθηση και το πρωτόκολλο ωοθηκικής διέγερσης που δίνεται σε κάθε γυναίκα πριν την εξωσωματική γονιμοποίηση προκειμένου να ωριμάσει μεγάλος αριθμός ωοθυλακίων. Με βάση **την ηλικία** οι γυναίκες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες στις γυναίκες μικρής ηλικίας (κάτω από 35 ετών ή 35 ετών) και στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας (πάνω από 35 ετών). Με βάση **την πάθηση** χωρίστηκαν σε 2 ομάδες που αντιστοιχούν στην ύπαρξη ή όχι Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS). **Η φαρμακευτική αγωγή** που χορηγήθηκε στις γυναίκες είναι το hMG (φάρμακο Menopur) ή το recFSH (φάρμακο Gonal F).

Κατηγορίες Χαρακτηριστικών	Χαρακτηριστικά που μας ενδιαφέρουν
Ηλικία	Young (<35) Aged (>35)
Πάθηση	PCOS /non PCOS
Πρωτόκολλο διέγερσης	hMG (Menopur) / recFSH (Gonal F)

Πίνακας 5 : Οι κατηγορίες χαρακτηριστικών των υπό μελέτη γυναικών .

Γ.1.6 ΕΥΡΕΣΗ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Γ.1.6.1 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ IL-6 ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Η ποιότητα ενός ωοκυττάρου επηρεάζεται από το μικροπεριβάλλον του, το οποίο συμπεριλαμβάνει τα κοκκώδη κύτταρα, το ωοθυλακικό υγρό καθώς και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα προϊόντα τους. Οι ιντερλευκίνες των ωοθηκών, οι οποίες εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα και άλλα ανοσοκύτταρα εντός των ωοθυλακίων, ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες που περιλαμβάνουν την ωοθυλακιογένεση, την ωογένεση, της ωορρηξία, τη γονιμοποίηση, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την εμφύτευση του εμβρύου, και τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου.

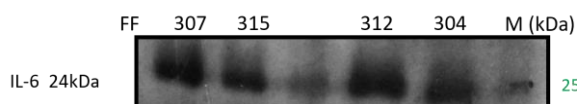
Η ιντερλευκίνη IL-6 αποτελεί μία κυτοκίνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Όσον αφορά, την ωοθυλακιογένεση, οι κυτοκίνες ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την επιβίωση ή την ατρησία των ωοθυλακίων και την ωρίμανση των ωαρίων. Τα επίπεδα της IL-6 στο ωοθυλακικό υγρό είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά στον ορό. Τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης IL-6 στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση συσχετίστηκαν με καλής ποιότητας ωάρια και με υψηλή πιθανότητα εγκυμοσύνης και εμφύτευσης εμβρύων.¹⁰⁵

Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ανίχνευσης της ιντερλευκίνης IL-6 σε ωοθυλακικά υγρά γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με την μέθοδο Western. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γυναικών που έλαβαν το ίδιο πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών και διέφεραν ως προς την ηλικία και την παθολογική κατάσταση, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα .

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
307	Gonal F	38	PCOS
315	Gonal F	28	PCOS
312	Gonal F	43	-
304	Gonal F	26	-

Πίνακας 6 : Τα δείγματα των γυναικών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της IL-6 .

Δυστυχώς το σήμα που λήφθηκε δεν θεωρήθηκε αξιόπιστο καθώς εμφανιζόταν στα 25 kDa και ενδεχομένως αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και όχι στην IL-6 που εμφανίζεται στα 24 kDa. Επιπλέον, το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της IL-6 στα ωοθυλακικά υγρά αναγνωρίζει και πρωτεΐνες του πλάσματος και αυτό καθιστά ακόμα πιο δύσκολη την ανίχνευση της. Έτσι λοιπόν, καταλήγουμε ότι είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των πρωτεϊνών του ορού από τα ωοθυλακικά υγρά κυρίως της ανοσοσφαιρίνης IgG για την ανίχνευση της IL-6 με την μέθοδο western ή η χρήση άλλου είδους τεχνικών όπως της μεθόδου ELISA .



Εικόνα 24: Προσπάθεια ανίχνευσης της εκκρινόμενης ιντερλευκίνης IL-6 στο ωοθυλακικό υγρό από ωοθυλάκια γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .

Γ.1.6.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF παίζει ρόλο στην περιωθυλακική αγγειογένεση και στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου ενώ αποτελεί και δείκτη υποξίας λόγω ενεργοποίησης της σύνθεσής του ως απάντηση στην υποξία του συμπλέγματος κοκκώδη κύτταρα-ωοκύτταρο. Αποτελεί δείκτη καλύτερης κυκλοφορίας του αίματος και υψηλότερου βαθμού αγγείωσης των ωοθυλακίων, δίνοντας ωάρια πιο ικανά να γονιμοποιηθούν. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό οδηγεί σε αποτυχία γονιμοποίησης του ωαρίου και σε όχι σε καλή μορφολογία του εμβρύου, ενώ αποτελεί και αρνητικό δείκτη της ποιότητας του ωαρίου.⁶⁸

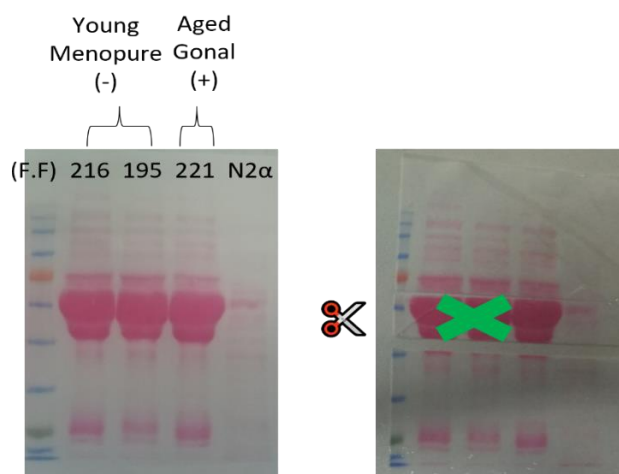
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ανίχνευσης του VEGF σε μικρό αριθμό δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού, γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο παράγοντας VEGF μπορεί να εντοπιστεί στο ωοθυλακικό υγρό και να διακριθεί από τις ανοσοσφαιρίνες IgG που εμφανίζονται στα 25 kDa. Ελέγχθηκαν δύο νεαρές γυναίκες που έλαβαν Menopure, με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης και μία γυναίκα μεγάλης ηλικίας που έλαβε Gonal F, με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Έκβαση εγκυμοσύνης
216	Menopure	30	-	αρνητική (-)
195	Menopure	35	-	αρνητική (-)
221	Gonal F	42	-	Θετική (+)

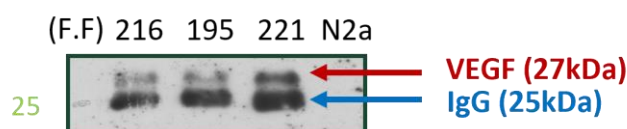
Πίνακας 7 : Τα δείγματα των γυναικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF

Πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών του ορού στα δείγματα ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν, με διάλυμα Ponceau S, όπως αυτή φαίνεται στην εικόνα 25. Στην εικόνα 26 μπορεί να γίνει η διάκριση των δύο ζωνών, δηλαδή της πάνω ζώνης που αντιστοιχεί στον παράγοντα VEGF και εμφανίζεται στα 27 kDa και της κάτω ζώνης που αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και εμφανίζεται στα 25 kDa. Επίσης στην εικόνα 26, φαίνεται ότι

η μεγάλη σε ηλικία γυναίκα που έλαβε Gonal F, με θετική έκβαση εγκυμοσύνης εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με τις νεαρές γυναίκες που έλαβαν Menopure, με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης. Ο έλεγχος ενός μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων θα μπορούσε να μας δείξει, αν ο παράγοντας VEGF μπορεί να σχετίζεται με το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης και την ηλικία.



Εικόνα 25: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF και κόψιμο της μεμβράνης και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες



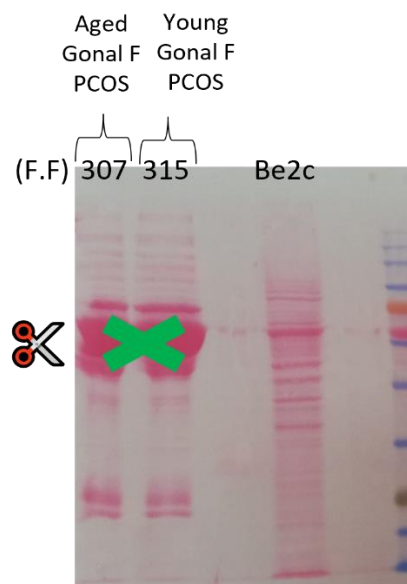
Εικόνα 26: Διάκριση των ζωνών που αντιστοιχούν στον παράγοντα VEGF και στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και διαφοροποίηση των εντάσεων των ζωνών που αντιστοιχούν στον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF σε ωοθυλακικά υγρά γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .

Έπειτα, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης του παράγοντα VEGF σε δύο γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, εμφάνιζαν πολυκυστικές ωοθήκες, είχαν λάβει και οι δύο Gonal F για την διέγερση των ωοθηκών τους και διέφεραν ως προς την ηλικία καθώς η μια ήταν μεγάλη σε ηλικία και η άλλη μικρή. Ως θετικός μάρτυρας για την ανίχνευση του VEGF, χρησιμοποιήθηκε κυτταρικό εκχύλισμα από ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος Be2c.

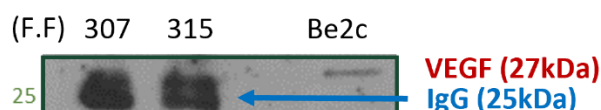
Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
307	Gonal F	38	PCOS
315	Gonal F	28	PCOS

Πίνακας 8 : Τα δείγματα των γυναικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27 ,πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα Ponceau S και κόψιμο της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες αυτές. Παρατηρήθηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση, ήταν ευδιάκριτος ο διαχωρισμός των ζωνών, δηλαδή της ζώνης που αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και της ζώνης που αντιστοιχεί στον παράγοντα VEGF καθώς κάτω βρίσκεται η ζώνη για την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG στα 25 kDa ,και πάνω η ζώνη για τον παράγοντα VEGF στα 27 kDa. Το σήμα μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο και μπορούμε να διακρίνουμε τις ζώνες που αντιστοιχούν στον παράγοντα VEGF και την IgG, οπότε στην συνέχεια των πειραμάτων για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, θα πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση με βάση την πάνω ζώνη που είναι και αυτή που αντιστοιχεί στον παράγοντα VEGF.



Εικόνα 27: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF και κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες .



Εικόνα 28: Επιβεβαίωση διάκρισης μεταξύ των ζωνών, που αντιστοιχούν στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και στον παράγοντα VEGF, σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .

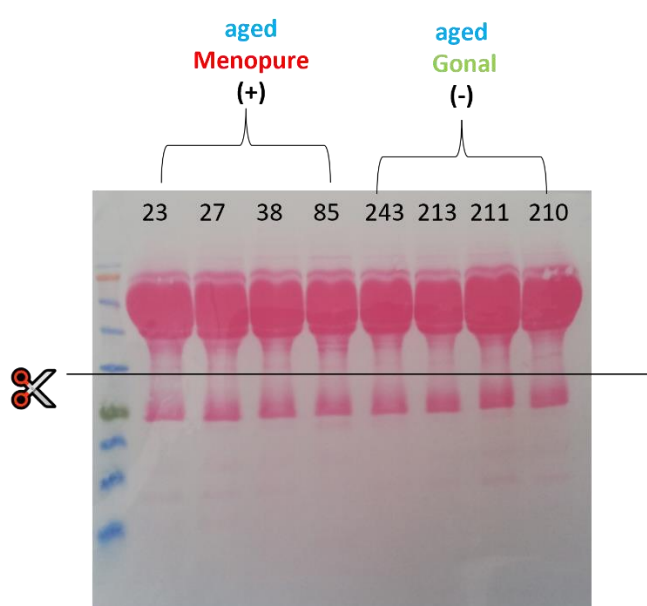
Γ.1.6.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ VEGF ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

Αφού έγινε ανίχνευση του παράγοντα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό , και διάκριση της ζώνης που αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και της ζώνης που αντιστοιχεί στον παράγοντα VEGF, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του VEGF σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού. Έτσι λοιπόν, ελέγχθηκαν τα επίπεδα VEGF μεταξύ τεσσάρων γυναικών που έλαβαν Menopure, με θετική έκβαση εγκυμοσύνης, μεγάλης ηλικίας και τεσσάρων γυναικών που έλαβαν Gonal F, με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης, μεγάλης ηλικίας, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

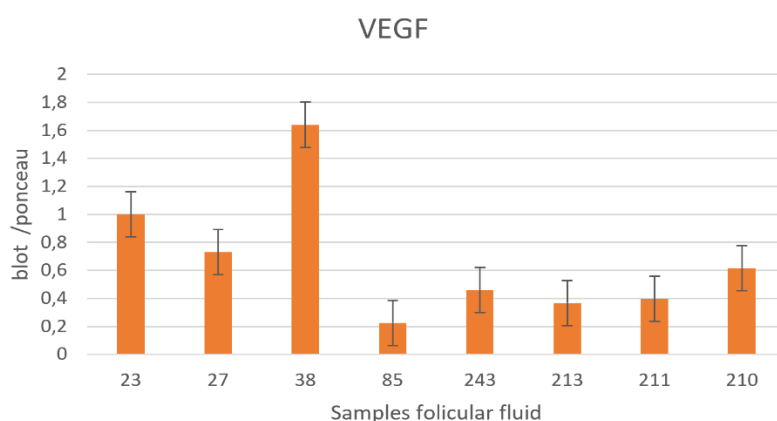
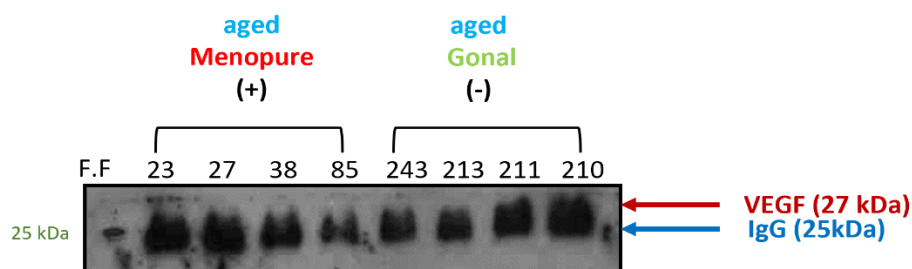
Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Εκβαση εγκυμοσύνης
23	Menopure	40	-	Θετική (+)
27	Menopure	40	-	Θετική (+)
38	Menopure	38	-	Θετική (+)
85	Menopure	39	-	Θετική (+)
243	Gonal F	37	-	Αρνητική (-)
213	Gonal F	38	-	Αρνητική (-)
211	Gonal F	42	-	Αρνητική (-)
210	Gonal F	43	-	Αρνητική (-)

Πίνακας 9 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF σε γυναίκες μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης.

Πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών του ορού των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού, με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με ειδικό αντίσωμα για τον παράγοντα VEGF. Καθώς το αντίσωμα αναγνωρίζει και την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG, λαμβάνονται δύο ζώνες κατά την εμφάνιση. Αυτή που εμφανίζεται στα 27 kDa είναι αυτή που μας ενδιαφέρει και αντιστοιχεί στον παράγοντα VEGF οπότε η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση αυτή την ζώνη. Επίσης, καθώς στα ωοθυλακικά υγρά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της ακτίνης, η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών όπως αυτή αποτυπώνεται κατά την χρώση με διάλυμα Ponceau S.

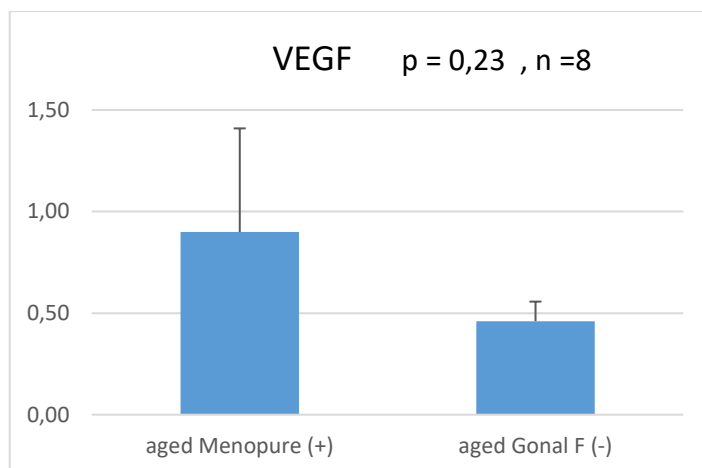


Εικόνα 28: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και προσθήκη αντισώματος για τον VEGF (1:1000) στην εναπομείνουσα μεμβράνη .



Εικόνα 29: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης, με χρήση του προγράμματος image j .

Όπως παρατηρούμε, στο παρακάτω διάγραμμα, υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά και υψηλότερα επίπεδα VEGF εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, με θετική έκβασή εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Φαίνεται, ότι το πρωτόκολλο διέγερσης των ωοθηκών που λαμβάνουν οι γυναίκες επηρεάζει τα επίπεδα του παράγοντα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό και κατ' επέκτασιν το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης. Τα υψηλότερα επίπεδα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό ενδεχομένως αποτελούν έναν δείκτη καλύτερης κυκλοφορίας του αίματος και υψηλότερου βαθμού αγγείωσης των ωοθυλακίων και έτσι τα ωάρια που αποκτώνται από αυτά τα ωοθυλάκια είναι και πιο ικανά να γονιμοποιηθούν. Για το λόγο αυτό, οι γυναίκες που έλαβαν Menopure και εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα VEGF στο υγρό, έχουν και θετική έκβαση εγκυμοσύνης.



Εικόνα 30: Υψηλότερα επίπεδα VEGF τείνουν να εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες που έλαβαν Gonal F με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης .

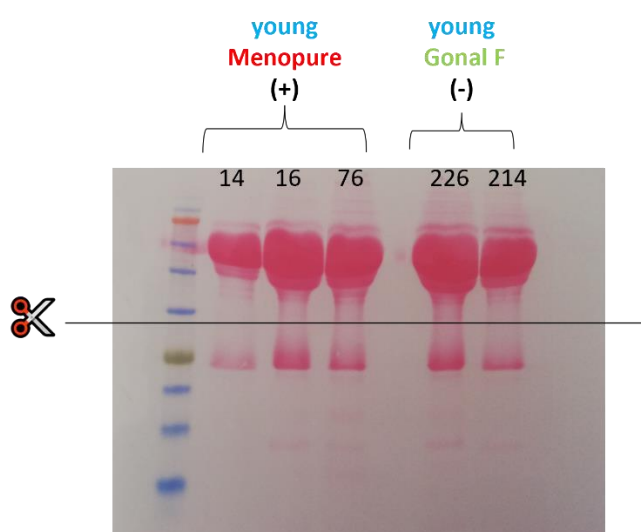
Γ.1.6.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ VEGF ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα VEGF μεταξύ τριών γυναικών μικρής ηλικίας που έλαβαν Menopure με θετική έκβαση εγκυμοσύνης και δύο γυναικών μικρής ηλικίας που έλαβαν Gonal F με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης . Τα δείγματα ωοθυλακικού υγρού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα .

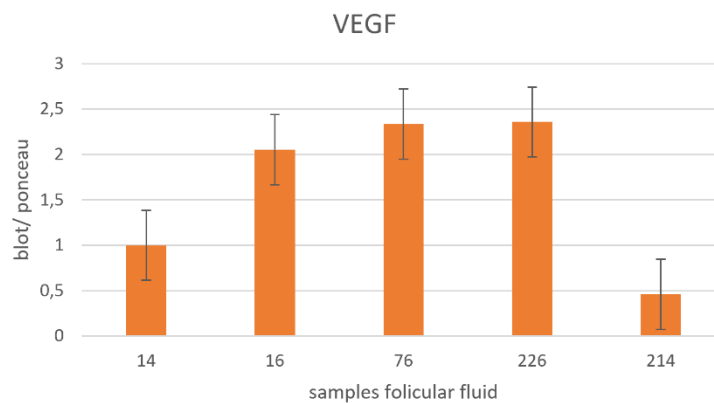
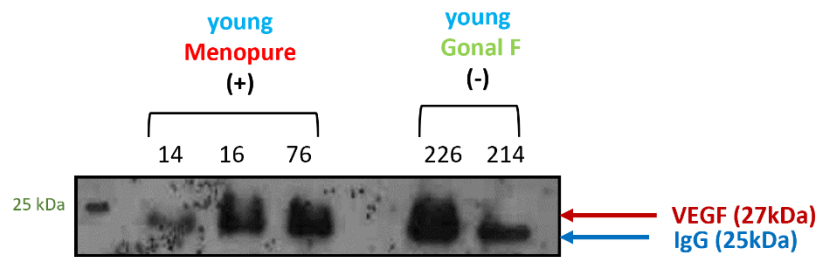
Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Εκβαση εγκυμοσύνης
14	Menopure	35	-	Θετική (+)
16	Menopure	29	-	Θετική (+)
76	Menopure	29	-	Θετική (+)
226	Gonal F	30	-	Αρνητική (-)
214	Gonal F	34	-	Αρνητική (-)

Πίνακας 10 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF σε γυναίκες μικρής ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης.

Όπως και παραπάνω με την ίδια μεθοδολογία, πραγματοποιήθηκε χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με ειδικό αντίσωμα για τον παράγοντα VEGF. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ζώνη που εμφανίζεται στα 27 kDa και όχι αυτή που εμφανίζεται στα 25 kDa και αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG.

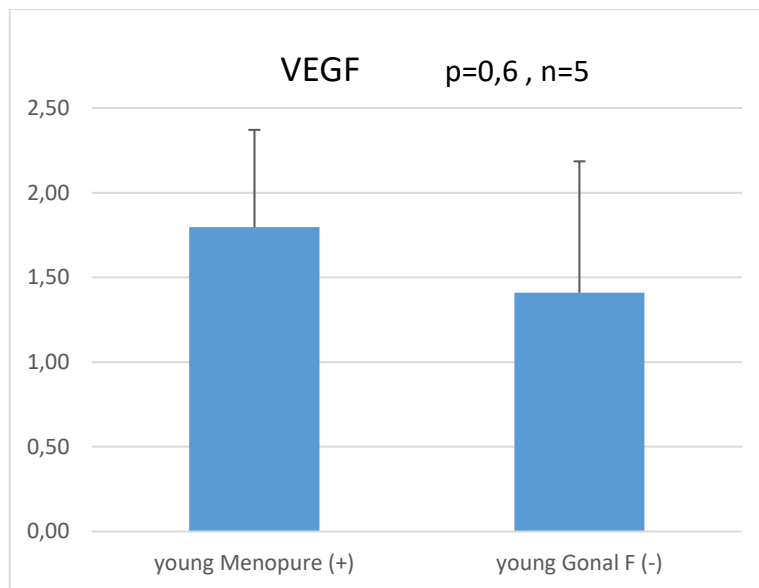


Εικόνα 31: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μικρής ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και προσθήκη αντισώματος για τον VEGF (1: 1000) στην εναπομείνουσα μεμβράνη .



Εικόνα 32: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων του παράγοντα VEGF σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μικρής ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης, με χρήση του προγράμματος image j .

Όπως παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα, το φαινόμενο διαφοράς στα επίπεδα του VEGF δεν παρατηρήθηκε τόσο έντονα στις γυναίκες μικρής ηλικίας. Υπάρχει μία ελαφριά τάση να εμφανίζονται υψηλότερα επίπεδα VEGF στις γυναίκες μικρής ηλικίας που έλαβαν Menopure με θετική έκβαση εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες που έλαβαν Gonal F με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Μπορεί να επαληθευτεί η υπόθεση ότι τα επίπεδα VEGF σχετίζονται με την φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν οι γυναίκες και την έκβαση της εγκυμοσύνης, ωστόσο η διαφορά στα επίπεδα VEGF είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας και έτσι απαιτείται έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων γυναικών για να φτάσουμε το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.



Εικόνα 33: Υψηλότερα επίπεδα VEGF τείνουν εμφανίζονται στις γυναίκες μικρής ηλικίας που έλαβαν Menopure με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες που έλαβαν Gonal F με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης.

Γ.1.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Γ.1.7.1 ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ FSH-R ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ .

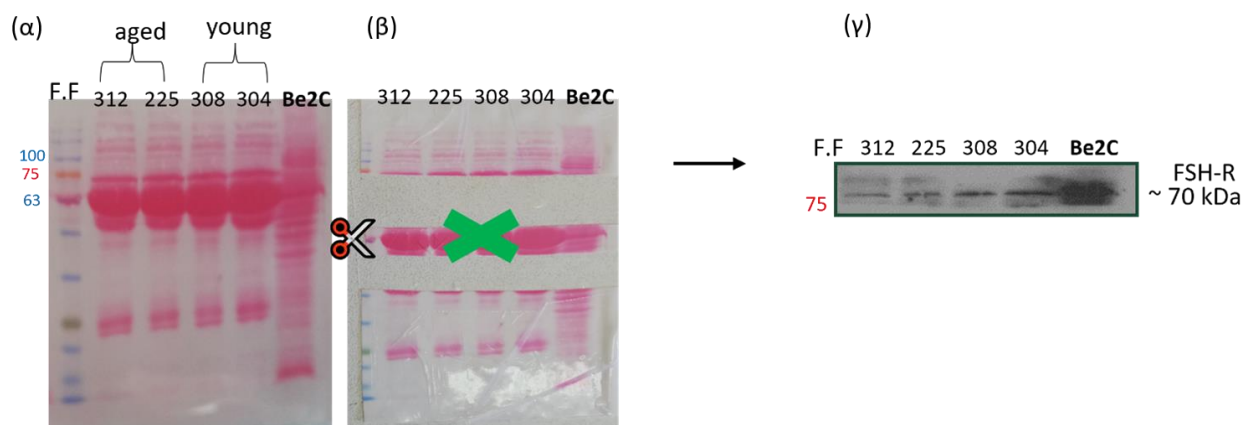
Ο υποδοχέας της FSH είναι μεμβρανικός και βρίσκεται στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων από όταν ξεκινάει να δημιουργείται το άντρο. Επομένως είναι ένας δείκτης της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται το ωοθυλάκιο.¹⁰⁶ Κάθε κοκκώδες κύτταρο έχει κατά μέσο όρο 1500 υποδοχείς FSH, στο δευτερογενές στάδιο της ωοθυλακικής ανάπτυξης και ο αριθμός τους παραμένει σταθερός κατά την διάρκεια της υπόλοιπης ανάπτυξης.¹⁰⁷ Εφόσον λοιπόν, ο υποδοχέας αυτός είναι μεμβρανικός είναι δυνατόν να απελευθερώνεται στο ωοθυλακικό υγρό, όταν ενεργοποιείται το αποπτωτικό μονοπάτι και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Αρα, θα μπορούσε να είναι δυνατή η ανίχνευσή του στο ωοθυλακικό υγρό.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και δύο γυναικών μικρής ηλικίας οι οποίες επίσης, έλαβαν Gonal F για την ανίχνευση του υποδοχέα FSH-R όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα Be2c, ως αρνητικός μάρτυρας για την ανίχνευση του FSH-R, καθώς μέσω δεδομένων RT-PCR γνωρίζουμε ότι ο υποδοχέας αυτός δεν εκφράζεται στα κύτταρα αυτά.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
312	Gonal F	43	-
225	Gonal F	38	-
308	Gonal F	32	-
304	Gonal F	26	-

Πίνακας 11 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του υποδοχέα FSH-R

Ακολούθησε χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S και απομακρύνθηκε η περιοχή της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες. Η εναπομείνασα μεμβράνη, επώαστηκε με ειδικό αντίσωμα για τον υποδοχέα FSH-R. Η απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες ήταν απαραίτητη, καθώς το αντίσωμα για τον υποδοχέα FSH-R αναγνωρίζει και αυτές τις πρωτεΐνες, οπότε το σήμα θα καλύπτονταν από τις πρωτεΐνες του ορού δεδομένου ότι οι αλβουμίνες εμφανίζονται στα 65 -70 kDa και ο υποδοχέας FSH-R εμφανίζεται περίπου στα 70 kDa. Το αποτέλεσμα απομάκρυνσης της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και το σήμα που λάβαμε για τον FSH-R στα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού που ελέγχθηκαν φαίνεται παρακάτω. Λάβαμε κάποιες ζώνες που εμφανίστηκαν στο ίδιο ύψος με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων Be2c και δεν αντιστοιχούσαν στον υποδοχέα FSH-R.



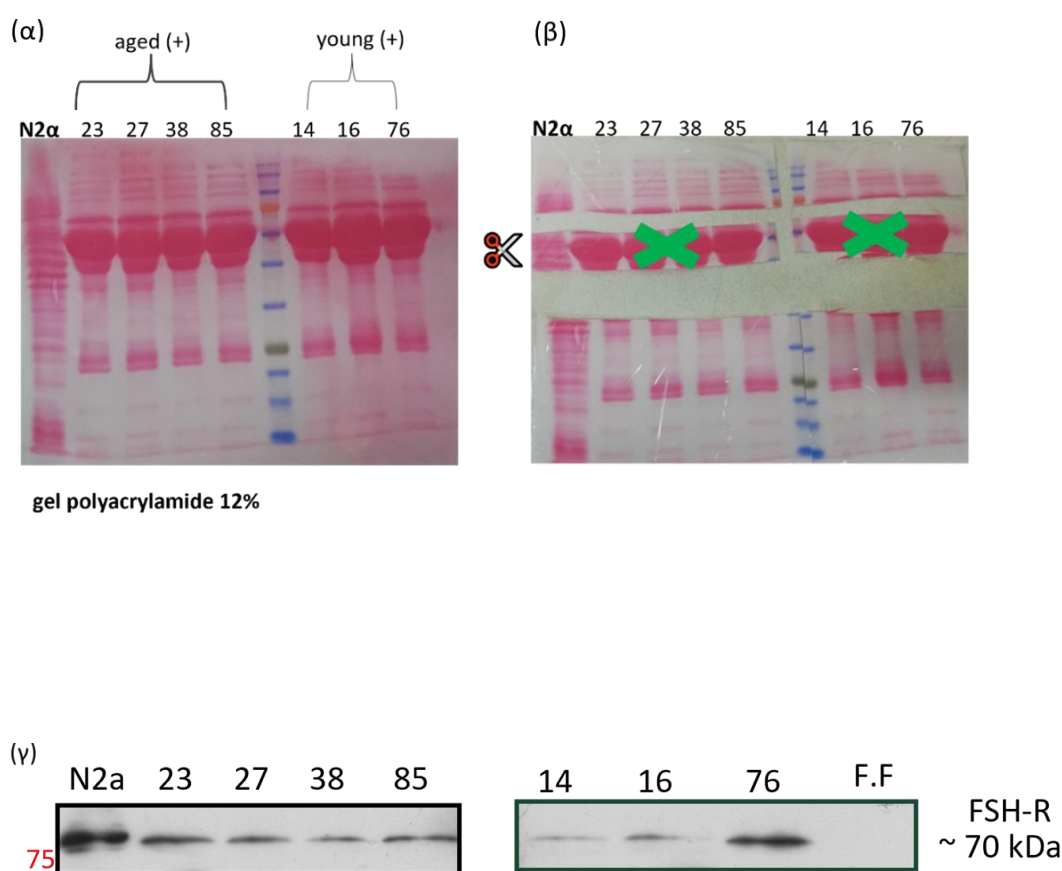
Εικόνα 34: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, (β) κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες (65-70 kDa), προσθήκη αντισώματος FSH- R (1: 1000) στην εναπομείνασα μεμβράνη, (γ) εμφάνιση ζωνών με αρνητικό μάρτυρα κυτταρικά εκχυλίσματα Be2c (30 μg) και εντοπισμός σήματος στο ίδιο μοριακό βάρος με τον αρνητικό μάρτυρα Be2c.

Προκειμένου, να επιβεβαιωθεί ότι το παραπάνω αποτέλεσμα είναι αξιόπιστο και ότι οι ζώνες δεν αντιστοιχούσαν στον υποδοχέα της FSH, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση περισσότερων δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τέσσερα δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και τρία δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μικρής ηλικίας που έλαβαν επίσης Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης. Αυτή τη φορά, χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2a, νευροβλαστώματος ποντικού ως αρνητικός μάρτυρας.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Έκβαση εγκυμοσύνης
23	Menopure	40	-	Θετική (+)
27	Menopure	40	-	Θετική (+)
38	Menopure	38	-	Θετική (+)
85	Menopure	39	-	Θετική (+)
14	Menopure	35	-	Θετική (+)
16	Menopure	29	-	Θετική (+)
76	Menopure	29	-	Θετική (+)

Πίνακας 12 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του υποδοχέα FSH-R .

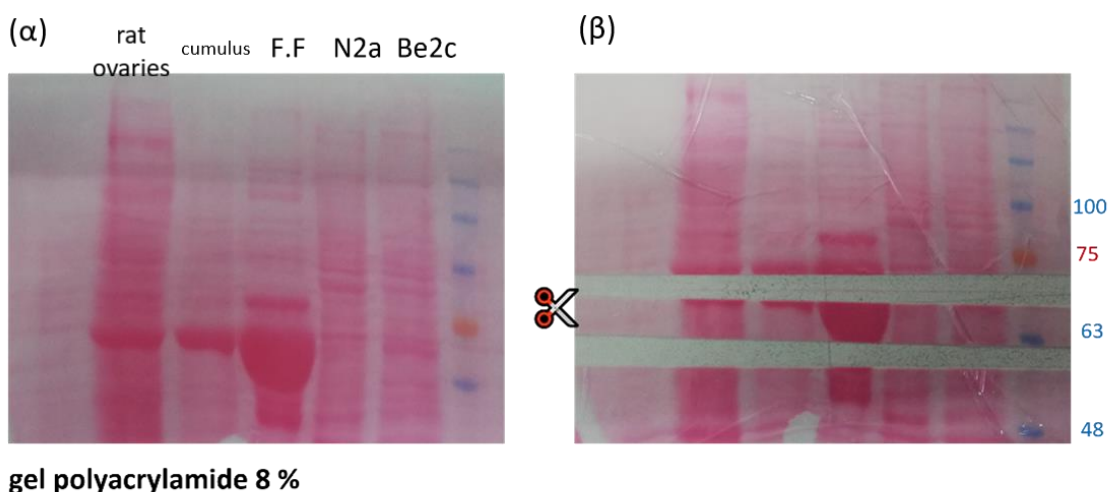
Όπως και στην παραπάνω περίπτωση, ύστερα από επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα για τον FSH-R, ελήφθησαν ζώνες οι οποίες εμφανίστηκαν και αυτές στο ίδιο ύψος με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα N2a, οι οποίες δεν αντιστοιχούσαν στον υποδοχέα FSH-R. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση του υποδοχέα FSH-R στα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού ήταν η ίδια με παραπάνω, καθώς πραγματοποιήθηκε αποκοπή της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των αλβουμινών και επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με το αντίσωμα για τον FSH-R .

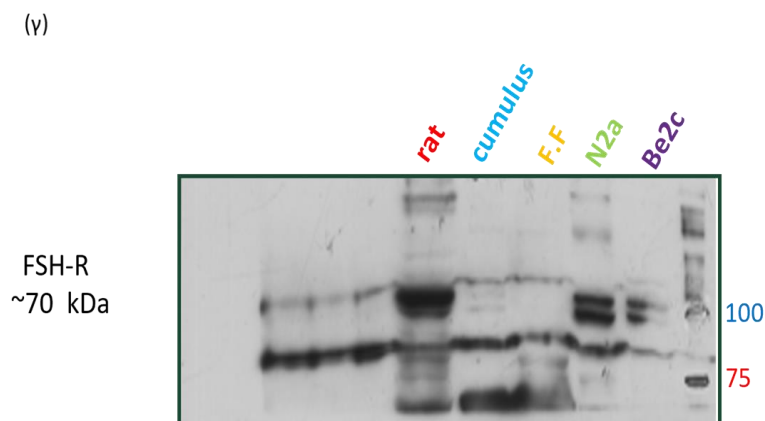


Εικόνα 35: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S , (β) κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες (65-70 kDa), προσθήκη αντισώματος FSH- R (1: 1000) στην εναπομείνουσα μεμβράνη, (γ) εμφάνιση ζωνών με αρνητικό μάρτυρα κυτταρικά εκχυλίσματα N2a (30 μg) και εντοπισμός σήματος στο ίδιο μοριακό βάρος με τον αρνητικό μάρτυρα N2a.

Σε συνέχεια της προσπάθειας ανίχνευσης του πραγματικού σήματος για τον υποδοχέα της FSH πραγματοποιήθηκε, ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, ενός δείγματος από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κοκκωδών κυττάρων (cumulus) γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, ενός δείγματος από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κοκκώδη κύτταρα ωθήκης αρουραίου (rat) και δύο δειγμάτων από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων N2a και Be2c σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 8 %. Η συγκεκριμένη περιεκτικότητα της πηκτής SDS - πολυακρυλαμίδιου, επέτρεπε τον καλύτερο διαχωρισμό των ζωνών στις περιοχές των μοριακών βαρών 70 – 75 kDa όπου εμφανίζονται και οι ζώνες για τον FSH-R. Επίσης, γνωρίζοντας ότι ο παράγοντας FSH-R εμφανίζονταν ως ζώνη σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κοκκώδη κύτταρα (cumulus) γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και κοκκώδη κύτταρα ωθήκης αρουραίου (rat), αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας για την ανίχνευση του FSH-R με την μέθοδο Western Blot.

Μετά την χρώση της μεμβράνης με διάλυμα Ponceau S, την απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και την εμφάνιση των ζωνών, ελήφθησαν δύο ζώνες κάτω από τα 75 kDa. Η μία ζώνη αντιστοιχούσε στον μεμβρανικό παράγοντα FSH-R, των κοκκωδών κυττάρων (cumulus) από ωοθυλάκια γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και η άλλη στον μεμβρανικό παράγοντα FSH-R των κοκκωδών κυττάρων ωθήκης αρουραίου (rat). Στο ίδιο υψος με τις ζώνες αυτές, δηλαδή κάτω από τα 75 kDa εμφανίστηκε και μία ζώνη που ενδεχομένως αντιστοιχεί στο μεμβρανικό παράγοντα FSH-R στο δείγμα ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Συνεπώς, οι ζώνες που ελήφθησαν για τα κυτταρικά εκχυλίσματα Be2c και N2a στα 100 kDa, πράγματι δεν αντιστοιχούσαν στον μεμβρανικό παράγοντα FSH-R και το αντίσωμα προσδέθηκε μη ειδικά.





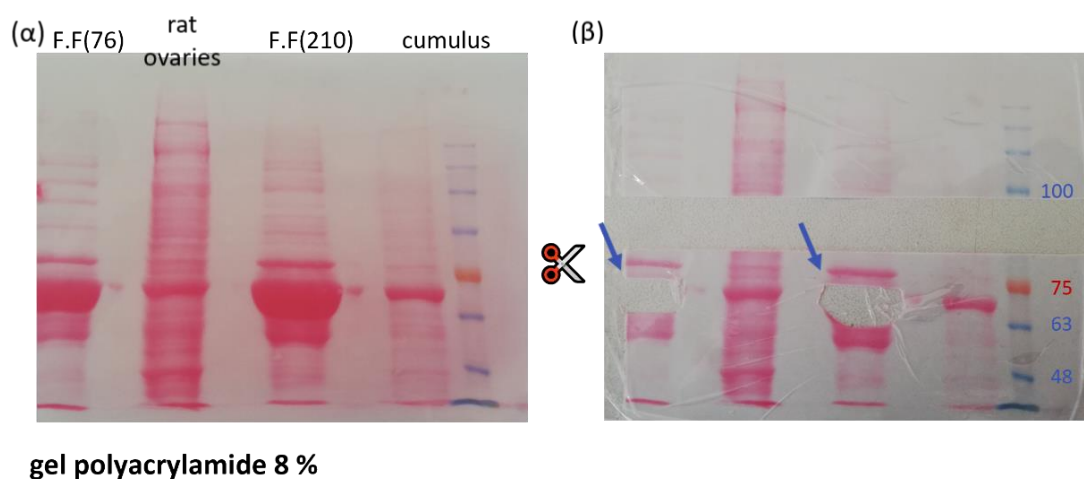
Εικόνα 36: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, (β) κόψιμο κατά μήκος της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες (65-70 kDa), προσθήκη αντισώματος FSH- R (1: 1000) στην εναπομείνασα μεμβράνη, (γ) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κοκκώδη κύτταρα (cumulus) ωοθυλακίων γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και από κοκκώδη κύτταρα ωοθήκης αρουραίου (rat) καθώς και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2a και Be2c και εντοπισμός του FSH-R στα κύτταρα ωοθήκης rat, cumulus και ενδεχομένως και στο ωοθυλακικό υγρό.

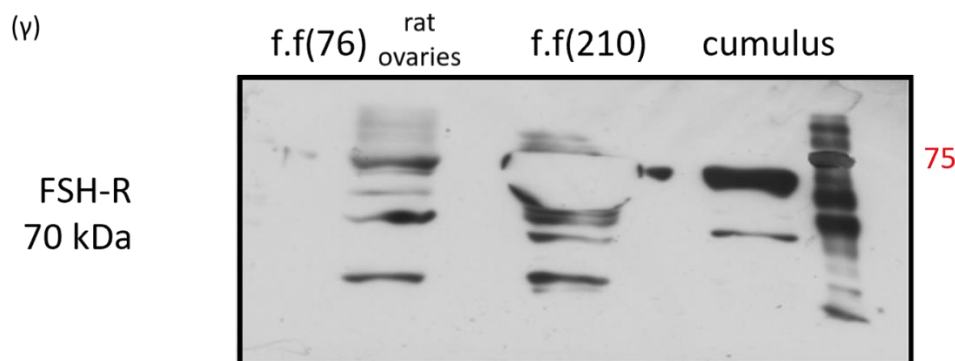
Εφόσον καθιερώθηκε ο θετικός μάρτυρας για την εύρεση του μεμβρανικού παράγοντα FSH-R στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, ελέγχθηκαν δύο δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 8 %. Το ένα δείγμα ωοθυλακικού υγρού προέρχονταν από ωοθυλάκια μίας νεαρής γυναίκας, ηλικίας 29 ετών, που έλαβε Menopure και είχε θετική έκβαση εγκυμοσύνης, ενώ το άλλο δείγμα προέρχονταν από ωοθυλάκια μιας γυναίκας μεγάλης ηλικίας, 43 ετών, που έλαβε Gonal F και είχε αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Έκβαση εγκυμοσύνης
76	Menopure	29	-	Θετική (+)
210	Gonal F	43	-	Αρνητική (-)

Πίνακας 13 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του υποδοχέα FSH-R στο ωοθυλακικό υγρό .

Ύστερα από την καθιερωμένη διαδικασία χρώσης της μεμβράνης με διάλυμα Ponceau S, απομακρύνθηκε η περιοχή της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες, ακριβώς στην περιοχή που εμφανίζονται οι αλβουμίνες όπως αποτυπώνεται πάνω στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η χρώση της μεμβράνης και η χρήση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 8 %, επέτρεψε την απομάκρυνση μόνο της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες του ορού (65-70 kDa). Μετά από επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με το αντίσωμα για τον παράγοντα FSH-R, εμφανίστηκαν δύο ζώνες που αντιστοιχούσαν στον παράγοντα αυτόν για τα κοκκώδη κύτταρα από ωοθυλάκια γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και για τα κοκκώδη κύτταρα αρουραίου (θετικοί μάρτυρες). Ωστόσο στο ίδιο ύψος με τις ζώνες αυτές, δεν παρατηρήθηκε ζώνη που να αντιστοιχεί στον παράγοντα FSH-R στα ωοθυλακικά υγρά. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει ότι απομακρύνθηκε μετά την αποκοπή της περιοχής της μεμβράνης (65-70 kDa) που αντιστοιχούσε στις αλβουμίνες αφού θα έπρεπε να εμφανίζεται στο ίδιο ύψος με τις ζώνες που αντιστοιχούσαν στον FSH-R για τα κοκκώδη κύτταρα (cumulus) από ωοθυλάκια γυναίκας και για τα κοκκώδη κύτταρα ωοθήκης αρουραίου (rat) . Επομένως, για την ανίχνευση του μεμβρανικού παράγοντα FSH-R σε ωοθυλακικό υγρό με την μεθοδο Western blot, απαραίτητη προϋπόθεση, αποτελεί η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που πλάσματος και συγκεκριμένα των αλβουμινών.





Εικόνα 37: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, (β) κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί μόνο στις αλβουμίνες (65-70 kDa) των ωοθυλακικών υγρών (μπλε βελάκια), προσθήκη αντισώματος FSH-R (1: 1000) στην εναπομείνουσα μεμβράνη, (γ) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κοκκώδη κύτταρα ωοθυλακίων γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και από κοκκώδη κύτταρα αρουραίου, και εντοπισμός του FSH-R, περίπου στα 70 kDa, μόνο στα κοκκώδη κύτταρα αρουραίου και στα κοκκώδη κύτταρα γυναίκας που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Γ.1.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΡΟΛΟ “ΚΛΕΙΔΙ” ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Γ.1.8.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ BAX ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ.

Υπάρχουν δύο αποπτωτικά μονοπάτια στα κοκκώδη κύτταρα και στα ωοκύτταρα των ωοθυλακίων, τα οποία διακρίνονται στο ενδογενές μονοπάτι και το εξωγενές μονοπάτι. Το ενδογενές μονοπάτι περιλαμβάνει τον προαποπτωτικό παράγοντα bax, ο οποίος δρα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οπές, και έτσι να απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών που κατακερματίζουν το DNA. Η πρωτεΐνη Bax μπορεί να αυτο διμεριστεί με το ίδιο το μόριο (ομοδιμερές) ή με την Bcl-2 (ετεροδιμερές) και όταν υπερπαράγεται, τα ομοδιμερή της προάγουν την απόπτωση.^{108,109}

Κατά την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων, διαρρηγνύεται η μεμβράνη τους οπότε κάποιοι παράγοντες και κάποια μόρια των κυττάρων απελευθερώνονται στο

εξωτερικό περιβάλλον. Εφόσον λοιπόν, το εξωτερικό περιβάλλον των κοκκωδών κυττάρων είναι το ωοθυλακικό υγρό, θα μπορούσε να είναι δυνατή η εύρεση της πρωτεΐνης Βαχ στο ωοθυλακικό υγρό από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή ως ένας δείκτης του βαθμού απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων. Στο εσωτερικό του κυττάρου η πρωτεΐνη Βαχ έχει προαποπτωτική δράση και ο εντοπισμός της στο ωοθυλακικό υγρό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων.

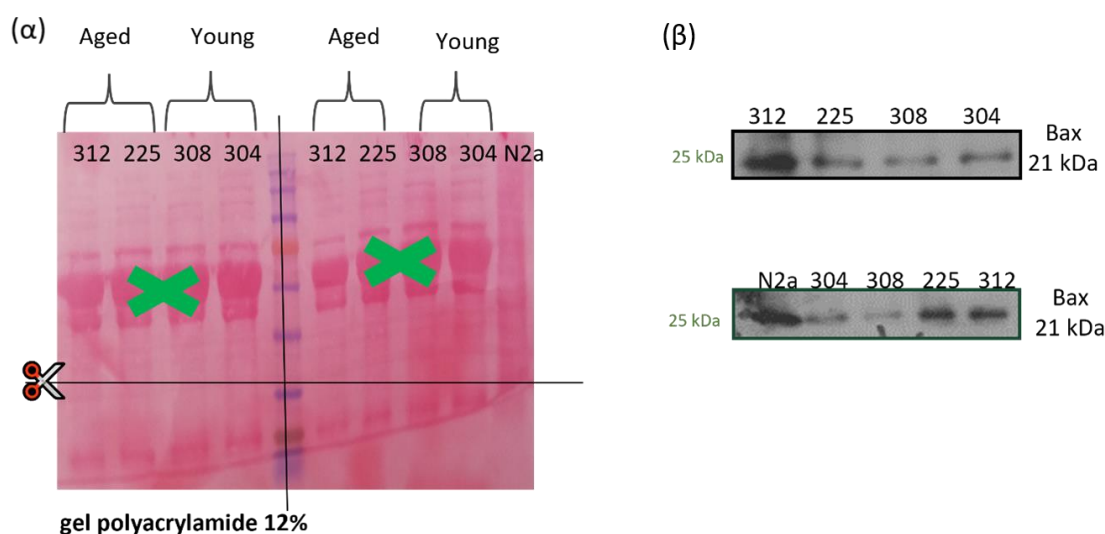
Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και δύο γυναικών μικρής ηλικίας οι οποίες επίσης, έλαβαν Gonal F για τον έλεγχο ύπαρξης της πρωτεΐνης Βαχ στο ωοθυλακικό υγρό όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a που θα χρησίμευε ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο ύπαρξης της πρωτεΐνης Βαχ στο ωοθυλακικό υγρό .

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
312	Gonal F	43	-
225	Gonal F	38	-
308	Gonal F	32	-
304	Gonal F	26	-

Πίνακας 14: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης της Βαχ στο ωοθυλακικό υγρό .

Έπειτα από χρώση της μεμβράνης με διάλυμα ponceau S και κόψιμο της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες, η μεμβράνη επωάστηκε με αντίσωμα για την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Βαχ. Εμφανίστηκαν κάποιες ζώνες στα 25 kDa, οι οποίες δεν αντιστοιχούσαν στην πρωτεΐνη Βαχ, καθώς αυτή η πρωτεΐνη εμφανίζεται στα 21 kDa. Αυτές οι ζώνες λοιπόν, ενδεχομένως αντιστοιχούσαν στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG. Επομένως και σε αυτή την περίπτωση το

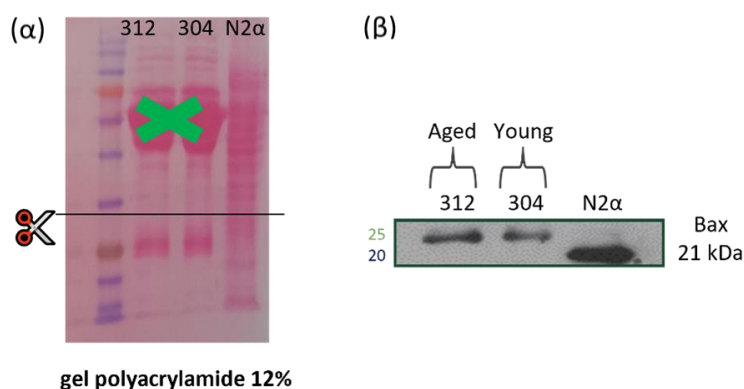
ειδικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες του ορού. Επίσης, στο ίδιο ύψος με τα δείγματα ωοθυλακικού υγρού εμφανίστηκε και η ζώνη που αντιστοιχεί στα κυτταρικά εκχυλίσματα N2a. Η ζώνη αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο ύπαρξης της Bax στο ωοθυλακικό υγρό καθώς δεν πραγματοποιήθηκε σωστή ηλεκτροφόρηση του δείγματος του κυτταρικού εκχυλίσματος. Τέλος, η διαφορά που παρατηρήθηκε στην ένταση των ζωνών μεταξύ των δειγμάτων 312 και 304, μας οδήγησε να πραγματοποιήσουμε μία επιπλέον σύγκριση μεταξύ αυτών των δειγμάτων για τον έλεγχο ύπαρξης της bax στα συγκεκριμένα δείγματα ωοθυλακικού υγρού.



Εικόνα 38: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S , κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη πάνω από 35 kDa στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι αλβουμίνες (65-70 kDa) των ωοθυλακικών υγρών, προσθήκη αντισώματος bax (1: 500) στην εναπομείνουσα μεμβράνη , **(β)** εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a (30 μg) και εντοπισμός λανθασμένα ανιχνεύσιμου σήματος στα 25 kDa .

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 312 και 304 του ωοθυλακικού υγρού σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %, τα οποία όπως είδαμε παραπάνω εμφάνιζαν διαφορά στην ένταση των ζωνών τους. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2a ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο ύπαρξης της πρωτεΐνης Bax . Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χρώσης και αποκοπής της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης όπως παραπάνω και μετά από επώαση της μεμβράνης με το ειδικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη bax εμφανίστηκαν δύο ζώνες στα 25 kDa για τα δείγματα των ωοθυλακικών υγρών που ενδεχομένως αντιστοιχούσαν στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG και μία ζώνη στα 21

kDa για τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2a που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Bax. Δυστυχώς, δεν ελήφθησαν ζώνες στα 21 kDa για τα δείγματα ωοθυλακικών υγρών όπως για τα κύτταρα N2a και επομένως δεν ήταν δυνατή η εύρεση της πρωτεΐνης bax στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.



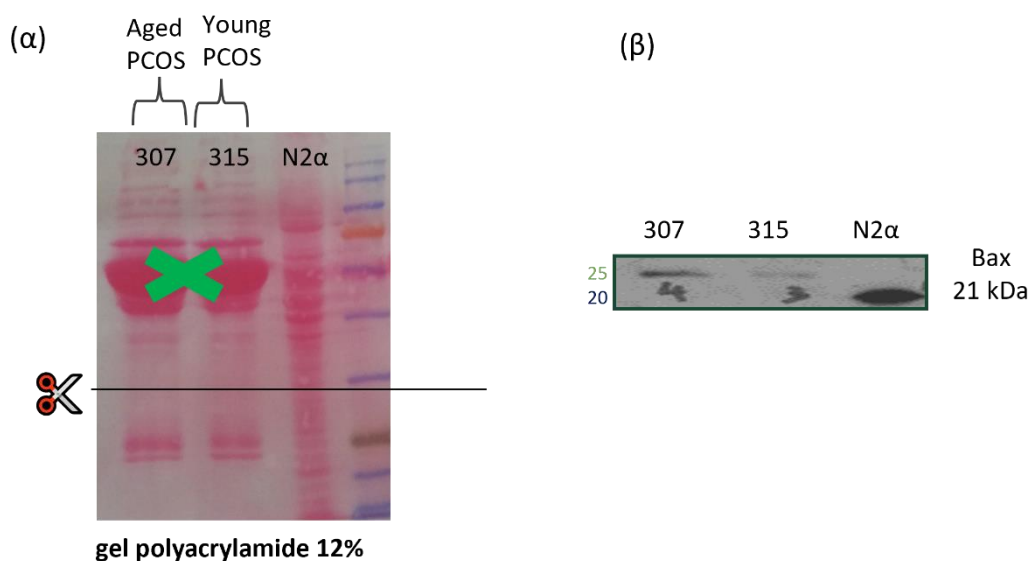
Εικόνα 38: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη από 35 kDa και πάνω στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι αλβουμίνες (65-70 kDa) των ωοθυλακικών υγρών, προσθήκη αντισώματος bax (1:500) στην εναπομείνουσα μεμβράνη, (β) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a (30 µg) και εντοπισμός της bax στα 21 kDa μόνο για τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2a.

Αντίστοιχα, το ίδιο παρατηρήθηκε και για δύο άλλα δείγματα ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2a. Τα δείγματα ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από μία γυναίκα μεγάλης και μια γυναίκα μικρής ηλικίας με πολυκυστικές ωοθήκες που είχαν λάβει Gonal F για την διέγερση των ωοθηκών τους, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
307	Gonal F	38	PCOS
315	Gonal F	28	PCOS

Πίνακας 15: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξής της Bax στο ωοθυλακικό υγρό .

Οι ζώνες που ελήφθησαν για τα ωοθυλακικά υγρά εμφανίστηκαν στα 25 kDa, και όχι στα 21 kDa όπου εμφανίστηκε η ζώνη για τα N2α (θετικός μάρτυρας). Επομένως το αντίσωμα αναγνώρισε την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG των ωοθυλακικών υγρών .



Εικόνα 39: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη από 35 kDa και πάνω στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι αλβουμίνες (65-70 kDa) των ωοθυλακικών υγρών, προσθήκη αντισώματος Bax (1: 500) στην εναπομείνασα μεμβράνη, (β) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a (30 μg) και εντοπισμός της bax στα 21 kDa μόνο για τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2a, όπως και στην εικόνα 38, χρησιμοποιώντας διαφορετικά δείγματα ωοθυλακικών υγρών.

Γ.1.8.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ BCL2 ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ .

Η πρωτεΐνη Bcl-2 εμπλέκεται στο ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Αναστέλλει την απόπτωση διατηρώντας την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης καθώς το υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο της συνδέεται στην εξωτερική μεμβράνη. Η Bcl-2 εμποδίζοντας τον ολιγομερισμό των Bax/Bak, καταστέλλει την απελευθέρωση διαφόρων αποπτωτικών μορίων από το μιτοχόνδριο. Αλληλεπιδρώντας με την Bax και άλλες προαποπτωτικές πρωτεΐνες μέσω των BH3

περιοχών της απενεργοποιεί και καταστέλλει την απόπτωση. Ακόμη, η Bcl-2 εμποδίζοντας άμεσα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, αποτρέπει την ενεργοποίηση της Araf-1 και της κασπάσης 9.

Η πρωτεΐνη Bcl-2 δεν εντοπίζεται μόνο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλλά και στον πυρηνικό φάκελο και στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο ρυθμίζει τα αποθέματα ασβεστίου, τα ενδοκυττάρια επίπεδα του οποίου σχετίζονται με την απόπτωση.¹¹⁰ Κατά την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων, διαρρηγνύεται η μεμβράνη τους οπότε κάποιοι παράγοντες και κάποια μόρια των κυττάρων απελευθερώνονται στο εξωτερικό περιβάλλον. Εφόσον λοιπόν, το εξωτερικό περιβάλλον των κοκκωδών κυττάρων είναι το ωοθυλακικό υγρό, θα μπορούσε να είναι δυνατή η εύρεση της πρωτεΐνης Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό από ωοθυλάκια γυναικών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή ως ένας δείκτης που βαθμού απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων.¹¹⁰

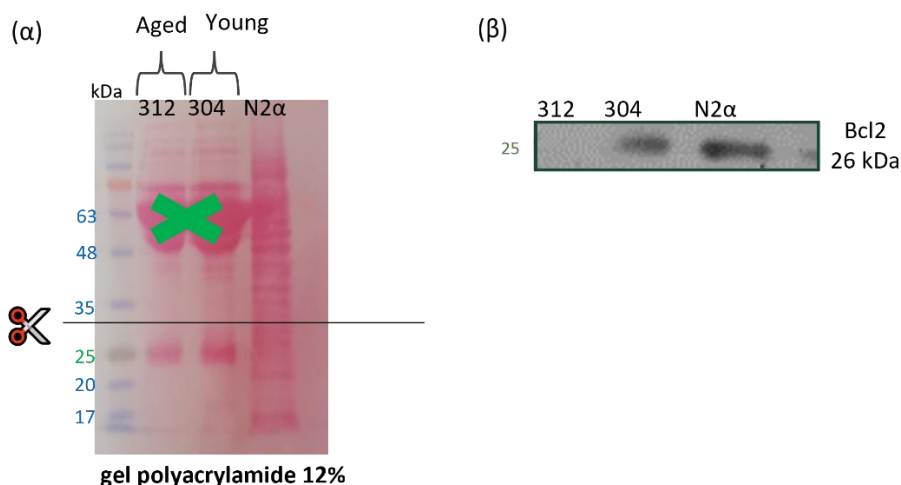
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού γυναίκας μικρής ηλικίας που έλαβε Gonad F και ενός δείγματος ωοθυλακικού υγρού γυναίκας μεγάλης ηλικίας που έλαβε επίσης Gonad F για τον έλεγχο ύπαρξης της πρωτεΐνης Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %. Επίσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a που θα χρησίμευε ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο ύπαρξης της πρωτεΐνης Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση
312	Gonad F	43	-
304	Gonad F	26	-

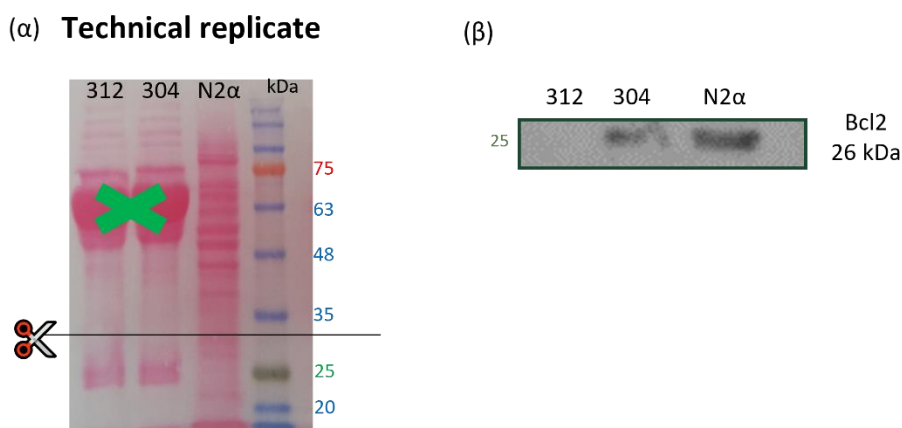
Πίνακας 16: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης της Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό.

Έπειτα από χρώση της μεμβράνης με διάλυμα ponceau S και κόψιμο της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες, η μεμβράνη επώαστηκε με ειδικό αντίσωμα για την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε και δεύτερη φορά με τα ίδια δείγματα ωοθυλακικού υγρού για επαλήθευση του αποτελέσματος. Και στα δύο πειράματα, ελήφθησαν τα ίδια

αποτελέσματα, δηλαδή η μικρή σε ηλικία γυναίκα που έλαβε Gonal F εμφάνισε Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό ενώ η μεγάλη σε ηλικία γυναίκα που έλαβε επίσης Gonal F δεν εμφάνισε καθόλου Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό. Οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στα δείγματα ωοθυλακικών υγρών ελήφθησαν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, στα 26 kDa, στο ίδιο ύψος με τα κυτταρικά εκχυλίσματα N2α.

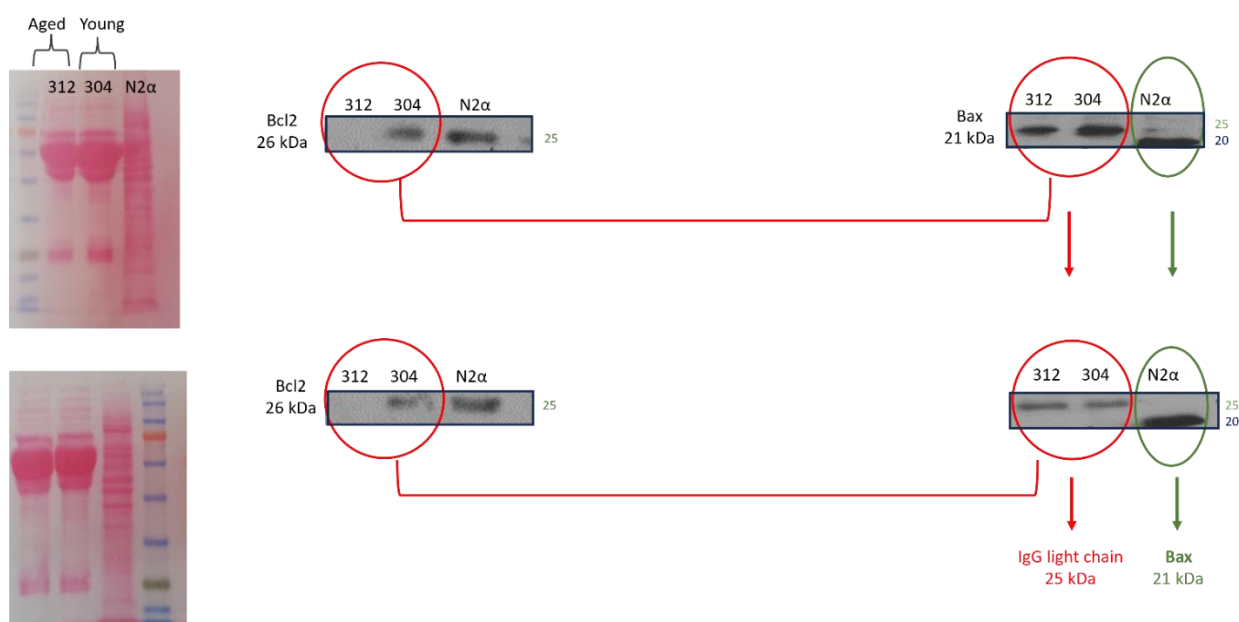


Εικόνα 40: (α) Χρώση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη από 35 kDa και πάνω στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι αλβουμίνες (65-70 kDa) των ωοθυλακικών υγρών, προσθήκη αντισώματος Bcl-2 (1: 200) στην εναπομείνασα μεμβράνη, (β) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a (30 μg) και εντοπισμός της Bcl2 στα 26 kDa, στο ένα από τα δύο δείγματα ωοθυλακικού υγρού.



Εικόνα 41: (α) επανάληψη του παραπάνω πειράματος με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και παραπάνω, χρησιμοποιώντας τα ίδια δείγματα ωοθυλακικού υγρού, (β) εμφάνιση ζωνών με θετικό μάρτυρα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2a (30 μg) και εντοπισμός της Bcl2 στα 26 kDa, στο ένα από τα δύο δείγματα ωοθυλακικού υγρού όπως και παραπάνω .

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το σήμα που λήφθηκε για την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 είναι αληθινό και αξιόπιστο και δεν αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 25 kDa , πραγματοποιήθηκε επώαση των μεμβρανών που είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο ύπαρξης της Bcl-2, με αντίσωμα για την Bax. Το αντίσωμα για την Bax, εκτός από την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax αναγνωρίζει και την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG στα ωοθυλακικά υγρά, όπως είδαμε και παραπάνω. Από την σύγκριση των μεμβρανών μεταξύ τους παρατηρήθηκε ότι οι ζώνες που λήφθηκαν και αντιστοιχούσαν στην ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG μετά από επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα για την Bax , δεν ταυτίζονται με τις ζώνες που λήφθηκαν μετά από επώαση της μεμβράνης με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και επομένως το σήμα για την Bcl-2 είναι αληθινό και αξιόπιστο.



Εικόνα 42: Προσθήκη αντισώματος Bax (1: 500) στις μεμβράνες που είχαν επωαστεί με αντίσωμα Bcl-2 (1: 200), σύγκριση μεταξύ τους και επιβεβαίωση αξιοπιστίας σήματος για την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 στα δείγματα ωοθυλακικών υγρών γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .

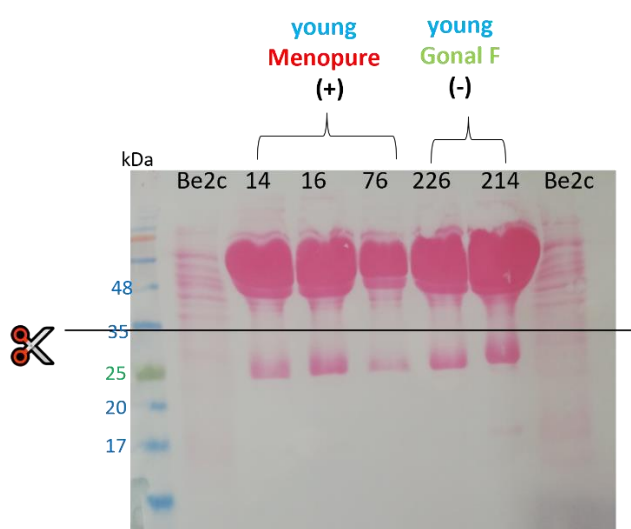
**Γ.1.8.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL2 ΣΤΟ
ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ
ΕΚΒΑΣΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ**

Αφού, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη της πρωτεΐνης Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό, και το σήμα που λήφθηκε, αποδείχθηκε αξιόπιστο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων Bcl-2 σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού. Έτσι λοιπόν, ελέγχθηκαν τα επίπεδα Bcl-2 μεταξύ τριών γυναικών που έλαβαν Menopure, με θετική έκβαση εγκυμοσύνης, μικρής ηλικίας και δύο γυναικών που έλαβαν Gonal F, με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης, μικρής ηλικίας, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε σε πηκτή SDS -πολυακρυλαμιδιου περιεκτικότητας 15 %, για μεγαλύτερη και καλύτερη διάκριση των ζωνών στα πιο χαμηλά μοριακά βάρη εφόσον η Bcl-2 ανιχνεύεται στα 26 kDa.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Έκβαση εγκυμοσύνης
14	Menopure	35	-	Θετική (+)
16	Menopure	29	-	Θετική (+)
76	Menopure	29	-	Θετική (+)
226	Gonal F	30	-	Αρνητική (-)
214	Gonal F	34	-	Αρνητική (-)

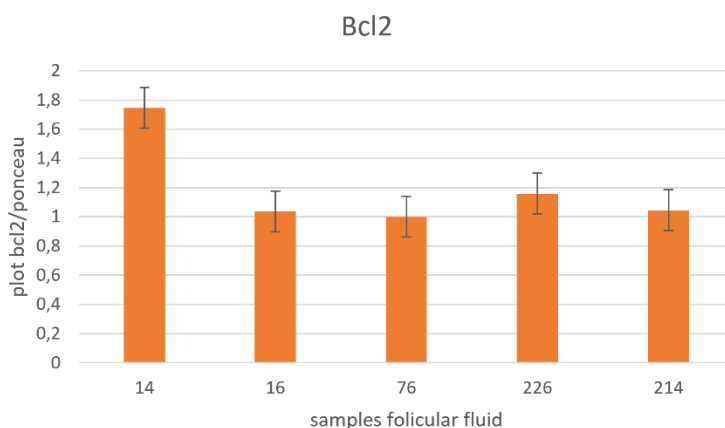
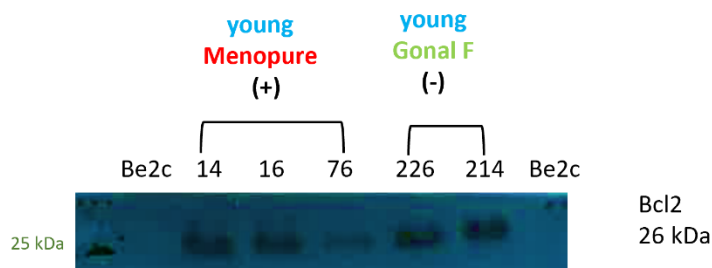
Πίνακας 17: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων της Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό, γυναικών μικρής ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης.

Πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών του ορού στα δείγματα ωοθυλακικού υγρού που χρησιμοποιήθηκαν, με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με ειδικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη Bcl-2. Επίσης, η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών όπως αυτή αποτυπώνεται κατά την χρώση με διάλυμα Ponceau S, καθώς στα ωοθυλακικά υγρά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της ακτίνης.



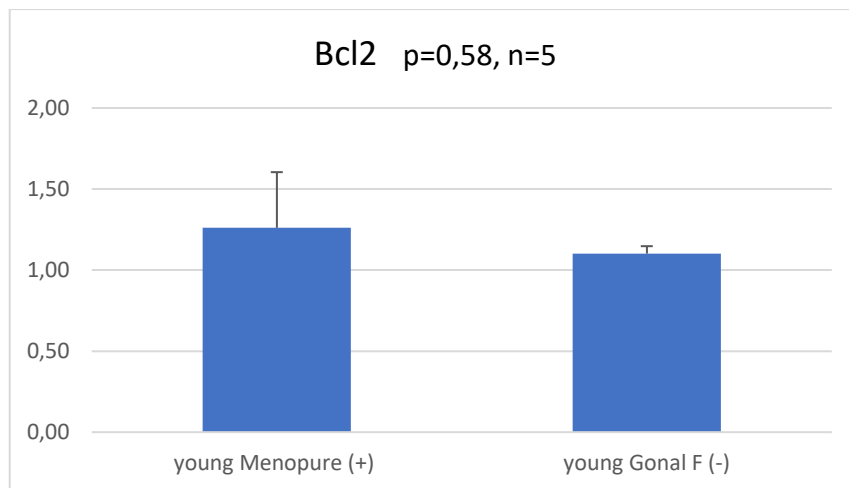
gel polyacrylamide 15%

Εικόνα 43: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μικρής ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων της Bcl-2, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες.



Εικόνα 44: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl2 σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μικρής ηλικίας και διαφορετικής έκβασης εγκυμοσύνης, με χρήση του προγράμματος image j.

Όπως παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα δεν υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα Bcl-2 μεταξύ νεαρών γυναικών που έλαβαν Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και νεαρών γυναικών που έλαβαν Gonal F με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης . Ενδεχομένως αν ελέγχονταν μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων , τότε να εμφανίζονταν και μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα Bcl-2 .



Εικόνα 45: Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στα επίπεδα Bcl2 μεταξύ νεαρών γυναικών που έλαβαν Menopure με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης και νεαρών γυναικών που έλαβαν Gonal F με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης.

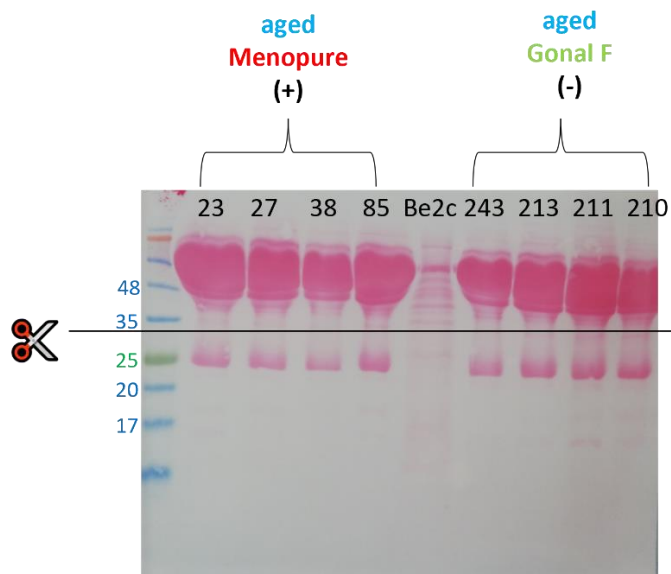
Γ.1.8.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ BCL2 ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τεσσάρων δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας οι οποίες έλαβαν Menopure και είχαν θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης και τεσσάρων δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας οι οποίες έλαβαν Gonal F με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 15 %, για τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	Έκβαση εγκυμοσύνης
23	Menopure	40	-	Θετική (+)
27	Menopure	40	-	Θετική (+)
38	Menopure	38	-	Θετική (+)
85	Menopure	39	-	Θετική (+)
243	Gonal F	37	-	Αρνητική (-)
213	Gonal F	38	-	Αρνητική (-)
211	Gonal F	42	-	Αρνητική (-)
210	Gonal F	43	-	Αρνητική (-)

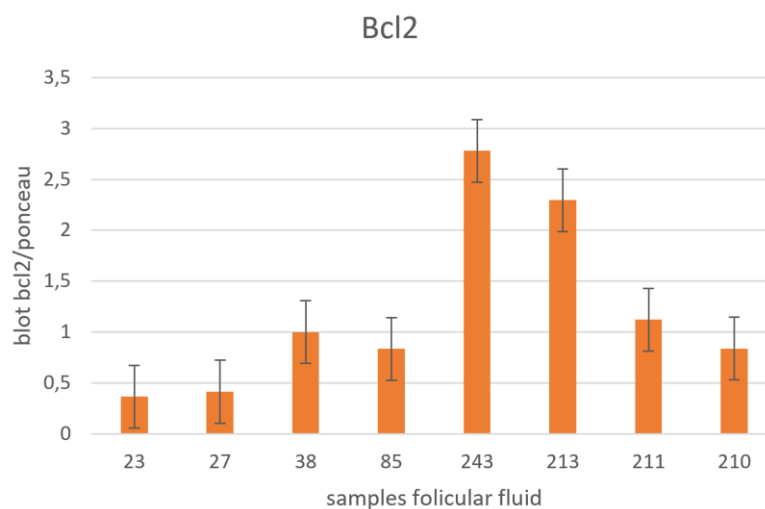
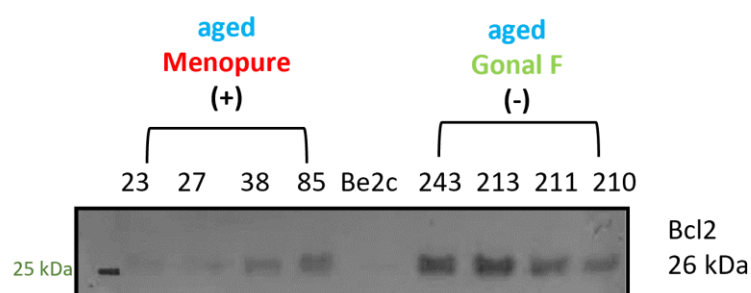
Πίνακας 18: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων της Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό, γυναικών μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης.

Πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνών του ορού των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες και επώαση της εναπομείνουσας μεμβράνης με ειδικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη Bcl-2. Επίσης, η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται, πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών όπως αυτή αποτυπώνεται κατά την χρώση με διάλυμα Ponceau S καθώς στα ωοθυλακικά υγρά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της ακτίνης.



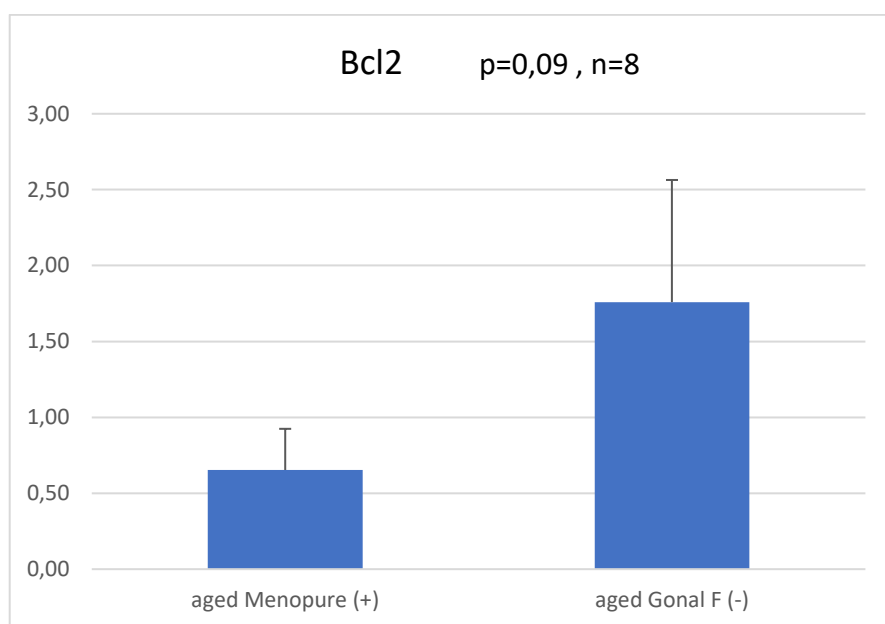
gel polyacrylamide 15%

Εικόνα 46: Χρώση των πρωτεϊνών του ορού με διάλυμα ponceau S σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων της Bcl-2, κόψιμο και απομάκρυνση της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στις αλβουμίνες.



Εικόνα 47: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl2 σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών μεγάλης ηλικίας με διαφορετική έκβαση εγκυμοσύνης, με χρήση του προγράμματος image j.

Όπως παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα, υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα Bcl-2 μεταξύ γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F με αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης εμφανίζονται χαμηλότερα επίπεδα Bcl-2, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Τα υψηλότερα επίπεδα Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης, ενδεχομένως μπορεί να σημαίνουν υψηλότερο βαθμό απόπτωσης των κυττάρων των ωοθυλακίων. Ωστόσο, για επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης απαιτείται ο έλεγχος κι άλλων κυτταρικών παραγόντων που απελευθερώνονται στο ωοθυλακικό υγρό ύστερα από απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων των ωοθυλακίων.



Εικόνα 48: Χαμηλότερα επίπεδα Bcl-2 εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης σε σχέση με τις γυναίκες που έλαβαν Gonal F με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης .

Γ.2 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Γ.2.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Γ.2.1.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ LC3 –I , LC3-II ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

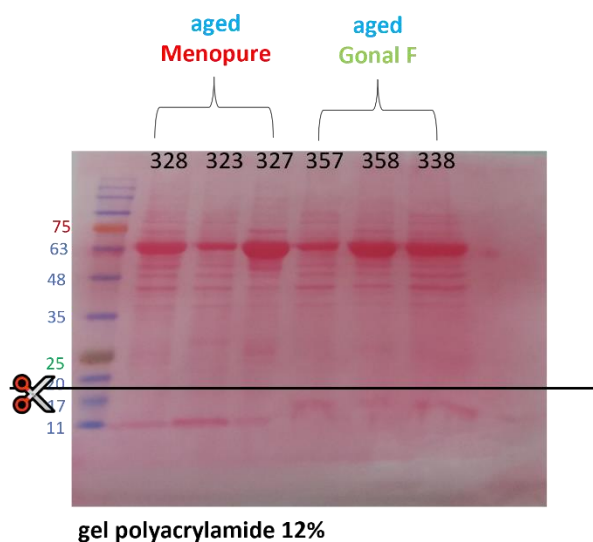
Η αυτοφαγία είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου η οποία επάγεται σε περίπτωση έλλειψης αυξητικών παραγόντων και εξάντλησης θρεπτικών ουσιών, μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης για την ανακύκλωση του κυτταρικού περιεχομένου και για να διατηρηθεί η επιβίωση των κυττάρων. Η διαδικασία περιλαμβάνει τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων διπλής μεμβράνης που καταβροχθίζουν τα συστατικά που προορίζονται για αποικοδόμηση. Η μετατροπή του LC3 –I σε LC3 –II έχει γίνει αποδεκτή ως το χρυσό πρότυπο για σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Το LC3 –II είναι ένας τυπικός δείκτης για τα αυτοφαγοσώματα και δημιουργείται από την από την σύζευξη του κυτοσολικού LC3–I με φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (P.E) στην επιφάνεια των εκκολλαπτόμενων αυτοφαγοσωμάτων, μετά από αυτοφαγικό σήμα . Τα αυτοφαγοσώματα συντήκονται με λυσοσώματα για να σχηματίσουν αυτολυσοσώματα και τα ενδοαυτοφαγοσωματικά συστατικά αποικοδομούνται από λυσοσωμικές υδρολάσες ενώ το LC3 –II αποικοδομείται στον αυτολυσοσωμικό αυλό. Η έκφραση του LC3 είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη στα ωκύτταρα ενώ στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.^{111,112}

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 12 %, δειγμάτων από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .Τα τρία δείγματα προέρχονταν από γυναίκες μεγάλης ηλικίας οι οποίες έλαβαν Gonol F και τα άλλα τρία δείγματα προέρχονταν από γυναίκες επίσης μεγάλης ηλικίας οι οποίες έλαβαν Menopure, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .

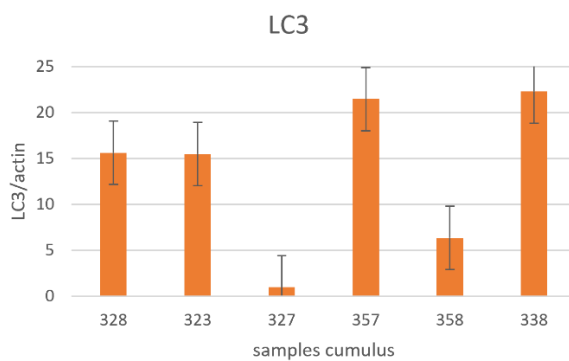
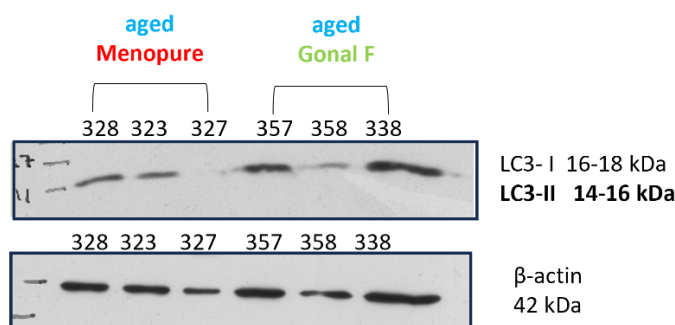
Δείγμα	Πρωτόκολλο	Ηλικία (έτη)	Πάθηση	μg (prot)
328	Menopure	44	-	15
323	Menopure	41	-	15
327	Menopure	40	-	20
357	Gonal F	37	-	20
358	Gonal F	39	-	25
338	Gonal F	38		15

Πίνακας 18: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων LC3-I και LC3-II σε κοκκώδη κύτταρα καθώς και οι ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε μg που φορτώθηκαν από το κάθε δείγμα .

Πραγματοποιήθηκε χρώση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων, με διάλυμα Ponceau S, κόψιμο της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των μοριακών βαρών 11-20 kDa και επώαση της μεμβράνης αυτής με ειδικό αντίσωμα για τον LC3. Η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών της ακτίνης. Η ακτίνη είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει άφθονη στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και επομένως και στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων. Έγινε λοιπόν, κανονικοποίηση στην ποσότητα αυτής της πρωτεΐνης, έτσι ώστε οποιαδήποτε διαφορά παρατηρούνταν στις υπόλοιπες πρωτεΐνες να οφείλονταν στις υπάρχουσες διαφορές των επιπέδων των πρωτεϊνών των δειγμάτων.

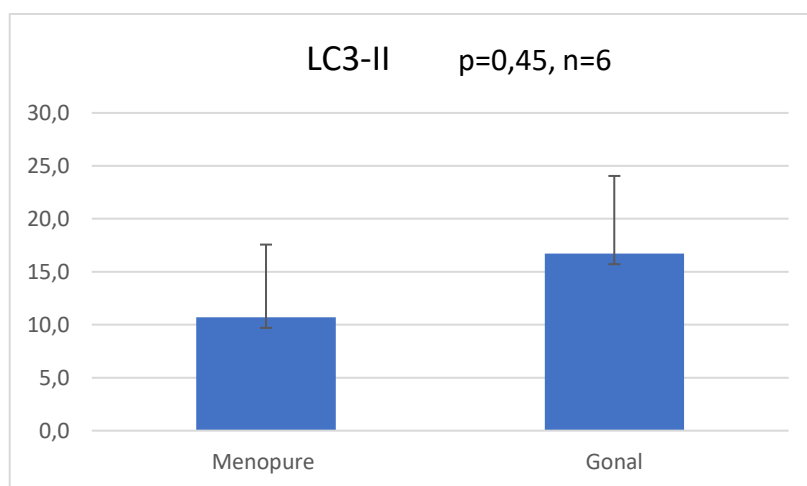


Εικόνα 49 : Χρώση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων με διάλυμα ronseau S, εμφάνιση αλβουμινών, κόψιμο της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των μοριακών βαρών 11-20 kDa και προσθήκη αντισώματος για τον LC3 (1:1000) .



Εικόνα 50: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων του LC3-II σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με χρήση του προγράμματος image j.

Όπως παρατηρούμε, στο παρακάτω διάγραμμα, υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά και υψηλότερα επίπεδα LC3-II εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonol F, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Αυτό, σημαίνει ότι στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonol F εμφανίζονται και υψηλότερα επίπεδα αυτοφαγίας, εφόσον ο LC3-II είναι ένας τυπικός δείκτης για την αυτοφαγία, όπως προαναφέρθηκε.



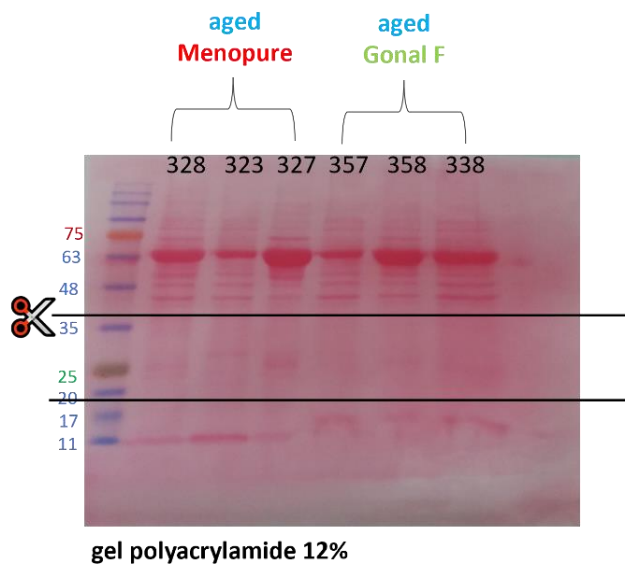
Εικόνα 51: Υψηλότερα επίπεδα LC3-II παρατηρούνται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonol F σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure.

Γ.2.1.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL-2 ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.

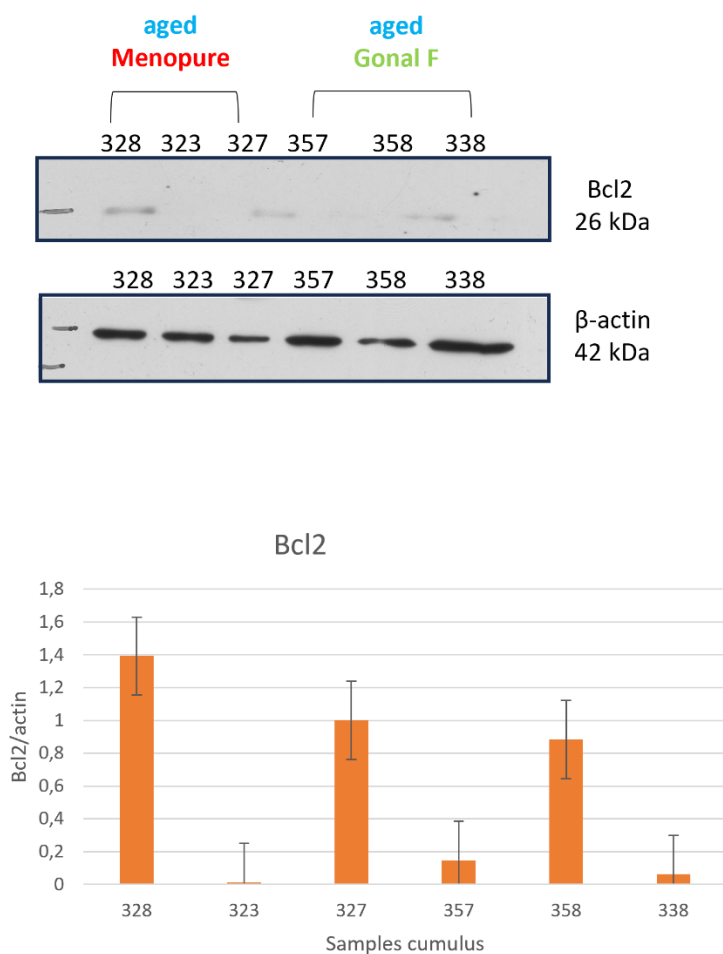
Η πρωτεΐνη Bcl2, δρα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εμφανίζει αντιαποπτωτική δράση εντός του κυττάρου καθώς παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια αλληλεπιδρώντας με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bad. Με άλλα λόγια, ανταγωνίζεται την δράση του Bax και καταστέλλει τις αποπτωτικές διεργασίες μέσω παρεμπόδισης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c. Ένας αξιόπιστος δείκτης του βαθμού απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων θα μπορούσε να είναι ο λόγος των επιπέδων έκφρασης Bcl-2/Bax, στα κοκκώδη κύτταρα.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε δείγματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και χρησιμοποιήθηκαν και παραπάνω για τον έλεγχο των επιπέδων του LC3. Με άλλα

λόγια, τα δείγματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν μια φορά σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου περιεκτικότητας 12 %, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που περιείχε τα δείγματα υποβλήθηκε σε χρώση με διάλυμα Ponceau S, πραγματοποιήθηκε αποκοπή της περιοχής της μεμβράνης που αντιστοιχεί στα μοριακά βάρη από 20 έως λίγο πιο πάνω από 35 kDa. Αυτή η περιοχή της μεμβράνης που αποκόπηκε, επωάστηκε και με ειδικό αντίσωμα για το Bcl-2. Η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών της ακτίνης .

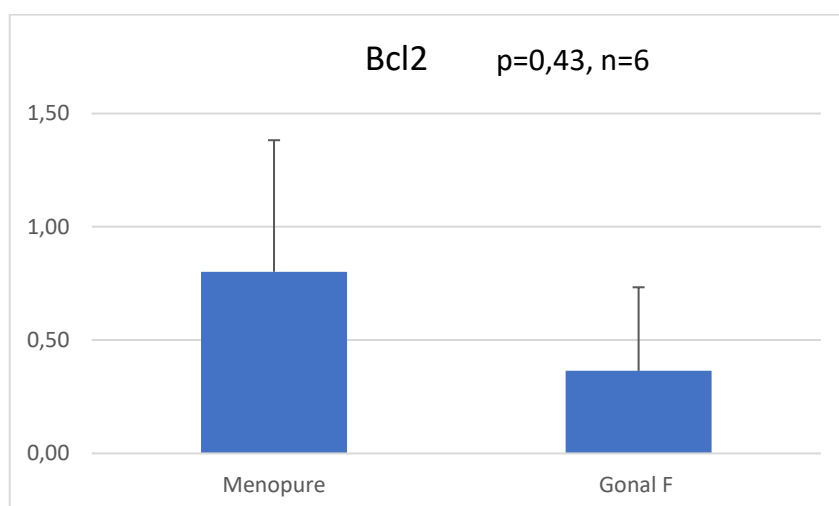


Εικόνα 52: Χρώση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων με διάλυμα ponceau S ,εμφάνιση αλβουμινών , κόψιμο της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των μοριακών βαρών από 20 έως λίγο πιο πάνω από 35 kDa και προσθήκη αντισώματος για την Bcl-2 (1:200) .



Εικόνα 53: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων της Bcl-2 σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με χρήση του προγράμματος image j.

Όπως παρατηρούμε, στο παρακάτω διάγραμμα, υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά και χαμηλότερα επίπεδα Bcl-2 εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Ο έλεγχος μόνο των επιπέδων Bcl-2 δεν είναι αρκετός προκειμένου να διεξαχθεί κάποιο ασφαλές και αξιόπιστο συμπέρασμα όσον αφορά την απόπτωση. Ωστόσο ο συνδυασμός του αυτοφαγικού παράγοντα LC3-II, που ελέγχθηκε παραπάνω, και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, μπορούν να οδηγήσουν στην διατύπωση μιας υπόθεσης σχετικά με τις συνθήκες του περιβάλλοντος των κοκκωδών κυττάρων. Το γεγονός ότι εμφανίζονται υψηλότερα επίπεδα του αυτοφαγικού παράγοντα LC3-II και χαμηλότερα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F σε σχέση με αυτές που έλαβαν Menopure ενδεχομένως σημαίνει ότι η αυτόφαγία δεν συμβαίνει για λόγους προστασίας και επιβίωσης των κυττάρων λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων αλλά λόγω συνθηκών στρες που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση.



Εικόνα 54: Χαμηλότερα επίπεδα Bcl-2 παρατηρούνται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure .

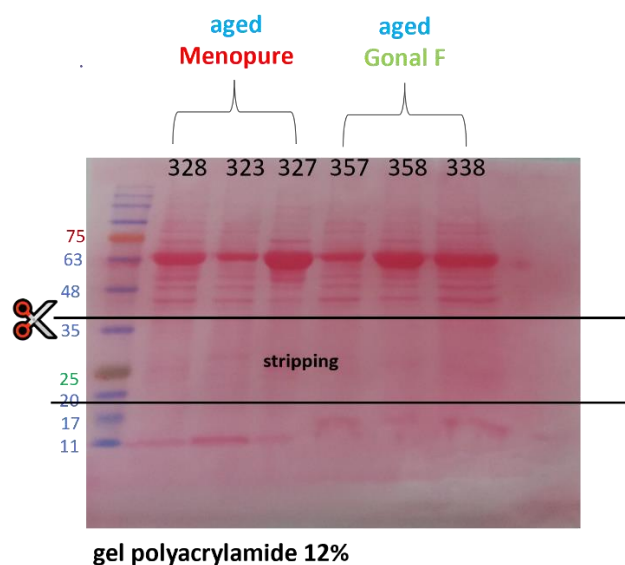
Γ.2.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ WESTERN BLOT

Γ.2.2.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ VDAC ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.

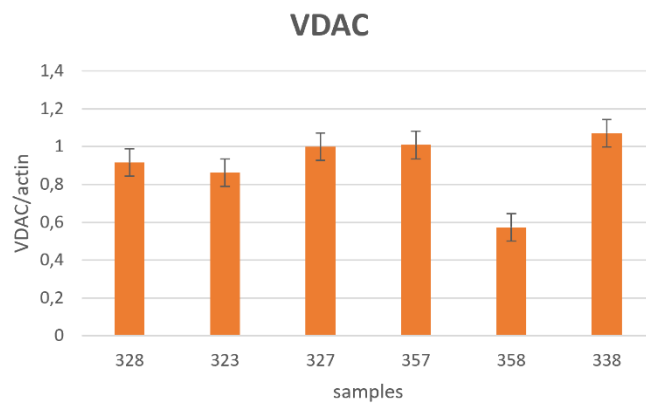
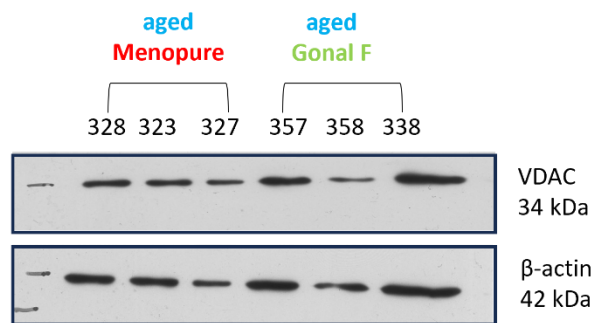
Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δύο μεμβράνες, την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη διαθέτει πορίνες που επιτρέπουν την διέλευση πεπτιδίων, μεταβολιτών και ιόντων. Το VDAC, είναι μια μιτοχονδριακή πορίνη που επιτρέπει την διέλευση μεταβολιτών και ιόντων εντός και εκτός των μιτοχονδρίων και είναι από τις πιο άφθονες πρωτείνες που υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη αυτών.

Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένας δείκτης που αντανακλά την μάζα των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Επιπλέον, το VDAC υφίσταται ολιγομερισμό, αλληλεπιδρώντας με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax ή με άλλα μόρια VDAC σχηματίζοντας ένα κανάλι το οποίο προάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι πολλές πρωτεΐνες κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη (Act) ή η τουμπουλίνη (Tub) δεσμεύουν το VDAC συμμετέχοντας στη ρύθμιση της διαπερατότητας του καναλιού.^{111,112}

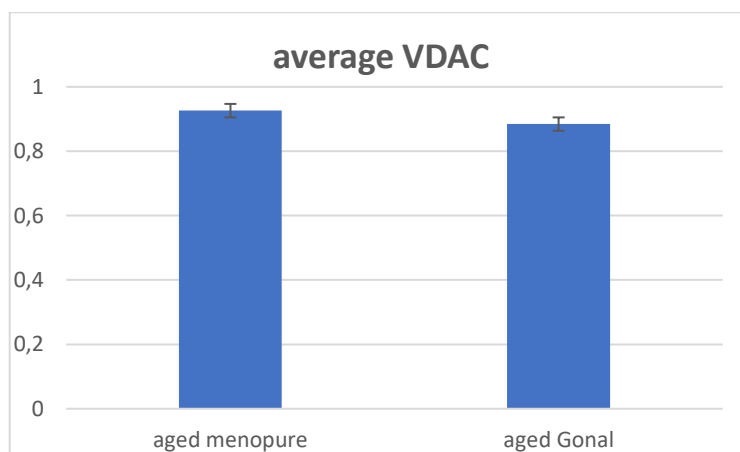
Ελέγχθηκαν τα επίπεδα του VDAC σε δείγματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Τα δείγματα ήταν τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του LC3 -II και της Bcl-2 στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που βάφτηκε με διάλυμα Ponceau S. Η περιοχή της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, από 20 έως λίγο πιο πάνω από 35 kDa υποβλήθηκε σε διαδικασία stripping για τη απομάκρυνση του προηγούμενου αντισώματος της Bcl-2. Μετά από την διαδικασία stripping επώαστηκε με το αντίσωμα VDAC. Η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών της ακτίνης. Όσον αφορά τα επίπεδα VDAC δεν εμφανίζονται διαφορές μεταξύ των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και αυτών που έλαβαν Menopure.



Εικόνα 55: Χρώση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων με διάλυμα ponceau S, εμφάνιση αλβουμινών, κόψιμο της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των μοριακών βαρών από 20 έως λίγο πιο πάνω από 35 kDa, προσθήκη αντισώματος για την Bcl-2 (1:200), stripping της μεμβράνης για την απομάκρυνση του αντισώματος της bcl-2 και εκ νέου προσθήκη αντισώματος για το VDAC (1:1000) στο συγκεκριμένο τμήμα της μεμβράνης.



Εικόνα 56: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων της VDAC σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με χρήση του προγράμματος imag j.

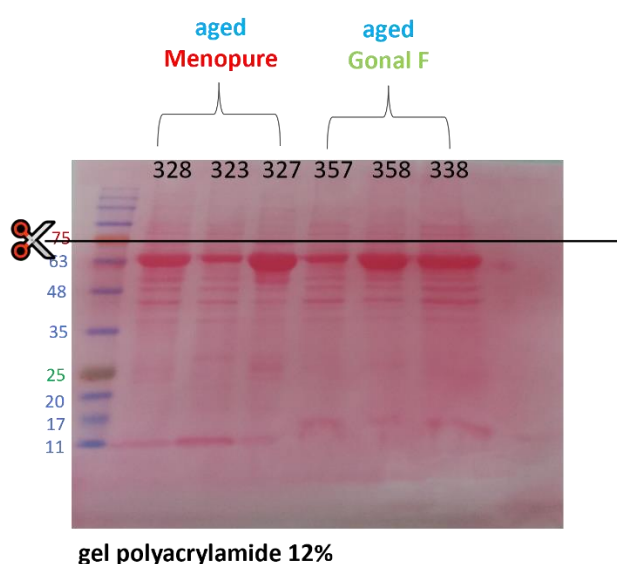


Εικόνα 57: Τα επίπεδα VDAC δεν εμφανίζουν διαφορά μεταξύ των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και Gonol F .

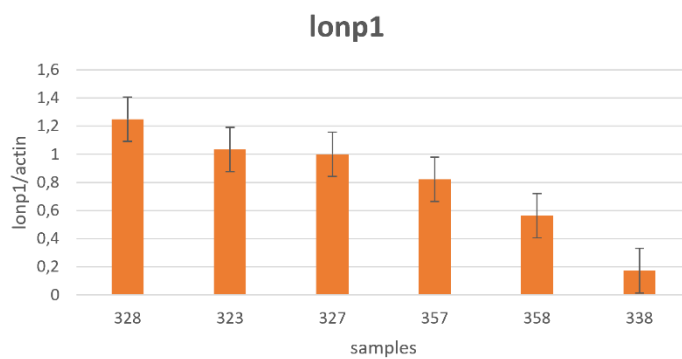
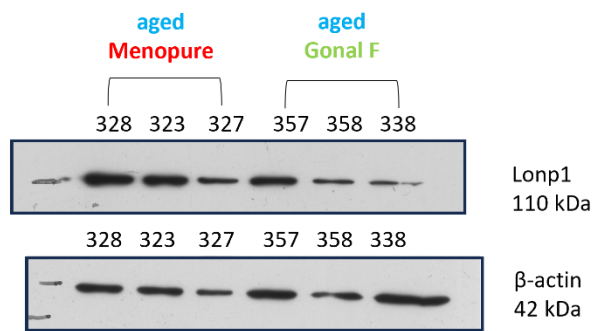
Γ.2.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ LONP1 ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η μιτοχονδριακή πρωτεάση Lonp1 είναι ένα λειτουργικό εξαμερές σύμπλοκο, τροφοδοτούμενο από ATP, το οποίο δρα στην μιτοχονδριακή μήτρα. Η πρωτεάση αυτή, ρυθμίζει τον μεταβολισμό και τη μιτοχονδριακή λειτουργία και ανταποκρίνεται στις βλάβες που προκαλούνται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στα σωματικά κύτταρα. Αποικοδομεί πρωτεολυτικά κατεστραμμένες ή λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες βοηθώντας στην αποφυγή της συσσώρευσής τους. Επιπλέον, ρυθμίζει την αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), βοηθώντας στην διατήρηση του σωστού αριθμού των αντιγράφων του, τη μιτοχονδριακή βιοσύνθεση και σταθεροποιεί την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσα στα μιτοχόνδρια.¹¹³

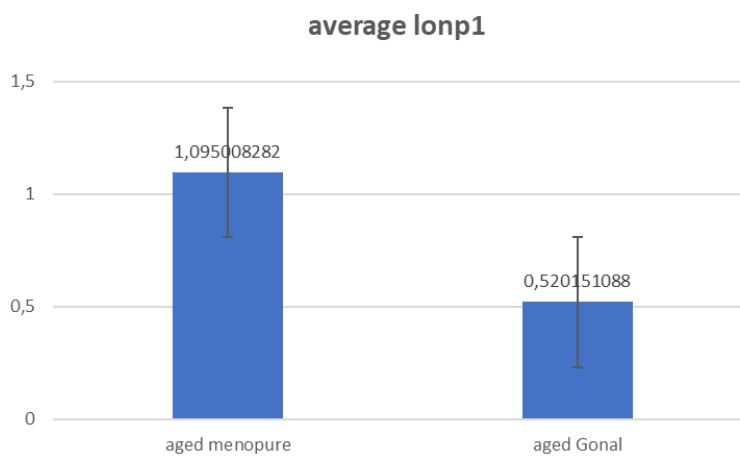
Στην συγκεκριμένη διπλωματική, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της Lonp1 σε δείγματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Τα δείγματα ήταν τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των επιπέδων του LC3 -II, της Bcl-2 και του VDAC στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που βάφτηκε με διάλυμα Ponceau S. Ωστόσο, η περιοχή της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των επιπέδων της Lonp1 ήταν αυτή που αντιστοιχούσε στα μοριακά βάρη από 75 έως 245 kDa. Η κανονικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται για τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση των ζωνών της ακτίνης. Όπως παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα, τα επίπεδα της Lonp1 έχουν την τάση να είναι υψηλότερα στις μεγάλες σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Menopure, σε σχέση με αυτές που έλαβαν Gonal F.



Εικόνα 58: Χρώση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων κοκκωδών κυττάρων με διάλυμα ponceau S, εμφάνιση αλβουμινών, κόψιμο της μεμβράνης που αντιστοιχεί στην περιοχή των μοριακών βαρών από 75 έως 245 kDa, προσθήκη αντισώματος για την Lonp1 (1:10.000) σε αυτό το τμήμα της μεμβράνης .



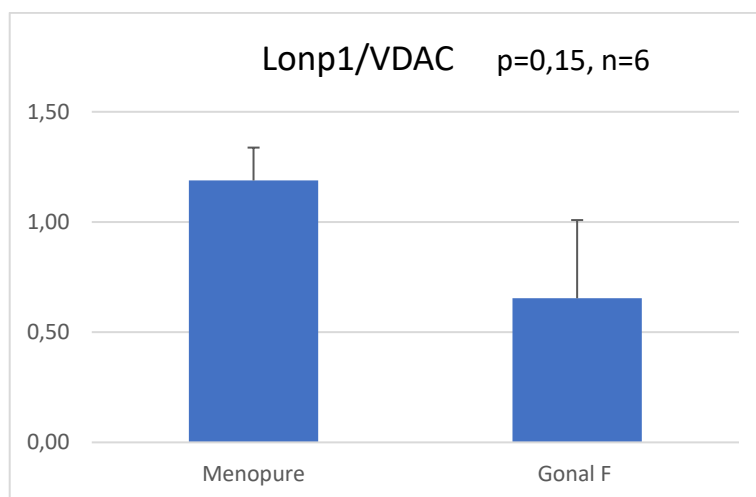
Εικόνα 59: Ποσοτικοποίηση των ζωνών που λαμβάνονται κατά τον έλεγχο των επιπέδων της Lonp1 σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με χρήση του προγράμματος image j.



Εικόνα 60: Υψηλότερα επίπεδα Lonp1 εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure σε σχέση με αυτές που έλαβαν Gonal F.

Γ.2.2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ LONP1/VDAC ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εφόσον, η πρωτεΐνη Lonp1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και ασκεί την δράση της στην μιτοχονδριακή μήτρα και η πορίνη VDAC εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και αποτελεί δείκτη της μάζας των μιτοχονδρίων κρίθηκε χρήσιμο να ελεγχθεί ο λόγος Lonp1/VDAC στα παραπάνω δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F. Όπως λοιπόν φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, ο λόγος Lonp1/VDAC φαίνεται να είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F. Τα επίπεδα της πορίνης VDAC δεν εμφάνισαν διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών των γυναικών αυτών. Επομένως, οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα Lonp1 στα μιτοχονδριά τους (μικρότερος λόγος Lonp1/VDAC). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι τα μιτοχόνδρια των κοκκωδών κυττάρων αυτών των γυναικών μπορεί να εμφανίζουν κάποια δυσλειτουργία σε σχέση με τα μιτοχόνδρια των κοκκωδών κυττάρων των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure εφόσον η Lonp1 είναι υπεύθυνη και την εύρυθμη λειτουργία των μιτοχονδρίων.



Εικόνα 61: Υψηλότερα επίπεδα του λόγου Lonp1/VDAC εμφανίζεται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure σε σχέση με αυτές που έλαβαν Gonal F.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ1. Η ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΓΥΝΑΙΚΑΣ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΠΟΚΑΛΥΨΕ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.

Το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί ένα βιολογικό υγρό το οποίο βρίσκεται από πρωτεΐνες του ορού του αίματος, οι οποίες εισέρχονται στα ωοθυλάκια διαπερνώντας τον ωοθυλακικό φραγμό (blood follicular barrier). Η πρωτεομική ανάλυση του ωοθυλακικού υγρού από ωοθυλάκια μιας γυναίκας, που υποβλήθηκε σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή αποκάλυψε ποιες είναι οι πρωτεΐνες αυτές καθώς και τα μοριακά βάρη που εμφανίζονται. Οι πρωτεΐνες αυτές, είναι η ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 25 kDa, η βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG που εμφανίζεται στα 55 kDa, οι αλβουμίνες που εμφανίζονται στα 65 – 70 kDa και η τρανσφερίνη που εμφανίζεται γύρω στα 80 kDa. Επομένως, η μελέτη του ωοθυλακικού υγρού για την ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής western blot περιορίζεται στις περιοχές των μοριακών βαρών που δεν εμφανίζονται οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Επειδή λοιπόν, αυτό, περιορίζει και δυσκολεύει πολύ την μελέτη του ωοθυλακικού υγρού για την ανίχνευση βιοχημικών μορίων βιοδεικτών, είναι σημαντικό να βρεθεί τρόπος να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος.

Δ.2. ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΕΡΗ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΦΑΙΡΕΘΟΥΝ ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ

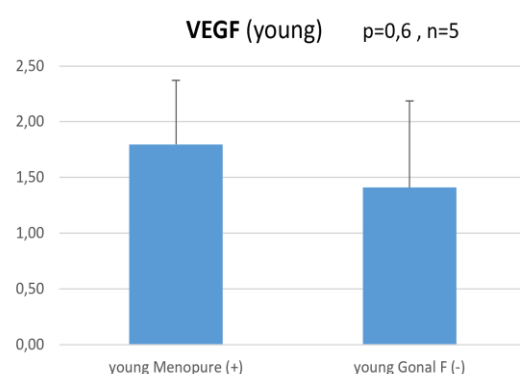
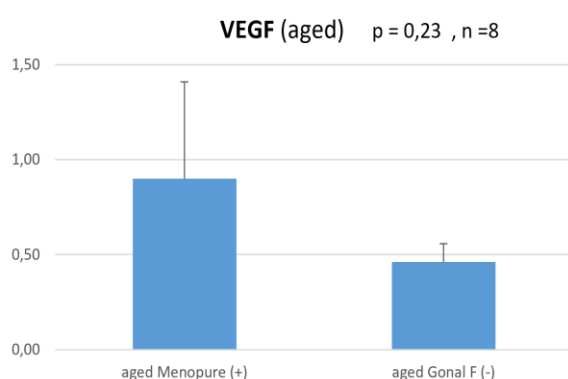
Μία από τις πρωτεΐνες που επιλέχθηκε να μελετηθεί ήταν η IL-6, η οποία όμως δεν μπόρεσε να ανιχνευτεί, καθώς τα αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών του πλάσματος, και συγκεκριμένα οι ανοσοσφαιρίνες IgG που διαθέτουν παρόμοιο μοριακό βάρος, κάλυψαν το σήμα της. Επομένως, για την ακριβέστερη ανάλυση των πρωτεϊνών του ωοθυλακικού υγρού πρέπει πρώτα να καθαριστεί ο ορός από τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις .

Δ.3. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑΝ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΑ ΥΓΡΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Δ.3.1 ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΑΙ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ.

Οι μεγάλες σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Menopure και είχαν επιτυχή έκβαση εγκυμοσύνης εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα VEGF, σε σχέση με τις μεγάλες σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Επιπλέον, οι μικρές σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Menopure και είχαν επιτυχή έκβαση εγκυμοσύνης εμφάνισαν και αυτές υψηλότερα επίπεδα VEGF, σε σχέση με τις μικρές σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Ωστόσο, το φαινόμενο διαφοράς στα επίπεδα VEGF, δεν παρατηρήθηκε τόσο έντονα στις νεαρές γυναίκες όσο στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί τα δείγματα νεαρών γυναικών που συγκρίθηκαν μεταξύ τους για τον έλεγχο των επιπέδων του VEGF ήταν λιγότερα. Ένας λόγος για τον οποίο τα υψηλά επίπεδα του VEGF, στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζονται με επιτυχή έκβαση εγκυμοσύνης ενδεχομένως είναι το γεγονός ότι αποτελούν δείκτη καλύτερης κυκλοφορίας του αίματος και υψηλότερου βαθμού αγγείωσης των ωοθυλακίων και επομένως τα ωάρια τα οποία αποκτώνται από αυτά τα ωοθυλάκια είναι πιο ικανά να γονιμοποιηθούν. Τέλος, λόγω του ότι το θετικό αποτέλεσμα γονιμοποίησης

εμφανίζεται μόνο στις γυναίκες που έλαβαν Menopure αντί για Gonal F , σημαίνει ότι είναι πιθανό, το πρωτόκολλο διέγερσης που λαμβάνουν οι γυναίκες να επηρεάζει τα επίπεδα του VEGF, στο ωοθυλακικό υγρό και κατ' επέκτασιν και το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, το Menopure οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα του VEGF στο ωοθυλακικό υγρό, καλύτερη κυκλοφορία του αίματος και υψηλότερου βαθμού αγγείωσης των ωοθυλακίων και επιτυχημένη εγκυμοσύνη για τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας και μικρής ηλικίας .



Δ.4. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ BCL2 ΘΑ ΜΠΟΡΟΥΣΕ ΝΑ ΘΕΩΡΗΘΕΙ ΕΝΑΣ ΥΠΟΣΧΟΜΕΝΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Δ.4.1 ΣΤΙΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ BCL-2 ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΑΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

Το ωοθυλακικό υγρό είναι παράγωγο της μεταφοράς των συστατικών από το πλάσμα του αίματος, που διαπερνούν το ωοθυλακικό φραγμό (blood follicular barrier) αλλά και παράγωγο των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης μέσω ενεργής έκκρισης. Η πρωτεΐνη Bcl-2 βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων, δρα στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εμφανίζει αντιαποπτωτική δράση . Όταν τα κύτταρα

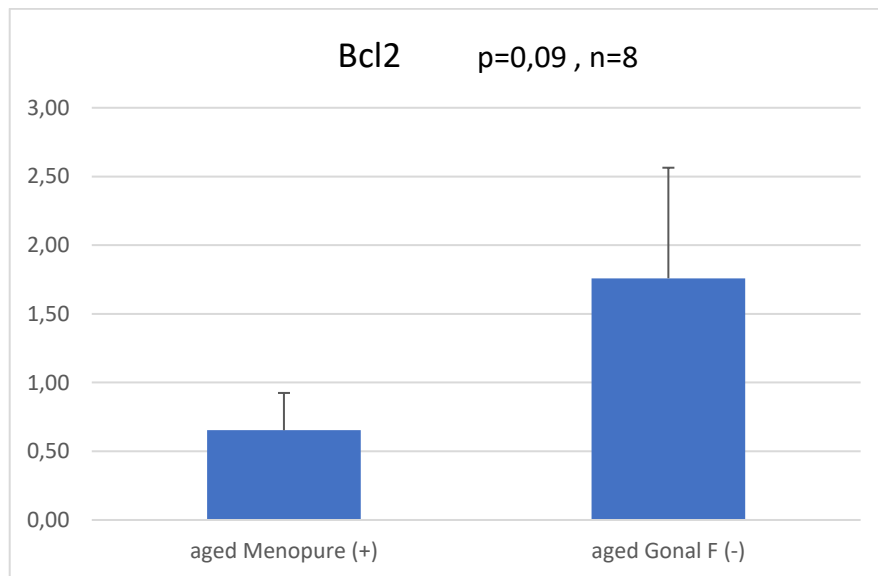
οδηγούνται σε απόπτωση, η πρωτεΐνη αυτή είναι δυνατό να απελευθερωθεί στο ωοθυλακικό υγρό και να εντοπιστεί μέσω ανοσοαποτύπωσης Western blot . Ωστόσο, ο εντοπισμός της στο ωοθυλακικό υγρό δεν σχετίζεται με την αντιαποπτωτική δράση που εμφανίζει εντός των κυττάρων αλλά αντίθετα είναι αποτέλεσμα της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2, στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών μεγάλης ηλικίας που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και βρέθηκε ότι χαμηλότερα επίπεδα Bcl2 εμφανίζονται στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure και είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Παρόλο που παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό μεταξύ των δυο κατηγοριών των γυναικών, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλούς και αξιόπιστου συμπεράσματος όσον αφορά τον βαθμό απόπτωσης των κυττάρων. Μόνο αν ήταν δυνατός ο έλεγχος και άλλων κυτταρικών παραγόντων που απελευθερώνονται στο ωοθυλακικό υγρό, ως αποτέλεσμα της απόπτωσης των κυττάρων, θα μπορούσαμε να αποφανθούμε για τον βαθμό απόπτωσης. Επίσης, παρόλο που έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της ακτίνης στο ωοθυλακικό υγρό, αποδείχθηκε ανεπιτυχής.

Κρίνοντας, μόνο από τα επίπεδα Bcl2, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F, με αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης εμφάνισαν και υψηλότερο βαθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ωοφόρου δίσκου δεδομένου των υψηλότερων επιπέδων Bcl2 στο ωοθυλακικό υγρό τους, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, με θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης. Ο υψηλότερος βαθμός απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ωοφόρου δίσκου στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F μπορεί να εξηγήσει το γεγονός ότι οι γυναίκες αυτές είχαν αρνητική έκβαση εγκυμοσύνης. Εφόσον, ο βαθμός απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων που εφάπτονται του ωαρίου είναι υψηλότερος, τότε τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να τροφοδοτήσουν το ωοκύτταρο με όλα τα απαραίτητα συστατικά, δηλαδή αυξητικούς παράγοντες όπως ανασταλίνη, ακτιβίνη , TGFα, και AMH που χρειάζονται για να αναπτυχθεί. Αυτό ενδεχομένως, οδηγήσει σε χαμηλής ποιότητας ωοκύτταρο, το οποίο με την σειρά του θα οδηγήσει σε ανεπιτυχή γονιμοποίηση και έκβαση της εγκυμοσύνης.

Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι καθώς το ωοθυλάκιο προετοιμάζεται για την ωοθυλακιορρηξία, ένας αριθμός κοκκωδών κυττάρων είναι φυσιολογικό να οδηγείται σε απόπτωση, προκειμένου να απελευθερωθεί το ωοκύτταρο από το ωοθυλάκιο. Ωστόσο, αν συμβεί μία σχετικά πρόωρη ωορρηξία, που αναγκάζει τα κοκκώδη κύτταρα ωοφόρου δίσκου να οδηγηθούν σε απόπτωση τότε τα τελευταία δεν θα έχουν προλάβει να τροφοδοτήσουν το ωοκύτταρο με όλα τα απαραίτητα συστατικά που απαιτούνται για την αναπτυξή του. Αυτός ενδεχομένως είναι και ένας λόγος που τα υψηλά επίπεδα απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου σχετίστηκαν με ανώριμα ωοκύτταρα, χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης και αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης.

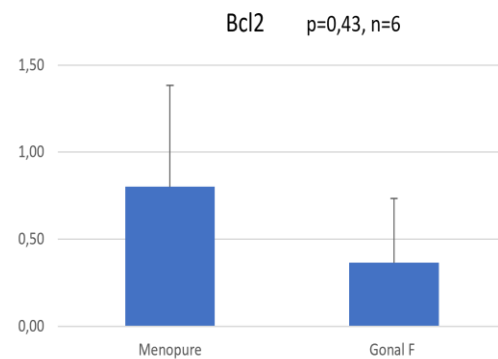
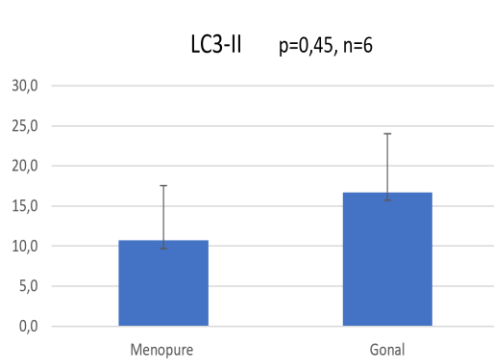
Τέλος, φαίνεται ότι η φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν οι γυναίκες επηρεάζει τα επίπεδα Bcl2 στο ωοθυλακικό υγρό, τον βαθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων και κατ' επέκτασιν το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης, εφόσον τα επίπεδα Bcl2, διαφέρουν μεταξύ των γυναικών που έλαβαν διαφορετική φαρμακευτική αγωγή. Συγκεκριμένα το Menopure, οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα Bcl2 στο ωοθυλακικό υγρό, μικρότερο βαθμό απόπτωσης και επιτυχημένη εγκυμοσύνη για τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας. Έτσι λοιπόν, αν οι γυναίκες που έλαβαν Gonal F και είχαν αρνητικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης, είχαν λάβει Menopure, τότε αυτό ενδεχομένως να μείωνε τα επίπεδα Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό αυτών των γυναικών, και τον βαθμό απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων και να οδηγούσε σε θετικό αποτέλεσμα εγκυμοσύνης .



Δ.5 Ο ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ LC3-II ΚΑΙ BCL2 ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΕΝΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΝΑ ΕΚΤΙΜΗΣΟΥΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΑΥΤΩΝ.

Δ.5.1. ΥΨΗΛΟΤΕΡΑ ΕΠΙΠΕΔΑ LC3-II ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΑ ΕΠΙΠΕΔΑ BCL2 ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ GONAL F ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ MENOPURE

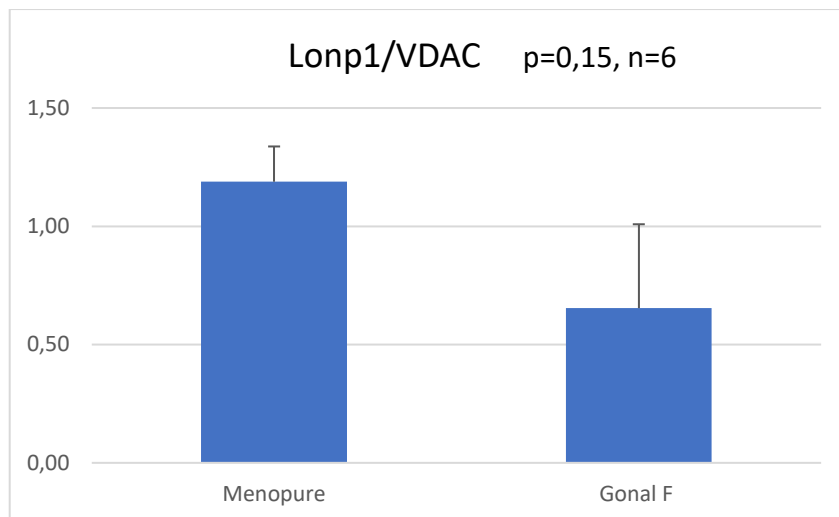
Ο παράγοντας LC3-II αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας, καθώς βρίσκεται στην επιφάνεια των αυτοφαγοσωμάτων ενώ η πρωτεΐνη Bcl-2, εμφανίζει αντιαποπτωτική δράση εντός του κυττάρου, καθώς ανταγωνίζεται την δράση της πρωτεΐνης Bax που προάγει την απόπτωση. Παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonad F, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα LC3-II και χαμηλότερα επίπεδα Bcl2, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure . Επομένως οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonad F, εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό απόπτωσης και αυτοφαγίας σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Αυτή η παρατήρηση, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonad F, η αυτοφαγία δεν συμβαίνει για λόγους προστασίας και επιβίωσης των κυττάρων, κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων αλλά λόγω ακραίων συνθηκών στρες που οδηγούν τα κύτταρα σε θάνατο (απόπτωση). Τα αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω συνδυασμού της διαδικασίας της αυτοφαγίας (αυξημένα επίπεδα LC3-II) και της απόπτωσης (μειωμένα επίπεδα Bcl2). Τέλος, δεδομένου ότι τα επίπεδα LC3-II και Bcl2 διέφεραν μεταξύ γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν διαφορετική φαρμακευτική αγωγή, αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν οι γυναίκες μπορεί να επηρεάζει την κατάσταση των κοκκωδών κυττάρων και κατ' επέκτασιν την ποιότητα των ωαρίων και την έκβαση της εγκυμοσύνης.



Δ.6. Ο ΛΟΓΟΣ LONP1 / VDAC ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΕΝΑΝ ΧΡΗΣΙΜΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ , ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΤΟΣΟ ΜΕ ΤΗΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΟΣΟ ΚΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Δ.6.1 Ο ΛΟΓΟΣ LONP1 / VDAC ΕΙΝΑΙ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟΣ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ GONAL F ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ MENOPURE .

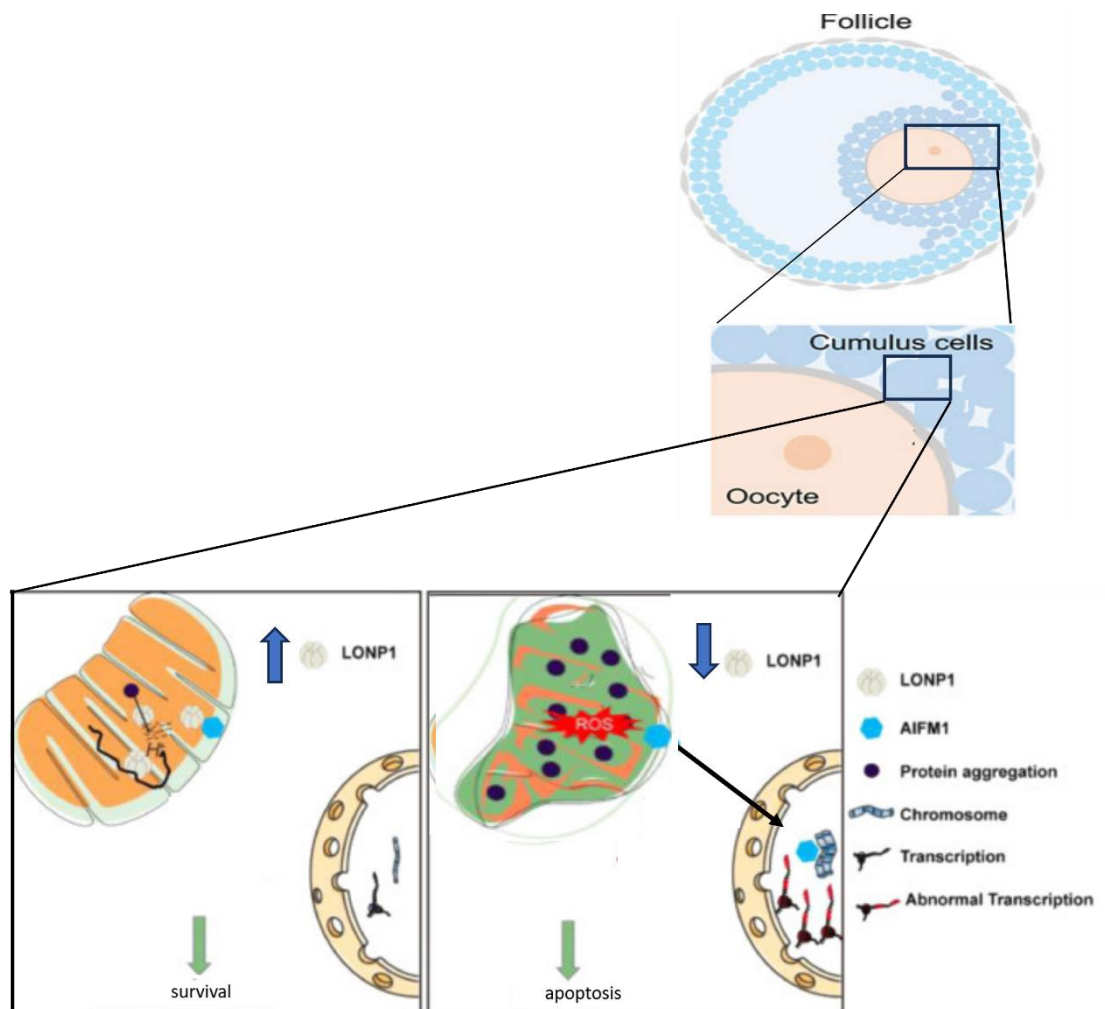
Η πορίνη VDAC, βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και αποτελεί δείκτη της μάζας των μιτοχονδρίων. Μεταξύ των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα VDAC. Ωστόσο, παρατηρήθηκε διαφορά όσον αφορά τα επίπεδα της μιτοχονδριακής πρωτεΐσης Lonp1 και οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα Lonp1, σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Επομένως, ο λόγος Lonp1/ VDAC είναι μικρότερος για τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, δεδομένου ότι τα επίπεδα VDAC, δεν παρουσιάζουν διαφορά μεταξύ των δυο κατηγοριών των γυναικών .



Οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F και εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αυτοφαγίας και απόπτωσης (υψηλότερα επίπεδα LC3-II και χαμηλότερα Bcl-2) εμφανίζουν και χαμηλότερα επίπεδα Lonp1 (μικρότερος λόγος Lonp1/ VDAC) σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure . Λαμβάνοντας υπόψη, μόνο τα χαμηλά επίπεδα Lonp1, δεν είναι δυνατό να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα όσον αφορά την λειτουργία των μιτοχονδρίων των κοκκωδών κυττάρων (cumulus). Ωστόσο, τα υψηλότερα επίπεδα LC3-II και τα χαμηλότερα επίπεδα Bcl-2 στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα της Lonp1, ενδεχομένως σημαίνουν ότι εμφανίζεται κάποια δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια αυτών των γυναικών σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Επιπλέον, όταν τα επίπεδα της Lonp1 είναι χαμηλότερα, δεν πραγματοποιείται αποικοδόμηση όλων των μη σωστά αναδιπλωμένων και κατεστραμμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται. Τα μιτοχόνδρια δυσλειτουργούν και τα κύτταρα μπορεί να οδηγηθούν σε απόπτωση.

Ο λόγος Lonp1/VDAC, αποτέλεσε έναν χρήσιμο βιοδείκτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, αλλά μπορεί να συσχετιστεί και με την απόπτωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεγάλες σε ηλικία γυναίκες που έλαβαν Gonal F, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα απόπτωσης και χαμηλότερα επίπεδα της Lonp1 στα μιτοχόνδρια σε σχέση με τις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευτεί μέσω ενός παράγοντα που ονομάζεται AIFM1(apoptosis- inducing factor mitochondria associated-1) και μελετήθηκε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ο παράγοντας AIFM1 εκφράζεται τόσο στα ωκύτταρα όσο και στα κοκκώδη κύτταρα και ως απόκριση σε ερεθίσματα σηματοδότησης κυτταρικού θανάτου, διασπάται, απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται στον πυρήνα για να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο . Η Lonp1, καταστέλλει την πυρηνική μετατόπιση του AIFM1 , καθώς τον δεσμεύει, και δεν του επιτρέπει να εισέλθει στον

πυρήνα και να προκαλέσει απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων. Έτσι λοιπόν, όταν τα επίπεδα της Lonp1 είναι υψηλότερα, δηλαδή στην περίπτωση των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Menopure, τότε η Lonp1 δεσμεύει τον παράγοντα AIFM1, και τα κύτταρα δεν οδηγούνται σε απόπτωση. Όταν όμως τα επίπεδα της Lonp1 είναι χαμηλότερα, δηλαδή στην περίπτωση των γυναικών μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F, τότε λόγω αδυναμίας δέσμευσης του παράγοντα AIFM1, αυτός εισέρχεται στον πυρήνα προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης, κατακερματισμό του DNA και απόπτωση.¹¹⁴ Αυτό, εξηγεί και το γεγονός ότι στις γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F, εμφανίζονται χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης Lonp1 και υψηλότερη απόπτωση.



Εικόνα 62 : Προτεινόμενο μοντέλο δράσης της Lonp1 στα κοκκώδη κύτταρα ωοφόρου δίσκου και ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρά με τον παράγοντα AIFM1 και καταστέλλει την απόπτωση των κυττάρων.

Δ.7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Το ωοθυλακικό υγρό είναι ένα χρήσιμο υγρό το οποίο περιέχει πολλά μόρια που μπορούν να μελετηθούν με πλήθος τεχνικών και να αξιοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες που θα μας δώσουν πληροφορίες για την ποιότητα και την κατάσταση ωρίμανσης του ωοκυττάρου. Η μελέτη του και συγκεκριμένα η ανίχνευση και ο έλεγχος των επιπέδων εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών αλλά και πρωτεϊνών με ρόλο “κλειδί” στο μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη βιοδεικτών για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επιπλέον η μελέτη παραγόντων των κοκκωδών κυττάρων που εφάπτονται του ωαρίου μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες που αφορούν τα κύτταρα αυτά όπως τα επίπεδα αυτοφαγίας, τον βαθμό απόπτωσης των κυττάρων, την μιτοχονδριακή τους λειτουργία, κλπ. Οι πληροφορίες αυτές είναι χρήσιμες για να εκτιμήσουμε την ποιότητα και την κατάσταση ωρίμανσης του ωαρίου, εφόσον τα κύτταρα αυτά ανταλλάσσουν συστατικά με το ωοκύτταρο τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξή του.

Παρατηρήθηκε, ότι τα επίπεδα του παράγοντα VEGF στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών μεγάλης και μικρής ηλικίας όπως και τα επίπεδα Bcl-2 στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών μεγάλης ηλικίας, που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και έλαβαν διαφορετική φαρμακευτική αγωγή συσχετίστηκαν με το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης, χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τα κοκκώδη κύτταρα, βρέθηκε ότι οι γυναίκες μεγάλης ηλικίας που έλαβαν Gonal F εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα του LC3-II, χαμηλότερα επίπεδα της Bcl-2 και μικρότερο λόγο Lonp1/VDAC σε σχέση με αυτές που έλαβαν Menopure. Τα χαμηλότερα επίπεδα της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Lonp1 συσχετίστηκαν τόσο με την μιτοχονδριακή λειτουργία όσο και με τον βαθμό απόπτωσης των κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες που έλαβαν Gonal F εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα της Lonp1 που τελικά οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα αυτοφαγίας και απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων. Ωστόσο, προτείνεται εκτενέστερη μελέτη πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά.

Προκειμένου να ανιχνευτούν, και να ελεγχθούν και άλλες πρωτεΐνες στο ωοθυλακικό υγρό που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες, οι οποίοι αντανakλούν την ποιότητα του ωοκυττάρου αλλά και για να γίνει μια πρωτεομική ανάλυση του υγρού, κρίνεται χρήσιμο να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος που βρίσκονται σε τεράστιες συγκεντρώσεις στον ορό. Αυτό μπορεί να συμβεί με την χρήση κάποιου εμπορικού kit που συγκρατεί τις αλβουμίνες και τις ανοσοσφαιρίνες. Ακόμη μπορεί να γίνει χρήση της μεθόδου ELISA για πιο ακριβή αποτελέσματα και για τον υπολογισμό φλεγμονωδών παραγόντων στο υγρό.

Κλείνοντας, να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα και οι παρατηρήσεις που έγιναν στην παρούσα διπλωματική εργασία ενθαρρύνουν τη χρήση όλων αυτών των

μορίων και των μεθοδολογιών για την ανάπτυξη βιοδεικτών. Εκτός από την μελέτη όμως πρωτεϊνών στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να πραγματοποιηθεί και ανίχνευση μορίων μικρότερου μοριακού βάρους, τα οποία είτε μπορεί να εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια είτε και όχι. Αυτό, μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση τεχνικής LC-MS και NMR. Ο συνδυασμός λοιπόν, μεταβολομικής και πρωτεωμικής ανάλυσης θα οδηγούσε στην ανάπτυξη ευρείας κλίμακας βιοδεικτών στο υγρό και θα προσέφερε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το πως οι βιοδείκτες αυτοί επηρεάζουν την ανάπτυξη, την ποιότητα του ωοκυτταρου και γενικότερα την πορεία της ωοθυλακιογένεσης. Χρησιμοποιώντας όλες αυτές τις πληροφορίες μπορεί να πραγματοποιηθεί μια πιο προσωποποιημένη αντιμετώπιση κάθε γυναίκας, ώστε να επιτευχθεί αύξηση αποδοτικότητας των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που είναι και ο μακροπρόθεσμος στόχος αυτής της μελέτης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Matzuk, M.M & Lamb, D.J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* vol. 14(11):1197-213 (2008).
2. M.D. Grisword, P.A Hunt, Meiosis, *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition), Academic Press, Pages 338-341, ISBN 9780080961569 (2013)
3. Lauralee, S. The reproductive system in human physiology: From cells to systems (1994)
4. Purnima Gurung, Ekrem Yetiskul, Ishwarlal Jialal, *Physiology, Male Reproductive System* (2023)
5. Sezgin Gunes, Gulgez Neslihan Taskurt Hekim, Mehmet Alper Arslan & Ramazan Asci, Effects of aging on the male reproductive system. (2016)
6. Filipe Tenorio Lira Neto, Phil Vu Bach, Bobby B Najari, Philip S Li, Marc Goldstein, *Spermatogenesis in humans and its affecting factors* (2016)
7. Rosner J ., Samardzic T ., Sarao MS *Physiology, Female Reproduction* (2019)
8. *Human Physiology: From Cells to Systems – Lauralee Sherwood – Βιβλία Google*
9. Jon C Havelock , William E Rainey, Bruce R Carr, *Ovarian granulosa cell lines* (2004)
10. Rita Canipari , Oocyte–granulosa cell interactions, *Human Reproduction Update* 2000, Vol. 6 No. 3 pp. 279–289.
11. Diane M. Duffy, CheMyong Ko, Misung Jo, Mats Brannstrom, and Thomas E. Curry, Jr. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes, *Endocrine Reviews* 40: 369 – 416, 2019
12. Irma Virant-Klun , Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 8 ,49-60 (2015)
13. Jiawei Zhou, Xianwen Peng, Shuqi Mei, Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia, *Int J Biol Sci* 2019; 15(4):726-737.
14. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory and General Biology/Book%3AGeneral Biology %28Boundless%29/43%3A Animal Reproduction and Development/43.03%3A Human Reproductive Anatomy and Gametogenesis/43.3C%3A Gametogenesis %28Spermatogenesis and Oogenesis%29](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3AGeneral_Biology_%28Boundless%29/43%3A_Animal_Reproduction_and_Development/43.03%3A_Human_Reproductive_Anatomy_and_Gametogenesis/43.3C%3A_Gametogenesis_%28Spermatogenesis_and_Oogenesis%29)
15. *Danielle Monniaux, Svetlana Uzbekova, in Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition), 2019*
16. Gregory F. Erickson, Shunichi Shimasaki, The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors, Volume 76, Issue 5 Pages A1-A32, 863-1090, B1-B16 (November 2001).
17. Marco Conti, R. Jeffrey Chang, in *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*, 2016
18. Kawashima I, Kawamura K, Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signalling pathway, *Syst Biol Report Med* .(2018)

19. J. Larry Jameson , Leslie J De Groot Gordon C. Weir et al. , Endocrinology : Adult and Pediatric , Seven Edition , (2016)
20. Jock K. Findlay, Folliculogenesis in [*Encyclopedia of Hormones*](#), Pages 653-656 (2003)
21. Macklon, N. S. & Fauser, B. C. J .M. Aspects of ovarian follicle development throughout life . Hormone Research vol.52 161-170 (1999)
22. <https://mcg.ustc.edu.cn/bsc/follicle/>
23. Elizabeth A. McGee, Aaron J. W. Hsueh, Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles , Endocrine Reviews, Volume 21, Issue 2, 1 April 2000, Pages 200–214, <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
24. Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews* **36**(1), 1–24;
25. McGee, E. A. and Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* **21**(2), 200–214.
26. Dhanalakshmi K. Thiyagarajan; Hajira Basit; Rebecca Jeanmonod, Physiology, Menstrual Cycle(2022)
27. Vaishali B. Popat, Tamara Prodanov, Karim A. Calis, Lawrence M. Nelson, the Menstrual Cycle A Biological Marker of General Health in Adolescents (2008)
28. <https://teachmeobgyn.com/gynaecology/menstrual/oligomenorrhoea>
29. Beverly G Reed, MD and Bruce R Carr, MD The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation (2018).
30. Dhanalakshmi K. Thiyagarajan; Hajira Basit; Rebecca Jeanmonod, Physiology, Menstrual Cycle (2022).
31. Barbieri L Robert . The Endocrinology of the Menstrual Cycle. Br. Med . j. 1 , 66 (2014).
32. <https://www.britannica.com/science/menstrual-cycle>.
33. Diagnosis and Management of Infertility A Review ,Sandra Ann Carson, MD and Amanda N. Kallen, MD (2022)
34. Inhorn M., Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. 2015.Human Reproduction Update, Vol.21, No.4 pp. 411-426.
35. Alexa A Nardelli, Tania Stafinski, Tarek Motan, Kristin Klein, Devidas Menon, Assisted reproductive technologies (ARTs): Evaluation of evidence to support public policy development (2014).
36. Marian Szamatowicz, Jacek Szamatowicz Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility ELSEVIER Volume 65, Issue 1, March 2020.
37. Andrej Starc, Manca Trampuš, Doroteja Pavan Jukić, Cecilija Rotim, Tomislav Jukić and Ana Polona Mivšek INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW Acta Clin Croat. 2019 Sep; 58(3): 508–515.
38. Sandra Ann Carson, MD and Amanda N. Kallen, MD Diagnosis and Management of Infertility JAMA. Author manuscript; available in PMC 2022 Jul 21. Published in final edited form as: JAMA. 2021 Jul 6; 326(1): 65–76.
39. Natalie M Crawford, Anne Z Steiner Age-related infertility Obstet Gynecol Clin North Am. 2015 Mar;42(1):15-25.

40. F.J. Broekmans, M.R. Soules, B.C Fouser, Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences, *Endocrine Reviews*, Volume 30, Issue 5, 1 August 2009, Pages 465–493
41. Aleksandra V. Moiseeva, Varvara A. Kudryavtseva, Vladimir N. Nikolenko, Marine M. Gevorgyan, Ara L. Unanyan, Anastassia A. Bakhmet, and Mikhail Y. Sinelnikov Genetic determination of the ovarian reserve: a literature review *J Ovarian Res.* 2021; 14: 102.
42. Julie Collée, Marie Mawet, Linda Tebache, Michelle Nisolle & Géraldine Brichant, Polycystic ovarian syndrome and infertility: overview and insights of the putative treatments, Pages 869-874 | Received 16 Dec 2020, Accepted 18 Jul 2021, Published online: 02 Aug 2021.
43. Ajmal N, Khan SZ. Shaikh R. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition A review article, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* X (2019).
44. Ndefo, U.A., Eaton, A. & Green, M.R Polycystic ovary syndrome: A review of treatment options with a focus on pharmacological approaches. *P T* 38,336-355(2013).
45. Seema Patel, Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 182, September 2018, Pages 27-36
46. Yalan Xu and Jie Qiao, Association of Insulin Resistance and Elevated Androgen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature, Published online 2022 Mar 21. doi: [10.1155/2022/9240569](https://doi.org/10.1155/2022/9240569).
47. Selma Feldman Witchel, Sharon E Oberfield, and Alexia S Peña, Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment with Emphasis on Adolescent Girls, Published online 2019 Jun 14. doi: [10.1210/js.2019-00078](https://doi.org/10.1210/js.2019-00078).
48. <https://www.news-medical.net/health/Polycystic-Ovary-Syndrome-%28PCOS%29-Irregular-Function-of-Ovaries.aspx>.
49. Marian Szamatowicz, Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations, *Ginekol Pol* 2016;87(12):820-823. doi: 10.5603/GP.2016.0095.
50. Adam H Balen, 1 Anthony J Rutherford1. Management of infertility. *Hong Kong Pract.* 25, 249-261 (2007)
51. Christian De Geyter Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Volume 33, Issue 1, February 2019, Pages 3-8.
52. Zhao Y, Brezina P. et al. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Sep;1810 (9):843-52.
53. Esteves, S.C., Roque, M., et al. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nature Reviews Urology.* 2018.
54. Gilson, Hilary, "Gamete Intra-Fallopian Transfer (GIFT)". *Embryo Project Encyclopedia* (2008-09-26). ISSN: 1940-5030.
55. Begum, M.R. Assisted Reproductive Technology: Techniques and Limitations. *J. Bangladesh Coll. Physicians Surg.* 26, 135-141 (1970).
56. https://www.babycenter.com/getting-pregnant/fertility/fertility-treatment-in-vitro-fertilization-ivf_4094.

57. Esteves, S.C., Roque, M., et al. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nature Reviews Urology*. 2018
58. <https://www.eugonia.com.gr>
59. Glujovsky D, Farquhar C. et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; (6):CD002118.
60. <https://www.invitra.com/en/ovulation-induction-in-ivf/>
61. Baka S, Malamitsi-Puchner A, Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):500- 6
62. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G, Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9(3):251-62.
63. Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K, Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008;13(9):1065-87.
64. Pelland AM, Corbett HE, Baltz JM. Amino Acid transport mechanisms in mouse oocytes during growth and meiotic maturation. *Biol Reprod*. (2009).
65. Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmarajan AM, Rodgers RJ, 2004 Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod* 71:1071–1078.
66. Laís Basuino, Carolina F Silveira Jr, Human follicular fluid and effects on reproduction, *JBRA Assist Reprod* 2016 Mar 1;20(1):38-40. doi: 10.5935/1518-0557.20160009.
67. Alberto Revelli, Luisa Delle Piane, Simona Casano, Emanuela Molinari, Marco Massobrio, and Paolo Rinaudo, Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics, *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:40 doi:10.1186/1477-7827-7-40.
68. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J: Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002, 17:1017-1022.
69. Fried G, Remaeus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, Tally M: Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyper-stimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003, 20:167-176.
70. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF: High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryo-onic development. *Hum Reprod* 2007, 22:1526-1531.
71. Wang TH, Chang CL, Wu HM, Chiu YM, Chen CK, Wang HS: Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3(IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril* 2006;86:1392-1401.
72. Daniel A. Dumesic, M.D., David R. Meldrum, M.D., Mandy G. Katz-Jaffe, Ph.D. Rebecca L. Krisher, Ph.D., William B. Schoolcraft, M.D Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015;103:303–16. 2015 by American Society for Reproductive Medicine.

73. Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG: Super-oxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999, 72:1027-1034.
74. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D: Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995, 236:173-180.
75. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P: Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003, 18:2270-2274
76. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D: Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995, 236:173-180.
77. Patrizia Monteleone, Paolo Giovanni Artini, Giovanna Simi, Elena Casarosa, Vito Cela & Andrea R. Genazzani, Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF, Received: 7 January 2008 / Accepted: 29 March 2008 / Published online: 1 May 2008 Springer Science + Business Media, LLC 2008.
78. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR: Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2008, 25:183-186.
79. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR: Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2008, 25:183-186.
80. Høst E, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Smidt-Jensen S: Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000, 79:936-940.
81. Mercé LT, Bau S, Barco MJ, Troyano J, Gay R, Sotos F, Villa A: Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG Day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006, 21:1218-1226.
82. Gogsen Onalan , Belgin Selam , Reside Onalan , Temel Ceyhan , Mehmet Cincik , Recai Pabuccu, Serum and follicular fluid levels of soluble Fas and soluble Fas ligand in IVF cycles, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 125 (2006) 85–91.
83. Sarandakou A, Malamitsi-Puchner A, Baka S, Rizos D, Hassiakos D, Creatsas G: Apoptosis and proliferation factors in serum and follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003, 79:634-636.
84. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka S, Vrachnis N, Kouskouni E, Hassiakos D: Soluble Fas concentrations in the follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity, fertilization, and embryo quality. *J Soc Gynecol Invest* 2004, 11:566-569.

85. José de los Santos M, Anderson DJ, Racowsky C, Hill JA: Presence of Fas-Fas ligand system and Bcl-2 gene products in cells and fluids from gonadotropin-stimulated human ovaries. *Biol Reprod* 2000, 63:1811-1816.
86. Nandedkar TD, Shahid JK, Mehta R, Moodbidri SB, Hegde UC, Hinduja IN: Localization and detection of ovarian follicular fluid protein in follicles of human ovaries. *Indian J Exp Biol* 1992, 30:271-275.
87. Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW: Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006, 21:2960-2968.
88. Ohta N, Saito H, Kaneko T, Yoshida M, Takahashi T, Saito T, Nakahara K, Hiroi M: Soluble CD44 in human ovarian follicular fluid. *J Assist Reprod Genet* 2001, 18:21-25.
89. Tsai EM, Yang CH, Chen SC, Liu YH, Chen HS, Hsu SC, Lee JN: Leptin affects pregnancy outcome of in vitro fertilization and steroidogenesis of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2002, 19:169-176.
90. Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, Bersinger NA: Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2005, 22:257-264.
91. Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A: Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. *Ginekol Pol* 2003, 74:1392-1396.
92. Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, Wildhagen MF, Martini E, Steegers EA, Macklon NS: Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2008, 23:2570-2576.
93. Yanaihara A, Mitsukawa K, Iwasaki S, Otsuki K, Kawamura T, Okai T: High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2007, 87:279-282.
94. Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Saito T, Hiroi M: Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil Steril* 2000, 74:1148-1152.
95. Chiu TT, Rogers MS, Law EL, Briton-Jones CM, Cheung LP, Haines CJ: Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Hum Reprod* 2002, 17:1591-1596.
96. Thomas N, Goodacre R, Timmins EM, Gaudoin M, Fleming R: Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles. *Hum Reprod* 2000, 15:1667-1671.
97. Scott L, Berntsen J, Davies D, Gundersen J, Hill J, Ramsing N: Human oocyte respiration rate measurement – potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online* 2008, 17:461-469.
98. Timothy Bracewell-Milnes, Srdjan Saso, Hossam Abdalla, Dimitrios Nikolau, Julian Norman-Taylor, Mark Johnson, Elaine Holmes and Meen-Yau Thum, Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review . *Human Reproduction Update*, Vol.23, No.6 pp. 723–736, 2017.

99. R.B Gilchrist , L.J Ritter D.T Armstrong ,Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals Animal Reproduction Science Volumes 82–83, July 2004, Pages 431-446
100. Daniel A. Dumesic, M.D., David R. Meldrum, M.D., Mandy G. Katz-Jaffe, Ph.D., Rebecca L. Krisher, Ph.D., William B. Schoolcraft, M.D Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health, Fertil Steril 2015;103:303–16. 2015 by American Society for Reproductive Medicine.
101. Qiang Wang, and Qing-Yuan Sun, Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors, Reproduction, Fertility and Development, 2007, 19, 1–12, www.publish.csiro.au/journals/rfd.
102. Hussein, M.R. Apoptosis in the ovary: Molecular mechanisms. Human Reproduction Update vol.11 161-177(2005).
103. Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. Mol Hum Reprod 2014;20:15–30.
104. <https://bioquochem.com/ponceau-s-staining-solution>
105. Aleksandra Z Stojanovic Gavrilovic , Jelena M Cekovic , Aida Z Parandilovic , Aleksandar B Nikolov , Predrag S Sazdanovic , Aleksandra M Velickovic , Marija V Andjelkovic , Marija P Sorak, IL-6 of follicular fluid and outcome of in vitro fertilization , Medicine (Baltimore) 2022 Jul 22;101(29):e29624.
106. Reed,B. G. & Carr, B. R. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. Endotext (MDText.com, Inc.,2000).
107. Erickson, G. F., Wang, C. & Hsueh, A.J. W. FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium [19]. Nature vol. 279 336-338 (1979).
108. REED JC, ZHA H, AIME-SEMPE C, TAKAYAMA S, WANG HG. Structure- function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of pro-programmed cell death. Adv Exp Med Biol 1996, 406:99-112.
109. KORSMEYER SJ, SHUTTER JR, VEIS DJ, MERRY DE, OLTVAI DE. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death.Semin Cancer Biol 1993, 4:327- 332.
110. Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., and Scorilas, A., 2012, The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. Adv Hematol., 2012, 524308.
111. Andrea Margi, Simona Reina, Vito De Pinto VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis Front. Chem., 06 April 2018 Sec. Chemical Biology
112. Joyce T. Varughese, Susan K. Buchanan, and Ashley S. Pitt The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease , Cells. 2021 Jul; 10(7): 1737
113. Lara Gibellini, Anna De Gaetan, Mauro Mandrioli, Elia Van Tongeren, Carlo Augusto Bortolotti, Andrea Cossarizza, Marcello Pinti The biology of Lonp1: More than a mitochondrial protease, Int Rev Cell Mol Biol 2020:354:1-61.

114. Xiaoqiang Sheng, Chuanming Liu, Guijun Yan, Guangyu Li, Jingyu Liu, Yanjun Yang, Shiyuan Li, Zhongxun Li, Jidong Zhou, Xin Zhen, Yang Zhang, Zhenyu Diao, Yali Hu, Chuanhai Fu, Bin Yao, Chaojun Li, Yu Cao, Bin Lu, Zhongzhou Yang, Yingying Qin, Haixiang Sun, Lijun Ding The mitochondrial protease LONP1 maintains oocyte development and survival by suppressing nuclear translocation of AIFM1 in mammals, EBioMedicine. 2022 Jan; 75: 103790