



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ,
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ**

ΛΑΜΠΡΟΣ ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
MSc ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

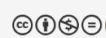
**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ,
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ**

ΛΑΜΠΡΟΣ ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
MSc ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives4.0 International

 CC BY-NC-ND 4.0

**Attribution-NonCommercial-
NoDerivatives 4.0 International**

Legal Code

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπανδρέου Λάμπρου: 06-12-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 855/15-05-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής - Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μιχαηλίδης Θεολόγος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-06-2018

«Μελέτη παραγόντων γήρανσης των ωοθηκών σε γυναίκες με ανεπαρκή απάντηση σε πρωτόκολλα διέγερσης ωοθυλακίων»

Τροποποίηση τίτλου θέματος διδακτορικής διατριβής: Γ.Σ. αριθμ. 1043α/14-02-2023

«Ανάπτυξη πρότυπης μεθόδου απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων από ωοθυλακικό υγρό μετά από διέγερση των ωοθυλακίων με χρήση μαγνητικών νανοϋλικών»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1144α/31-01-2025

1. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μαραγκός Πέτρος, Καθηγητής Αναπτυξιακής & Αναπαραγωγικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Σκέντου Χαρίκλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 10-04-2025

Ιωάννινα 13-05-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Αικατερίνη Λαγού

Αφιερώνω αυτή την διατριβή στα παιδιά μου

Πηνελόπη Μαρία, Σπυρίδωνα Ιάσονα, Πασχάλη Φαίδωνα, Δημήτρη Τηλέμαχο

Στη σύζυγό μου Αλεξάνδρα και στους εκλιπόντες γονείς μου και αδελφό.

Πρόλογος

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή αποτελεί έναν από τους πιο δυναμικούς τομείς ανάπτυξης της σύγχρονης ιατρικής, προσφέροντας ελπίδα σε ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα γονιμότητας. Στο επίκεντρο αυτών των τεχνολογιών βρίσκεται η κατανόηση και η βελτιστοποίηση των βιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην ωρίμανση και τη λειτουργία των ωοκυττάρων. Τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells), ως βασικό συστατικό των ωοθυλακίων, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής φυσιολογίας, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, τη σύνθεση στεροειδών ορμονών και τη διαδικασία της ωορρηξίας. Η απομόνωση και η μελέτη αυτών των κυττάρων δεν είναι μόνο θεμελιώδης για την έρευνα, αλλά και απαραίτητη για την ανάπτυξη προηγμένων κλινικών εφαρμογών, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και η διαγνωστική αξιολόγηση της ωοθηκικής εφεδρείας.

Ωστόσο, οι υπάρχουσες μέθοδοι απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό συναντούν περιορισμούς σε απόδοση, καθαρότητα και βιωσιμότητα των κυττάρων. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, όπως η χρήση μαγνητικών νανοϋλικών, προσφέρει μια επαναστατική προσέγγιση, επιτρέποντας επιλεκτικότερη και λιγότερο επεμβατική απομόνωση. Η εφαρμογή νανοσωματιδίων μαγνητίτη (Fe_3O_4) με λειτουργικοποίηση υαλουργικού οξέος (HA) αναδεικνύεται ως υποσχόμενη στρατηγική, συνδυάζοντας υψηλή αποτελεσματικότητα με ελάχιστη κυτταρική τοξικότητα. Η μελέτη αυτή στοχεύει τόσο στη ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας πρότυπης μεθόδου απομόνωσης, όσο και στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ νανοϋλικών και βιολογικών συστημάτων, με στόχο τη δημιουργία έναν νέου εργαλείου για την αναπαραγωγική ιατρική.

Η παρούσα διατριβή οργανώνεται σε έξι κύρια κεφάλαια. Στην **Εισαγωγή** παρουσιάζεται η βιολογική σημασία των κοκκωδών κυττάρων, τους παράγοντες υπογονιμότητας και τις προκλήσεις στην τρέχουσα διαγνωστική και θεραπευτική πρακτική. Ακολουθεί ανάλυση των νανοϋλικών και των εφαρμογών τους στη βιοϊατρική, με έμφαση στα μαγνητικά νανοσωματίδια. Το **Πειραματικό Μέρος** περιγράφει λεπτομερώς τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των νανοϋλικών, καθώς και τις διαδικασίες απομόνωσης και αξιολόγησης

των κυττάρων. Τα **Αποτελέσματα** και η **Συζήτηση** αναδεικνύουν τη βελτιστοποίηση της μεθόδους, την εκλεκτική δέσμευση των κυττάρων και τη σύγκριση με υφιστάμενες τεχνικές. Τα **Συμπεράσματα** ενισχύουν τη σημασία της έρευνας για τη βιολογία της αναπαραγωγής και τις πιθανές κλινικές εφαρμογές.

Μέσα από αυτή την εργασία, επιδιώκεται η προώθηση της επιστημονικής γνώσης και της ανάπτυξης καινοτόμων λύσεων που θα ενισχύσουν τις δυνατότητες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας σε βιολογικά συστήματα ανοίγει νέους ορίζοντες, προσφέροντας εργαλεία για διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις ακριβείας. Με αυτό το πνεύμα, η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα βήμα προς την κατεύθυνση της ιατρικής ακριβείας της εξατομικευμένης ιατρικής και της βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς επιτροπής: Τ Τον κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο, επιβλέποντα της διατριβής και προσφάτως ομότιμο καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την αμέριστη υποστήριξή του, την εμπιστοσύνη και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας. Τον κ. Γεωργίου Ιωάννη, καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Ιατρικής Σχολής, καθώς και Κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη καθοδήγησή του. Τον κ. Μιχαηλίδη Θεολόγο, καθηγητή Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών (ΒΕΤ), για την επιστημονική του συμβολή στη μελέτη αυτή. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Τον κ. Μαραγκό Πέτρο, καθηγητή Αναπαραγωγικής Βιολογίας και Πρόεδρο του Τμήματος ΒΕΤ, για τη διαρκή υποστήριξή του και την εμπιστοσύνη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Τον κύριο Βλεσσίδα Αθανάσιο καθηγητή Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κυρία Σκέντου Χαρίκλεια επίκουρη καθηγήτρια ιατρικής της Μ/Γ του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και φυσικά τον κύριο Σταλικά Κωνσταντίνο Καθηγητή Αναλυτικής χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθεια την εμπιστοσύνη που με περιέλαβε καθώς και την καθοδήγηση και τους πόρους που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να παραλείψω και τον κύριο Χατζημητάκο Θεόδωρο μεταδιδακτορικό ερευνητή για την αδιάκοπη βοήθεια και την υποδειγματική συνεργασία που μου πρόσφερε κυρίως στο τεχνικό μέρος της σύνθεσης και του χαρακτηρισμού του νανοϋλικού. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Κασούνη Αθανασία, βιολόγο, για την άριστη συνεργασία της, ιδιαίτερα στην καλλιέργεια των κυττάρων.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Βαρθολομάτο Γεώργιο βιοχημικό επιστημονικά υπεύθυνο του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και κυτταρομετρίας ροής για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου πρόσφερε και την κυρία Χατζή Ελισάβετ βιολόγο της ΜΥΑ για την βοήθεια που μου προσέφερε.

Για μένα αυτή η πορεία ανέδειξε δύο πράγματα πρώτον και το πιο πολύτιμο, πως όπως στη ζωή έτσι και στην επιστημονική μάχη και αναζήτηση οι φίλοι στέκονται όρθιοι δίπλα σου και το δεύτερο είναι αυτό που αποδεικνύει το λατινικό ρητό η νίκη αγαπά την προετοιμασία “ *Amat Victoria Curam* ”.

Σας ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια όλους και πάλι.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	1
Πίνακας περιεχομένων	5
1. Εισαγωγή	15
1.1 Υπογονιμότητα	15
1.1.1. Ορισμός και Ταξινόμηση της Υπογονιμότητας	15
1.1.2. Παράγοντες Υπογονιμότητας	18
1.1.2.1 Γυναικείος παράγοντας Υπογονιμότητας	18
1.1.2.2 Ανδρικός Παράγοντας Υπογονιμότητας	23
1.1.2.3 Γενετικοί Παράγοντες Υπογονιμότητας	26
1.1.2.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες Υπογονιμότητας	29
1.1.2.5 Ιδιοπαθής Υπογονιμότητα	32
1.1.3. Αξιολόγηση υπογονιμότητας – Η προσέγγιση του υπογόνιμου ζευγαριού	35
1.1.3.1. Κλινική και εργαστηριακή προσέγγιση.....	37
1.1.3.2. Εκτίμηση της λειτουργικότητας των ανατομικών στοιχείων της γυναίκας	40
1.1.3.3. Εκτίμηση της Λειτουργικότητας των Ανατομικών Στοιχείων του Άνδρα	43
1.1.4. Αντιμετώπιση της Υπογονιμότητας	46
1.1.4.1. Τροποποίηση του τρόπου ζωής και συντηρητικές παρεμβάσεις	46
1.1.4.2. Φαρμακευτική αντιμετώπιση	48
1.1.4.3. Χειρουργική αντιμετώπιση	51
1.1.4.4. Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής	54
1.1.5. Η διερεύνηση της γυναικείας υπογονιμότητας	58
1.2 Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά των κοκκωδών κυττάρων	59
1.2.1 Ιστορική αναδρομή της μελέτης των κοκκωδών κυττάρων.....	59
1.2.2 Σημασία των Κοκκωδών Κυττάρων στη Φυσιολογία του Θηλυκού Αναπαραγωγικού Συστήματος	61
1.2.2.1. Υποστήριξη της Ανάπτυξης και Ωρίμανσης των Ωοκυττάρων.....	62
1.2.2.2. Παραγωγή και Ρύθμιση Στεροειδών Ορμονών	63
1.2.2.3. Ρύθμιση της Ωορρηξίας	63
1.2.2.4. Συμβολή στον Σχηματισμό και τη Διατήρηση του Ωχρού Σώματος.....	64
1.2.2.5. Δείκτης Ποιότητας των Ωοκυττάρων	65
1.2.3 Βιολογικός ρόλος και λειτουργία κοκκωδών κυττάρων	65
1.2.3.1 Συμμετοχή των Κοκκωδών Κυττάρων στη Στήριξη και Ανάπτυξη του Ωοκυττάρου... 65	
1.2.3.2 Ενδοκρινικός και Παρακρινικός Ρόλος των Κοκκωδών Κυττάρων (Παραγωγή Ορμονών και Αυξητικών Παραγόντων)	67

1.2.3.3 Διαφοροποίηση και Μοριακοί Μηχανισμοί Ρύθμισης των Κοκκωδών Κυττάρων	68
1.2.4 Κοκκώδη Κύτταρα και Ωοθυλακική Ανάπτυξη.....	69
1.2.4.1 Ρόλος των Κοκκωδών Κυττάρων στα Διάφορα Στάδια της Ανάπτυξης του Ωοθυλακίου	69
1.2.4.2 Αλληλεπιδράσεις με τα Θυλακικά Κύτταρα και το Ωοκύτταρο	70
1.2.4.3 Ρυθμιστικοί Μηχανισμοί (FSH, LH, Αυξητικοί Παράγοντες)	71
1.2.5 Μεταβολικές και Μοριακές Ιδιότητες των Κοκκωδών Κυττάρων	72
1.2.5.1 Ενεργειακός μεταβολισμός και υποστήριξη του ωοκυττάρου	72
1.2.5.2 Γονιδιακή έκφραση και μοριακοί δείκτες	73
1.2.5.3 Σημαντικές πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μονοπάτια	74
1.2.6 Διαδικασία Διαφοροποίησης και Ενεργοποίησης των Προκοκκωδών Κυττάρων στην Ανάπτυξη των Ωοθυλακίων και τη Λειτουργία των Ωοθικών.....	75
1.2.6.1 Εμβρυονικοί Προγεννήτορες	75
1.2.6.2 Κυτταροκίνηση των Ωοθυλακίων	76
1.2.6.3 Ενεργοποίηση Ανεξάρτητη από Γοναδοτροπίνες & Ενεργοποίηση της Ανάπτυξης....	76
1.2.6.4 Πολλαπλασιασμός στο Προαντρικό Στάδιο	77
1.2.6.5 Διαφοροποίηση στο Προωρηκτικό Στάδιο	77
1.2.6.6 Ωοφόρα Κύτταρα και Στεροειδογένεση	77
1.2.6.7 Ωορρηξία και Τελική Διαφοροποίηση: Ωχρινοποίηση.....	78
1.2.6.8 Γήρανση των Κοκκωδών Κυττάρων	78
1.2.7 Σημασία των κοκκωδών κυττάρων στην αναπαραγωγική ιατρική.....	78
1.2.7.1 Ρόλος τους στην ποιότητα του ωοκυττάρου και στη γονιμοποίηση	79
1.2.7.2 Συσχέτιση με τη γυναικεία γονιμότητα και τη θεραπεία υπογονιμότητας	80
1.2.7.3 Δυνατότητες Εφαρμογών στη Βιοϊατρική και στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	81
1.2.8 Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις για τη Μελέτη των Κοκκωδών Κυττάρων	82
1.2.8.1 Κυτταρολογικές και ιστολογικές μέθοδοι	82
1.2.8.2 Γονιδιακή Ανάλυση και Ανάλυση Έκφρασης Γονιδίων.....	84
1.2.8.3 Ανάλυση Προφίλ Πρωτεϊνών και Πρωτεομική Ανάλυση	87
1.2.8.4 Κυτταρική καλλιέργεια και Πειράματα Κινητικότητας και Πολλαπλασιασμού.....	90
1.2.8.5 Ανάλυση Ενδοκρινικής Δραστηριότητας και Σηματοδοτικών Μονοπατιών.....	93
1.2.9 Τεχνικές απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων	96
1.2.9.1 Μηχανική Απομόνωση (Mechanical Isolation).....	96
1.2.9.2 Ενζυμική Απομόνωση	98
1.2.9.3 Ανάλυση με FACS.....	101
1.2.9.4 Μαγνητική απομόνωση	105

1.3 Νανοϋλικά	108
1.3.1 Χαρακτηριστικά νανοϋλικών.....	109
1.3.1 Διαχωρισμός νανοϋλικών με βάση το μέγεθος	112
1.3.2 Μαγνητικά νανοϋλικά	114
1.3.3 Εφαρμογές νανοϋλικών και μαγνητικών νανοϋλικών	116
1.3.4 Νανოსωματίδια μαγνητίτη	120
2. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	125
3. Πειραματικό μέρος.....	127
3.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες	127
3.2 Υλικά και εξοπλισμός	128
3.3 Πειραματικές πορείες	129
3.3.1. Σύνθεση μαγνητικών νανოსωματιδίων Fe_3O_4	129
3.3.2 Επικάλυψη μαγνητικών νανοςωματιδίων με SiO_2	129
3.3.3 Λειτουργικοποίηση νανοςωματιδίων με υαλουρονικό οξύ (HA).....	130
3.3.5 Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων	130
3.3.6 Διαδικασία απομόνωσης κυττάρων.....	131
3.3.7 Καταμέτρηση απομονωμένων κυττάρων	132
3.3.8 Καλλιέργεια κυττάρων	133
3.3.9 Βιωσιμότητα κυττάρων	133
3.3.10 Μέθοδος απομόνωσης λευκών και ερυθρών κυττάρων.....	134
3.3.11 Μέθοδος απομόνωσης κυττάρων με φικόλη.	135
3.3.12 Μέθοδος απομόνωσης κυττάρων με FACS.....	136
3.3.13 Στατιστική ανάλυση.....	136
4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	139
4.1 Χαρακτηρισμός νανοςωματιδίων	139
4.1.1. Χαρακτηρισμός των νανοϋλικών μέσω FTIR.....	139
4.1.2. Χαρακτηρισμός του μεγέθους και του φορτίου των νανοϋλικών με DLS	143
4.2 Βελτιστοποίηση μεθόδου απομόνωσης GCs	145
4.2.1 Βελτιστοποίηση φυγοκέντρησης και εκπλύσεων	145
4.2.2 Βελτιστοποίηση μοριακού βάρους HA	147
4.2.3 Βελτιστοποίηση ποσότητας νανοϋλικών	150
4.2.4 Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης	152
4.2.5 Βελτιστοποίηση έντασης μαγνητικού πεδίου.....	154
4.2.6 Βελτιστοποίηση ποσότητας και χρόνου επώασης με υαλουρονιδάση	156
4.3 Μελέτη Εκλεκτικής δέσμησης κυττάρων	158

4.4 Μελέτη τοξικότητας νανοϋλικών.....	169
4.5 Μελέτη βιωσιμότητας απομονωμένων κυττάρων	172
4.6 Μελέτη μεταβολικής δραστηριότητας απομονωμένων κυττάρων.....	174
4.7 Επικύρωση της μεθόδου.....	176
4.8 Σύγκριση με υφιστάμενες μεθόδους.....	178
5. Συμπεράσματα	183
6. Περίληψη	187
7. Abstract.....	189
8. Βιβλιογραφία	191

Λίστα συντομογραφιών

- **ΠΟΥ (WHO)** – Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization)
- **PCOS** – Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome)
- **GnRH** – Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone)
- **POI** – Πρώιμη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (Primary Ovarian Insufficiency)
- **IVF** – Εξωσωματική γονιμοποίηση (In Vitro Fertilization)
- **LH** – Ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone)
- **FSH** – Θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle-Stimulating Hormone)
- **BPA** – Βισφενόλη Α (Bisphenol A)
- **PCBs** – Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated Biphenyls)
- **ART** – Θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technologies)
- **ΒΘΣ (BBT)** – Βασική θερμοκρασία του σώματος (Basal Body Temperature)
- **PID** – Φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (Pelvic Inflammatory Disease)
- **H&E** – Χρώση Αιματοξυλίνης & Ηωσίνης (Hematoxylin & Eosin)
- **FACS** – Τεχνική διαχωρισμού με κυτταρομετρία ροής (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
- **ΥΣΓ (HSG)** – Υστεροσαλπιγγογραφία (Hysterosalpingography)
- **FTIR** – Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
- **DLS** – Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering)
- **MTT** – Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT assay)
- **HA** – Υαλουρονικό οξύ (Hyaluronic Acid)
- **Fe₃O₄** – Οξείδιο του σιδήρου (Magnetite)
- **SiO₂** – Διοξείδιο του πυριτίου (Silicon Dioxide)

- **PBS** – Φωσφορικά ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα (Phosphate-Buffered Saline)
- **RPMI-1640** – Καλλιεργητικό μέσο κυττάρων (Roswell Park Memorial Institute Medium)
- **DMEM** – Καλλιεργητικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **ICSI** – Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (Intracytoplasmic Sperm Injection)
- **IUI** – Ενδομήτρια σπερματέγχυση (Intrauterine Insemination)
- **TESE** – Εξαγωγή σπερματοζωαρίων από τους όρχεις (Testicular Sperm Extraction)
- **CFTR** – Ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
- **AIS** – Σύνδρομο θηλεοποιητικών όρχεων (Androgen Insensitivity Syndrome)
- **OHSS** – Σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (Ovarian Hyperstimulation Syndrome)
- **CTAB** – Βρωμιούχο εξαδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (Cetyltrimethylammonium Bromide)
- **TEOS** – Τετρααιθοξυσιλάνιο (Tetraethyl Orthosilicate)
- **DDW** – Δις-απεσταγμένο ύδωρ (Double-Distilled Water)
- **GCs** - Κοκκώδη κύτταρα (Granulosa cells)
- **hMG** – Ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (Human Menopausal Gonadotropin)
- **hCG** – Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (Human Chorionic Gonadotropin)
- **HSG** – Υστεροσαλπιγγογραφία (Hysterosalpingography)
- **MRI** – Μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging)
- **Cx37** – Κοννεξίνη 37 (Connexin 37)
- **Cx43** – Κοννεξίνη 43 (Connexin 43)
- **cAMP** – Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Cyclic Adenosine Monophosphate)
- **EDTA** – Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

- **FBS** – Εμβρυϊκός βοοειδής ορός (Fetal Bovine Serum)
- **CO₂** – Διοξείδιο του άνθρακα (Carbon Dioxide)
- **rpm** – Στροφές ανά λεπτό (Revolutions Per Minute)
- **IU/mL** – Διεθνείς Μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (International Units per Milliliter)
- **AMH** – Αντιμυλλέριος ορμόνη (Anti-Müllerian Hormone)
- **E2** – Οιστραδιόλη (Estradiol)
- **P4** – Προγεστερόνη (Progesterone)
- **ROS** – Αντιδραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
- **TUNEL** – Τεχνική ανίχνευσης αποπτωτικού DNA κατακερματισμού (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
- **OS** – Οξειδωτικό στρες (Oxidative Stress)
- **HRT** – Ορμονική θεραπεία υποκατάστασης (Hormone Replacement Therapy)
- **TGF-β** – Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας βήτα (Transforming Growth Factor-beta)
- **IGF** – Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (Insulin-like Growth Factor)
- **VEGF** – Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor)
- **ERK** – Μιτογόνο-ενεργοποιούμενη κινάση (Extracellular signal-regulated kinase)
- **JNK** – c-Jun N-τερματική κινάση (c-Jun N-terminal kinase)
- **MAPK** – Μιτογόνο-ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση (Mitogen-Activated Protein Kinase)
- **NF-κB** – Πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- **SOD** – Υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase)
- **CAT** – Καταλάση (Catalase)
- **GPx** – Γλουταθειόνη υπεροξειδάση (Glutathione Peroxidase)

- **PGT** – Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος (Preimplantation Genetic Testing)
- **BrdU** – Βρωμοδεοξουριδίνη (Bromodeoxyuridine)
- **Ki67** – Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67 Proliferation Marker)
- **PI3K-Akt** – Σηματοδοτικό μονοπάτι φωσφατιδυλινοσιτολικής κινάσης-Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway)
- **TGF- α** – Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας α (Transforming Growth Factor- α)
- **mTOR** – Στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (Mammalian Target of Rapamycin)
- **IL-6** – Ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6)
- **TNF- α** – Παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (Tumor Necrosis Factor- α)
- **AP-1** – Ενεργοποιητικός παράγοντας-1 (Activator Protein-1)
- **SOX9** – Μεταγραφικός παράγοντας SOX9 (SRY-Box Transcription Factor 9)
- **OCT4** – Οκταμεροδεσμευτικός μεταγραφικός παράγοντας 4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4)
- **GDF9** – Αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 9 (Growth Differentiation Factor 9)
- **BMP15** – Πρωτεΐνη μορφογένεσης οστού 15 (Bone Morphogenetic Protein 15)
- **LIF** – Παράγοντας αναστολής λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor)
- **DHEA** – Δεϋδροεπιανδροστερόνη (Dehydroepiandrosterone)
- **HSD3B** – 3 β -υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase)
- **SRD5A** – 5 α -ρεδουκτάση (Steroid 5 α -Reductase)
- **CYP19A1** – Αρωματάση (Aromatase)
- **ER α /ER β** – Υποδοχείς οιστρογόνων α και β (Estrogen Receptor Alpha/Beta)
- **PR** – Υποδοχέας προγεστερόνης (Progesterone Receptor)
- **AR** – Ανδρογονικός υποδοχέας (Androgen Receptor)

- **CYP11A1** – Πλευρική αλυσίδα αποκοπής της χοληστερόλης (Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme)
- **STAR** – Ρυθμιστική πρωτεΐνη στεροειδογενετικού οξέος (Steroidogenic Acute Regulatory Protein)
- **HSD17B** – 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase)
- **SOX2** – Μεταγραφικός παράγοντας SOX2 (SRY-Box Transcription Factor 2)
- **CCND1** – Κυκλίνη D1 (Cyclin D1)
- **CDK4/CDK6** – Κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες 4 και 6 (Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6)
- **p53** – Πρωτεΐνη καταστολής όγκων p53 (Tumor Suppressor Protein p53)
- **Bcl-2** – Πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)
- **Bax** – Πρωτεΐνη Bax (Bcl-2-associated X protein)
- **Casp3** – Κασπάση 3 (Caspase 3)
- **Casp8** – Κασπάση 8 (Caspase 8)
- **Casp9** – Κασπάση 9 (Caspase 9)
- **COX-2** – Κυκλοοξυγενάση 2 (Cyclooxygenase 2)
- **PGE2** – Προσταγλανδίνη E2 (Prostaglandin E2)

1. Εισαγωγή

1.1 Υπογονιμότητα

Η υπογονιμότητα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής, με βαθιές κοινωνικές, ψυχολογικές και βιολογικές προεκτάσεις. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία επίτευξης κύησης μετά από τουλάχιστον 12 μήνες συστηματικών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφυλάξεις. Η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 10-15% των ζευγαριών παγκοσμίως, ενώ οι αιτιολογικοί της παράγοντες ποικίλλουν, περιλαμβάνοντας παράγοντες που σχετίζονται τόσο με τον άνδρα όσο και τη γυναίκα καθώς και περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας [1–3].

Η κατανόηση της υπογονιμότητας απαιτεί διεπιστημονική προσέγγιση αφού συνδέεται με διάφορους τομείς της ιατρικής, όπως η ενδοκρινολογία, η γενετική, η εμβρυολογία και η ανοσολογία. Παράλληλα, η κοινωνική και ψυχολογική διάσταση της υπογονιμότητας δεν μπορεί να παραλειφθεί, δεδομένου ότι επιφέρει σημαντικό ψυχολογικό φορτίο στους ασθενείς. Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι η παρουσίαση των βασικών παραμέτρων που διέπουν την υπογονιμότητα, η διερεύνηση των αιτιών της και οι σύγχρονες διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπισή της.

1.1.1. Ορισμός και Ταξινόμηση της Υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα όπως προαναφέρθηκε, ορίζεται ως η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης μετά από 12 μήνες τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη. Ο χρόνος αυτός μειώνεται στους 6 μήνες για γυναίκες ηλικίας άνω των 35 ετών, λόγω της προοδευτικής μείωσης της ωοθηκικής εφεδρείας. Ο ΠΟΥ διακρίνει την υπογονιμότητα από τη στειρότητα, η οποία αφορά τη μόνιμη και μη αναστρέψιμη αδυναμία σύλληψης. Αντίθετα, η υπογονιμότητα δεν αποκλείει την πιθανότητα επίτευξης εγκυμοσύνης, αλλά δηλώνει μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα που απαιτεί διερεύνηση και, ενδεχομένως, ιατρική παρέμβαση. Η υπογονιμότητα μπορεί να αφορά είτε το άτομο είτε το ζευγάρι. Σε

πολλές περιπτώσεις, τόσο ο ανδρικός όσο και ο γυναικείος παράγοντας συμβάλλουν στην αναπαραγωγική δυσλειτουργία, καθιστώντας την αξιολόγηση και των δύο μελών του ζευγαριού απαραίτητη για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση του προβλήματος [4].

Η υπογονιμότητα ταξινομείται με βάση διάφορα κριτήρια, όπως η χρονική της διάρκεια, η αιτιολογία της και η φύση των εμπλεκόμενων παραγόντων [5].

Με βάση τη χρονική διάρκεια, η υπογονιμότητα ταξινομείται σε:

- Πρωτοπαθής υπογονιμότητα: Αναφέρεται σε ζευγάρια που δεν έχουν επιτύχει ποτέ κύηση παρά τις τακτικές προσπάθειες.
- Δευτεροπαθής υπογονιμότητα: Αφορά ζευγάρια που έχουν επιτύχει τουλάχιστον μία κύηση στο παρελθόν (είτε οδήγησε σε γέννηση είτε σε αποβολή), αλλά αδυνατούν να συλλάβουν εκ νέου.

Η δευτεροπαθής υπογονιμότητα είναι εξίσου σημαντική με την πρωτοπαθή, καθώς μπορεί να οφείλεται σε νέα ή επιδεινούμενα αναπαραγωγικά προβλήματα, όπως ωθηκική γήρανση, ενδομητρίωση ή επιδείνωση των σπερματικών παραμέτρων.

Με βάση την αιτιολογία, η υπογονιμότητα ταξινομείται σε:

- Γυναικεία υπογονιμότητα: Προκαλείται από δυσλειτουργίες ή ανατομικές βλάβες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, όπως ωθηκικές, σαλπινγικές ή ενδομήτριες ανωμαλίες.
- Ανδρική υπογονιμότητα: Οφείλεται σε προβλήματα της σπερματογένεσης, της σπερματικής κινητικότητας ή των αναπαραγωγικών οργάνων του άνδρα.
- Μεικτή υπογονιμότητα: Εμφανίζεται όταν τόσο ο ανδρικός όσο και ο γυναικείος παράγοντας συμβάλλουν στην αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης.
- Ιδιοπαθής υπογονιμότητα: Περιλαμβάνει περιπτώσεις όπου δεν ανευρίσκεται προφανής αιτιολογικός παράγοντας, παρά τον πλήρη διαγνωστικό έλεγχο.

Με βάση τη φύση της διαταραχής, η υπογονιμότητα ταξινομείται σε [5]:

- Ωθηκική δυσλειτουργία: Η συνηθέστερη αιτία γυναικείας υπογονιμότητας, περιλαμβάνει διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) ή την πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια.

- Σαλπινγκική υπογονιμότητα: Αποφράξεις ή βλάβες στις σάλπιγγες, συχνά λόγω φλεγμονωδών λοιμώξεων ή ενδομητρίωσης, που εμποδίζουν τη φυσιολογική μεταφορά του ωαρίου και του γονιμοποιημένου εμβρύου.
- Ενδομήτριες ανωμαλίες: Περιλαμβάνουν συμφύσεις, πολύποδες, ινομώματα και ανωμαλίες της μήτρας που επηρεάζουν την εμφύτευση του εμβρύου.
- Ανοσολογική υπογονιμότητα: Η παρουσία αυτοαντισωμάτων που προσβάλλουν τα σπερματοζωάρια ή το ενδομήτριο δυσχεραίνει τη σύλληψη ή την εμφύτευση.
- Ενδοκρινολογικές διαταραχές: Ανισορροπίες σε ορμόνες όπως η FSH, LH, προλακτίνη και θυρεοειδικές ορμόνες, που επηρεάζουν τη γονιμότητα.
- Χρωμοσωμικές και γενετικές ανωμαλίες: Αφορά διαταραχές όπως το σύνδρομο Klinefelter στους άνδρες ή το σύνδρομο Turner στις γυναίκες, που επηρεάζουν τη φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία.

Με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία, η υπογονιμότητα ταξινομείται σε [5]:

- Υπογονιμότητα που ανταποκρίνεται σε συντηρητικές θεραπείες: Περιλαμβάνει περιπτώσεις που αντιμετωπίζονται με φαρμακευτική αγωγή ή απλές χειρουργικές επεμβάσεις.
- Υπογονιμότητα που απαιτεί υποβοηθούμενη αναπαραγωγή: Περιλαμβάνει περιπτώσεις που χρήζουν εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) ή (ICSI), ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI) ή άλλων προχωρημένων μεθόδων.

Πέραν των παραπάνω, διακρίνονται ορισμένες ιδιαίτερες περιπτώσεις υπογονιμότητας [6]:

1. Ηλικιακά εξαρτώμενη υπογονιμότητα

- Στις γυναίκες, η ωοθηκική εφεδρεία μειώνεται μετά τα 35 έτη, επηρεάζοντας τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα των ωαρίων.
- Στους άνδρες, η ηλικία συνδέεται με αυξημένα επίπεδα κατακερματισμού DNA σπέρματος και μειωμένη γονιμότητα.

2. Υπογονιμότητα ανεξήγητης αιτιολογίας (ιδιοπαθής)

- Περίπου το 10-15% των ζευγαριών με υπογονιμότητα δεν εμφανίζουν προφανή παθολογία.
- Εικάζεται ότι μικρομοριακές ανωμαλίες, γενετικές μεταλλάξεις ή δυσλειτουργίες στο ενδομήτριο και τη σπερματογένεση μπορεί να εμπλέκονται.

3. Δευτεροπαθής υπογονιμότητα λόγω επιπλοκών προηγούμενης εγκυμοσύνης

- Λοιμώξεις, αποβολές, επεμβάσεις στη μήτρα και μεταβολές στην ωοθηκική λειτουργία μπορεί να επηρεάσουν τη γονιμότητα μετέπειτα.

1.1.2. Παράγοντες Υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική κατάσταση που μπορεί να οφείλεται σε παθολογικές, περιβαλλοντικές, γενετικές ή ακόμη και ανεξήγητες αιτίες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιμότητα μπορούν να ταξινομηθούν σε γυναικείους, ανδρικούς, περιβαλλοντικούς, γενετικούς και ιδιοπαθείς.

1.1.2.1 Γυναικείος παράγοντας Υπογονιμότητας

Οι γυναικείος παράγοντας υπογονιμότητας σχετίζεται με δυσλειτουργίες των ωοθηκών, των σαλπίγγων, της μήτρας, του ενδομητρίου και του ενδοκρινικού συστήματος [7].

1.1.2.1.1 Ωοθηκικός Παράγοντας

Η φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών είναι απαραίτητη για τη γυναικεία γονιμότητα. Οι διαταραχές ωορρηξίας είναι από τις συχνότερες αιτίες γυναικείας υπογονιμότητας.

1. Διαταραχές Ωοθυλακιωρρηξίας

Η ανωοθυλακιωρρηξία, δηλαδή η απουσία ωορρηξίας, ευθύνεται για περίπου 25-30% των περιπτώσεων γυναικείας υπογονιμότητας. Μπορεί να είναι χρόνια ή παροδική και να οφείλεται σε διάφορες ενδοκρινικές διαταραχές.

➤ Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS)

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πιο συχνή αιτία χρόνιας ανωοθυλακιορρηξίας και χαρακτηρίζεται από:

- Υπερανδρογοναιμία (υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης και ανδροστενεδιόνης).
- Διαταραχές του κύκλου (ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια).
- Πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών στον υπέρηχο.

Το PCOS σχετίζεται επίσης με:

- Αντίσταση στην ινσουλίνη → οδηγεί σε υπερινσουλιναιμία, η οποία αυξάνει την παραγωγή ανδρογόνων από τις ωοθήκες, επιδεινώνοντας τη δυσλειτουργία της ωορρηξίας.
- Αυξημένη αναλογία LH/FSH → οδηγεί σε υπερπαραγωγή ανδρογόνων και ατελή ανάπτυξη των ωοθυλακίων.
- Χαμηλή ποιότητα ωαρίων και αυξημένο κίνδυνο αποβολών λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει:

- Αλλαγές στον τρόπο ζωής (απώλεια βάρους, διατροφή χαμηλή σε υδατάνθρακες).
- Μετφορμίνη για βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.
- Κιτρική κλομιφαίνη ή λετροζόλη για την πρόκληση ωορρηξίας.

➤ Υποθαλαμική Ανωοθυλακιορρηξία,

Η υποθαλαμική ανωοθυλακιορρηξία προκύπτει από μειωμένη έκκριση της GnRH (εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών) από τον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα FSH και LH.

Κύριες αιτίες:

- Χαμηλό σωματικό βάρος (BMI <18.5) ή έντονη απώλεια βάρους.
- Υπερβολική σωματική άσκηση (π.χ. σε αθλήτριες).
- Στρες (αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης καταστέλλουν την έκκριση GnRH).

Η θεραπεία περιλαμβάνει:

- Αύξηση θερμιδικής πρόσληψης και μείωση σωματικής δραστηριότητας.
- Χορήγηση γοναδοτροπινών (FSH/LH) για επαγωγή της ωορρηξίας.

➤ Πρώιμη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (POI)

Η POI χαρακτηρίζεται από εξάντληση των ωαρίων πριν από την ηλικία των 40 ετών.

Αίτια:

- Γενετικά (μεταλλάξεις FMR1, σύνδρομο Turner).
- Αυτοάνοσα νοσήματα (θυρεοειδίτιδα Hashimoto, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος).
- Χημειοθεραπεία/ακτινοθεραπεία.

Η θεραπεία περιλαμβάνει θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) για την πρόληψη οστεοπόρωσης και καρδιαγγειακών νοσημάτων.

2. Ωοθηκική Γήρανση και Χαμηλή Ωοθηκική Εφεδρεία

Μετά τα 35 έτη, η ποσότητα και η ποιότητα των ωαρίων μειώνονται σημαντικά. Επιπλέον, αύξηση της χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας των ωαρίων οδηγεί σε χαμηλότερα ποσοστά σύλληψης και υψηλότερα ποσοστά αποβολών [7].

1.1.2.1.2 Σαλπινγικοί παράγοντες

Οι σάλπιγγες παίζουν κρίσιμο ρόλο στη μεταφορά του ωαρίου και του γονιμοποιημένου εμβρύου. Η βλάβη ή απόφραξή τους μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα.

1. Φλεγμονώδεις Παθήσεις των Σαλπίγγων

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος αποτελούν βασικό παράγοντα κινδύνου για σαλπινγική υπογονιμότητα [5].

- Χλαμυδιακή λοίμωξη και γονόρροια προκαλούν πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID), οδηγώντας σε συμφύσεις και απόφραξη των σαλπίγγων.
- Φυματίωση των γεννητικών οργάνων μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των σαλπίγγων.
- Ενδομητρίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξωτερική συμπίεση ή απόφραξη των σαλπίγγων.
- Προηγούμενες γυναικολογικές επεμβάσεις αυξάνουν τον κίνδυνο σαλπινγικών βλαβών.

Θεραπεία:

- Λαπαροσκοπική αποκατάσταση των σαλπίγγων.
- In vitro fertilization (IVF) σε περιπτώσεις σοβαρών βλαβών.

2. Σαλπινγίτιδα και Υδροσάλπιγγες:

Φλεγμονές των σαλπίγγων μπορεί να προκαλέσουν υποκινητικότητα ή υδροσάλπιγγα. Η υδροσάλπιγγα είναι μια παθολογική συλλογή υγρού στις σάλπιγγες, που προκαλεί [5].

- Μειωμένη πιθανότητα εμφύτευσης λόγω φλεγμονωδών παραγόντων που επηρεάζουν το ενδομήτριο.
- Αυξημένο κίνδυνο αποβολών.

Θεραπεία:

- Αφαίρεση της πάσχουσας σάλπιγγας πριν από την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).

Γ. Ενδομητρικοί και Μητρικοί Παράγοντες

Το ενδομήτριο είναι ο ιστός που επενδύει το εσωτερικό της μήτρας και είναι απαραίτητο για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Διαταραχές του ενδομητρίου και της μήτρας μπορεί να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα [5].

1. Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδομητρικού ιστού εκτός μήτρας, κυρίως στις ωοθήκες, τις σάλπιγγες το περιτόναιο και αλλού.

Μηχανισμοί Υπογονιμότητας στην Ενδομητρίωση

- Δημιουργία συμφύσεων → Αποκλείουν τη φυσιολογική μεταφορά του ωαρίου.
- Φλεγμονώδεις μικροπεριβάλλον → Αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών (IL-6, TNF-α) καταστέλλουν τη γονιμοποίηση και την εμφύτευση.
- Επηρεασμένη ποιότητα ωαρίων → Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε βλάβες του DNA των ωαρίων.
- Ανοσολογικές διαταραχές → Ανώμαλη ενεργοποίηση φυσικών φονικών κυττάρων (NK cells) που επηρεάζουν την εμφύτευση.

Θεραπευτική Αντιμετώπιση

- Χειρουργική αφαίρεση εστιών ενδομητρίωσης (λαπαροσκόπηση) για βελτίωση της γονιμότητας.
- Ορμονική θεραπεία (αγωνιστές GnRH, προγεστερόνη) για μείωση της φλεγμονής.
- IVF σε σοβαρές περιπτώσεις.

2. Πολύποδες Ενδομητρίου

Οι πολύποδες είναι υπερπλαστικές βλάβες του ενδομητρίου που μπορεί να εμποδίζουν την εμφύτευση [5].

- Κλινική εικόνα: Μηνορραγίες, ανώμαλες αιμορραγίες.
- Διάγνωση: Υστεροσκόπηση, υπερηχογράφημα.
- Θεραπεία: Αφαίρεση με υστεροσκοπική πολυπεκτομή.

3. Ινομυώματα της Μήτρας

Τα ινομυώματα είναι καλοήθεις όγκοι του μυομητρίου. Μπορεί να επηρεάσουν τη γονιμότητα αν [5]:

- Παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα.
- Αποτρέπουν την εμφύτευση.
- Επηρεάζουν τη ροή αίματος στο ενδομήτριο.

Θεραπεία

- Χειρουργική αφαίρεση (ινομυωματεκτομή) αν επηρεάζουν τη γονιμότητα.
- Φαρμακευτική αγωγή (GnRH αγωνιστές) για μείωση του μεγέθους.

Δ. Ενδοκρινολογικοί Παράγοντες

Στους ενδοκρινικούς παράγοντες συγκαταλέγονται ο υποθυροειδισμός (καθώς η αυξημένη TSH επηρεάζει τη λειτουργία των ωοθηκών) και ο διαβήτης (Διαταραχές ινσουλίνης επηρεάζουν την ωορρηξία) [5].

1.1.2.2 Ανδρικός Παράγοντας Υπογονιμότητας

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της υπογονιμότητας των ζευγαριών, καθώς συμβάλλει σε περίπου 40-50% των περιπτώσεων. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, το οποίο σχετίζεται με ποικιλία παραμέτρων, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων, την παραγωγή σπέρματος ή την ικανότητα του σπέρματος να γονιμοποιήσει το ωάριο. Οι ανδρικοί παράγοντες υπογονιμότητας μπορεί να αφορούν τόσο τη φυσιολογία των όρχεων όσο και άλλους εξωγενείς παράγοντες που παρεμβαίνουν στην αναπαραγωγική διαδικασία. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπως γενετικοί, ορμονικοί, ανατομικοί, περιβαλλοντικοί και άλλοι παράγοντες [8].

1.1.2.2.1 Διαταραχές Σπερματογένεσης

Η σπερματογένεση είναι η διαδικασία παραγωγής σπερματοζωαρίων στους όρχεις, και αποτελεί θεμελιώδη διαδικασία για την ανδρική γονιμότητα. Οποιαδήποτε διαταραχή σε αυτή τη διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή σπέρματος ή ακόμα και σε πλήρη απουσία σπέρματος [9].

Αζωοσπερμία

Η αζωοσπερμία αναφέρεται στην απουσία σπερματοζωαρίων στο σπέρμα. Αυτή η κατάσταση μπορεί να χωριστεί σε δύο τύπους [10]:

- Προβλήματα παραγωγής σπερματοζωαρίων (προσβολή των όρχεων): Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία συμβαίνει όταν οι όρχεις δεν παράγουν σπερματοζωάρια και το αίτιο είναι λειτουργικό και όχι αποφρακτικό. Αυτό μπορεί να προκληθεί από γενετικές διαταραχές, ιογενείς λοιμώξεις ή άλλες ασθένειες.
- Αποφρακτική αζωοσπερμία: Η απόφραξη των σπερματικών σωληναρίων ή των εκφορητικών πόρων, μπορεί να εμποδίσει την έξοδο των σπερματοζωαρίων, παρά την κανονική παραγωγή τους. Αυτό μπορεί να προκληθεί από λοίμωξη, χειρουργικές επεμβάσεις ή συγγενείς ανωμαλίες.

Ολιγοσπερμία

Η ολιγοσπερμία αναφέρεται στη χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα (λιγότερο από 15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά χιλιοστόλιτρο). Μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, όπως ανωμαλίες στη σπερματογένεση, ορμονικές διαταραχές, ή περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων [10].

Ασθενοσπερμία

Η ασθενοσπερμία αναφέρεται στη μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διείσδυση στο ωάριο. Η ασθενοσπερμία μπορεί να προκληθεί από γενετικούς παράγοντες, όπως μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, ή από εξωγενείς παράγοντες όπως η τοξικότητα και η αύξηση της θερμοκρασίας [10].

Τυποποιημένα προβλήματα μορφολογίας (μορφολογία σπέρματος)

Οι ανωμαλίες στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα τους να διεισδύσουν στο ωάριο. Ορισμένες ανωμαλίες περιλαμβάνουν σπερματοζωάρια με ακανόνιστη κεφαλή, ουρά ή άλλα μορφολογικά προβλήματα. Οι γενετικές διαταραχές που επηρεάζουν τη δομή των σπερματοζωαρίων, όπως η κυστική ίνωση, μπορεί να συνδέονται με τέτοιες μορφολογικές ανωμαλίες [10].

1. Ορμονικές Διαταραχές

Οι ορμόνες παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανδρική αναπαραγωγική υγεία, καθώς ρυθμίζουν τη λειτουργία των όρχεων και τη σπερματογένεση [10].

Υπογοναδισμός

Ο υπογοναδισμός χαρακτηρίζεται από χαμηλή παραγωγή ανδρογόνων, όπως η τεστοστερόνη, από τους όρχεις. Αυτή η κατάσταση μπορεί να προκληθεί από διαταραχές της υπόφυσης ή των όρχεων, επηρεάζοντας τη σπερματογένεση και προκαλώντας υπογονιμότητα. Ο υπογοναδισμός μπορεί να είναι:

- Πρωτοπαθής υπογοναδισμός: Όταν οι όρχεις δεν παράγουν επαρκείς ποσότητες τεστοστερόνης και σπέρματος. Αυτό μπορεί να προκληθεί από γενετικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο Klinefelter ή από τραύματα στους όρχεις.
- Δευτεροπαθής υπογοναδισμός: Οφείλεται σε διαταραχές στον εγκέφαλο, συνήθως στην υπόφυση ή τον υποθάλαμο, που ρυθμίζουν την παραγωγή της ορμόνης LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) και FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή τεστοστερόνης.

Υπερπρολακτιναιμία

Η υπερπρολακτιναιμία αναφέρεται σε αυξημένα επίπεδα προλακτίνης στο αίμα, μία ορμόνη που σχετίζεται με την παραγωγή γάλακτος στις γυναίκες, αλλά έχει και ρυθμιστική δράση στην ανδρική γονιμότητα. Υψηλά επίπεδα προλακτίνης μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη παραγωγή τεστοστερόνης και σπέρματος, προκαλώντας υπογονιμότητα.

2. Ανατομικές ανωμαλίες

Ορισμένες ανατομικές διαταραχές στους άνδρες μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητά τους να παράγουν ή να εκσπερματώνουν σπέρμα, προκαλώντας υπογονιμότητα.

Κιρσοκήλη

Η κιρσοκήλη είναι η διόγκωση των φλεβών που αποστραγγίζουν το αίμα από τους όρχεις, προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας στους όρχεις. Αυτή η αυξημένη θερμοκρασία μπορεί να μειώσει την παραγωγή και την ποιότητα των σπερματοζωαρίων. Η κιρσοκήλη είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες υπογονιμότητας στους άνδρες και μπορεί να αντιμετωπιστεί χειρουργικά, αν και τα αποτελέσματα είναι περιορισμένα σε μερικές περιπτώσεις.

Αποφρακτικές Ανωμαλίες

Αποφράξεις στους σπερματικούς σωλήνες, οι οποίες εμποδίζουν την εκσπερμάτιση των σπερματοζωαρίων, μπορεί να προκύψουν λόγω λοίμωξης, τραυμάτων ή συγγενών ανωμαλιών. Αυτές οι απόφραξεις μπορεί να εμποδίζουν την εκτόξευση του σπέρματος και να απαιτούν ιατρική παρέμβαση για την αποκατάσταση της λειτουργίας.

1.1.2.3 Γενετικοί Παράγοντες Υπογονιμότητας

Οι γενετικοί παράγοντες είναι σημαντικοί προσδιοριστικοί παράγοντες της υπογονιμότητας και επηρεάζουν τόσο την ανδρική όσο και τη γυναικεία αναπαραγωγική υγεία. Η γενετική υπογονιμότητα μπορεί να προκύψει από γενετικές ανωμαλίες που επηρεάζουν την παραγωγή, την ανάπτυξη ή τη λειτουργία των αναπαραγωγικών κυττάρων (ωαρίων και σπερματοζωαρίων), καθώς και τις ορμονικές διαδικασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή. Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν συγγενείς ή επίκτητες διαταραχές, οι οποίες ενδέχεται να διαταράξουν τη φυσιολογική αναπαραγωγική διαδικασία, οδηγώντας σε υπογονιμότητα [11].

1.1.2.3.1 Γενετικά Σύνδρομα και Διαταραχές

Ορισμένα γενετικά σύνδρομα και διαταραχές προκαλούν υπογονιμότητα, επηρεάζοντας τα αναπαραγωγικά όργανα, την παραγωγή σπερματοζωαρίων ή ωαρίων ή τις αναπαραγωγικές ορμόνες. Οι πιο συνηθισμένοι γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την υπογονιμότητα περιλαμβάνουν [11]:

Σύνδρομο Klinefelter (47,XXY)

Το Σύνδρομο Klinefelter είναι μια γενετική διαταραχή στους άνδρες που προκαλείται από την παρουσία ενός επιπλέον X χρωμοσώματος, οπότε οι άνδρες με αυτή την κατάσταση έχουν συνολικά 47 χρωμοσώματα (XXY αντί για το φυσιολογικό XY). Το σύνδρομο αυτό επηρεάζει τη σπερματογένεση και οδηγεί σε μειωμένη ή καθόλου παραγωγή σπέρματος, οδηγώντας σε ανδρική υπογονιμότητα. Οι άνδρες με Klinefelter συχνά εμφανίζουν μικρούς όρχεις και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, κάτι που επίσης μπορεί να επηρεάσει τη σεξουαλική τους λειτουργία και την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Ενώ η κατάσταση αυτή μπορεί να αντιμετωπιστεί με IVF, η θεραπεία δεν επιφέρει πάντα αποκατάσταση της γονιμότητας.

Σύνδρομο Turner (45,X)

Το Σύνδρομο Turner είναι μια χρωμοσωμική ανωμαλία που επηρεάζει τις γυναίκες, οι οποίες έχουν μόνο ένα X χρωμόσωμα (45,X αντί για 46,XX). Αυτό το σύνδρομο μπορεί να προκαλέσει διάφορες αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως μικρό ύψος, καρδιολογικά προβλήματα και υπογονιμότητα. Στις γυναίκες με σύνδρομο Turner, οι ωοθήκες δεν αναπτύσσονται σωστά και οδηγούν σε ωοθηκική ανεπάρκεια και έλλειψη ωοθυλακίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις το άτομο είναι στείρο, αν και ορμονική θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών φύλου. Σε μερικές περιπτώσεις, η χρήση ωαρίων από δωρεά ή η εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να προσφέρει μια λύση.

Σύνδρομο Noonan

Το Σύνδρομο Noonan είναι μια γενετική διαταραχή που προκαλεί ανωμαλίες στη σωματική ανάπτυξη και μπορεί να σχετίζεται με αναπαραγωγικές διαταραχές τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Στους άνδρες, η κατάσταση αυτή μπορεί να

προκαλέσει υπογοναδισμό, μείωση της παραγωγής σπέρματος και μειωμένη παραγωγή τεστοστερόνης. Στις γυναίκες, μπορεί να προκαλέσει ανατομικές ανωμαλίες στις ωοθήκες, οι οποίες οδηγούν σε υπογονιμότητα.

Σύνδρομο σύνδρομο των θηλεοποιητικών όρχεων (Androgen Insensitivity Syndrome - AIS)

Το Σύνδρομο σύνδρομο των θηλεοποιητικών όρχεων (AIS) προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα ανδρογόνων, καθιστώντας τα κύτταρα ανθεκτικά στις δράσεις των ανδρογόνων, όπως η τεστοστερόνη. Οι άνδρες με πλήρες AIS (ανεξαρτήτως του γενετικού φύλου) αναπτύσσονται εμφανισιακά ως γυναίκες, καθώς δεν εμφανίζουν την ανδρική εξωτερική ανατομία, παρόλο που έχουν XY χρωμοσώματα. Ωστόσο, δεν παράγουν σπέρμα, καθιστώντας τους υπογόνιμους.

1.1.2.3.2 Γενετικές Μεταλλάξεις και Διάφορες Καταστάσεις Υπογονιμότητας

Η παρουσία γενετικών μεταλλάξεων μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα, επηρεάζοντας είτε τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος είτε τη γονιμοποιητική ικανότητα των ωαρίων [12,13].

Κυστική Ίνωση (Cystic Fibrosis - CF)

Η κυστική ίνωση είναι μια γενετική νόσος που προκαλεί τη συσσώρευση παχύρρευστων εκκρίσεων στους πνεύμονες, το πεπτικό σύστημα και το αναπαραγωγικό σύστημα. Στους άνδρες με κυστική ίνωση, η κύρια αιτία υπογονιμότητας είναι η αποφρακτική αζωοσπερμία, δηλαδή η απόφραξη των σπερματικών σωλήνων, η οποία εμποδίζει την έξοδο του σπέρματος από τους όρχεις. Αν και οι άνδρες με κυστική ίνωση δεν έχουν σπερματοζωάρια στη σπερματική τους εκσπερμάτωση, η ανακάλυψη τεχνικών μικροχειρουργικής αναρρόφησης σπέρματος (TESE) έχει προσφέρει ελπίδες σε αυτούς τους ασθενείς για την απόκτηση παιδιών με IVF.

Μειωμένη Ποιότητα Σπέρματος λόγω Γενετικών Ανωμαλιών

Ορισμένες γενετικές ανωμαλίες, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της CFTR (χρωμοσωματική περιοχή που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της κυστικής ίνωσης), έχουν συσχετιστεί με μειωμένη ποιότητα σπέρματος, επηρεάζοντας τη δομή, την

κινητικότητα και την πυκνότητα των σπερματοζωαρίων. Στην περίπτωση αυτών των μεταλλάξεων, οι άνδρες παρουσιάζουν σοβαρές δυσλειτουργίες στη γονιμοποίηση, μερικές φορές αδιόρατες κατά τη διάρκεια της φυσικής σύλληψης.

Μονογονιδιακές Διαταραχές και Επιπτώσεις στην Υπογονιμότητα

Η γενετική υπογονιμότητα μπορεί επίσης να προκύψει από μονογονιδιακές διαταραχές, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία των γονάδων και τη δυνατότητα παραγωγής αναπαραγωγικών κυττάρων.

Δυσλειτουργία Ανδρογόνων

Η δυσλειτουργία των ανδρογόνων αναφέρεται σε καταστάσεις όπου η παραγωγή ή η δράση των ανδρικών ορμονών (όπως η τεστοστερόνη) είναι μειωμένη ή απουσιάζει εντελώς. Αυτές οι καταστάσεις οδηγούν σε υπογοναδισμό, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά η σπερματογένεση και να προκαλείται υπογονιμότητα. Ορισμένες γενετικές καταστάσεις, όπως οι μεταλλάξεις στους υποδοχείς ανδρογόνων, επηρεάζουν τη δράση αυτών των ορμονών, οδηγώντας σε ανδρική υπογονιμότητα.

1.1.2.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες Υπογονιμότητας

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες υπογονιμότητας περιλαμβάνουν μια ποικιλία εξωτερικών παραμέτρων που επηρεάζουν την αναπαραγωγική υγεία και των δύο φύλων. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν χημικές ουσίες, θερμοκρασία, ακτινοβολία, διατροφή και τρόπο ζωής, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τις φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού και ενδέχεται να προκαλέσουν ή να ενισχύσουν τις διαταραχές στη γονιμότητα.

Η κατανόηση αυτών των παραμέτρων είναι εξαιρετικά σημαντική για την πρόληψη και θεραπεία της υπογονιμότητας, καθώς οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι συχνά τροποποιήσιμοι, κάτι που σημαίνει ότι η αλλαγή του τρόπου ζωής ή η αποφυγή ορισμένων παραμέτρων μπορεί να έχει θετική επίδραση στην αναπαραγωγική υγεία [14,15].

1.1.2.4.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (Endocrine Disrupting Chemicals - EDCs)

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι χημικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα, δηλαδή το σύστημα των ορμονών του οργανισμού, και επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των ορμονών, ενδεχομένως προκαλώντας δυσλειτουργίες στην αναπαραγωγική υγεία. Αυτές οι ουσίες μπορεί να μιμούνται ή να αποκλείουν τη δράση των φυσικών ορμονών, με αποτέλεσμα να προκαλούν ανισορροπίες στον ορμονικό άξονα και να επηρεάζουν τη σπερματογένεση, την ωοθυλακιογένεση και τη γονιμοποίηση [16–19].

Βισφενόλη Α (BPA)

Η βισφενόλη Α (BPA) είναι μια από τις πιο κοινές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πλαστικών και ρητινών. Βρίσκεται σε προϊόντα όπως πλαστικά μπουκάλια, κονσέρβες, τρόφιμα συσκευασμένα σε πλαστικά και τρόφιμα που έρχονται σε επαφή με πλαστικές επιφάνειες. Η BPA μπορεί να μιμηθεί τις ορμόνες οιστρογόνα, προκαλώντας πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγική υγεία. Η έκθεση στην BPA έχει συσχετιστεί με μειωμένη ποιότητα σπέρματος στους άνδρες, μειωμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαταραχές της ωοθηκικής λειτουργίας στις γυναίκες.

Φθαλικές Ενώσεις

Οι φθαλικές ενώσεις (phthalates) χρησιμοποιούνται κυρίως για να καταστήσουν τα πλαστικά πιο ευλύγιστα. Βρίσκονται σε πολλά προϊόντα καταναλωτικών αγαθών όπως πλαστικά παιχνίδια, καλλυντικά, και καθαριστικά. Αυτές οι ουσίες ενδέχεται να επηρεάζουν τη σπερματογένεση, προκαλώντας μείωση της συγκέντρωσης και κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στους άνδρες. Επιπλέον, συνδέονται με μειωμένη ποιότητα ωαρίων και ανωμαλίες στην ανάπτυξη των εμβρύων στις γυναίκες.

Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (PCBs)

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές και μπορεί να είναι ανθεκτικά στις φυσικές διαδικασίες αποδόμησης. Οι PCBs έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ισορροπία των ορμονών, επηρεάζοντας την παραγωγή και ποιότητα των σπερματοζωαρίων στους

άνδρες, καθώς και την ωοθυλακιογένεση και την εμφάνιση ενδομητρίωσης στις γυναίκες. Η χρόνια έκθεση στις PCBs έχει συνδεθεί με την εμφάνιση υπογονιμότητας λόγω της τοξικότητας τους στα αναπαραγωγικά κύτταρα.

1.1.2.4.2 Θερμοκρασία και Υπερβολική Θερμότητα

Η θερμοκρασία έχει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των όρχεων, καθώς το φυσιολογικό εύρος θερμοκρασίας για τη σπερματογένεση είναι ελαφρώς χαμηλότερο από τη θερμοκρασία του σώματος (περίπου 34-35°C). Συνεπώς, η υπερβολική έκθεση σε θερμότητα ή αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων μπορεί να προκαλέσει βλάβες στη σπερματογένεση [20–22].

Υπερθερμία των Όρχεων

Η υπερβολική θέρμανση των όρχεων, όπως αυτή που προκαλείται από τη χρήση στενών ρούχων, επαγγελματική ενασχόληση (οδηγοί), χρήση φορητών υπολογιστών (laptops) πάνω στην περιοχή των γεννητικών οργάνων ή όταν εκτίθεται κανείς σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. σάουνες ή θερμά λουτρά), μπορεί να μειώσει τη φυσιολογική παραγωγή σπέρματος και να προκαλέσει ασθενοσπερμία ή και ολιγοσπερμία. Η θερμοκρασία είναι εξαιρετικά κρίσιμη για τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων του σπερματογόνου επιθηλίου, που είναι υπεύθυνα για τη σπερματογένεση.

Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία

Η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από κινητά τηλέφωνα, Wi-Fi, και συσκευές Bluetooth έχει συσχετιστεί με μείωση της ποιότητας του σπέρματος. Η συνεχής έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να βλάψει το DNA των σπερματοζωαρίων και να μειώσει την κινητικότητα και τον αριθμό τους. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η μακροχρόνια χρήση κινητών τηλεφώνων μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην ποιότητα του σπέρματος, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα συνεπή.

1.1.2.4.3 Καπνός, Αλκοόλ και Ναρκωτικές Ουσίες

Οι επιπτώσεις του καπνίσματος, της κατανάλωσης αλκοόλ και των ναρκωτικών στην αναπαραγωγική υγεία είναι αποδεδειγμένες και ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο και την ποσότητα της ουσίας που καταναλώνεται. Αυτές οι ουσίες επηρεάζουν τόσο τη γυναικεία όσο και την ανδρική γονιμότητα [23,24].

Καπνός

Το κάπνισμα προκαλεί βλάβες στην αναπαραγωγική υγεία μέσω των τοξικών ουσιών του καπνού, όπως το μονοξείδιο του άνθρακα και οι πτητικές ενώσεις. Στους άνδρες, το κάπνισμα συνδέεται με μειωμένη ποιότητα σπέρματος, μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων και αυξημένο ποσοστό σπερματοζωαρίων με ανωμαλίες. Στις γυναίκες, η έκθεση στο κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο αποβολών, πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας και μειώνει την πιθανότητα σύλληψης.

Αλκοόλ

Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ μειώνει τη λειτουργία του υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή τεστοστερόνης στους άνδρες και ανωμαλίες στην ωοθυλακιογένεση στις γυναίκες. Η κατανάλωση αλκοόλ έχει συσχετιστεί με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, κακή κινητικότητα και χαμηλότερη ποιότητα ωαρίων.

Ναρκωτικές Ουσίες

Η χρήση ναρκωτικών ουσιών (όπως η κοκαΐνη, η ηρωίνη και η μαριχουάνα) συνδέεται με μειωμένη σπερματογένεση, μειωμένη κινητικότητα και αύξηση της κυτταρικής βλάβης στο DNA των σπερματοζωαρίων. Στις γυναίκες, η χρήση ναρκωτικών μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στην εμμηνορρυσία και μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα.

1.1.2.5 Ιδιοπαθής Υπογονιμότητα

Η ιδιοπαθής υπογονιμότητα αναφέρεται σε περιπτώσεις υπογονιμότητας όπου δεν μπορεί να εντοπιστεί σαφής αιτία ή οργανική διαταραχή για την αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης. Είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται όταν μετά από εκτενείς κλινικές και

εργαστηριακές εξετάσεις τόσο του ανδρικού όσο και του γυναικείου παράγοντα, δεν διαγιγνώσκεται κάποιο πρόβλημα ή ασθένεια που να εξηγεί την υπογονιμότητα [25].

Η ιδιοπαθής υπογονιμότητα αποτελεί περίπου το 20-30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας και συνήθως διαγιγνώσκεται μετά από την εξάντληση των δυνατοτήτων για την αναγνώριση φυσικών ή οργανικών αιτιών. Η διάγνωση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας δεν σημαίνει ότι η υπογονιμότητα είναι μη αναστρέψιμη ή μη θεραπεύσιμη, αλλά απλώς ότι δεν μπορεί να εντοπιστεί μια αναγνωρίσιμη αιτία μέσω των τυπικών διαγνωστικών μεθόδων [25].

Η ιδιοπαθής υπογονιμότητα μπορεί να συμβεί και στα δύο φύλα ή να είναι περιορισμένη σε έναν από αυτά. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση αυτής της κατάστασης μπορεί να είναι τόσο φυσιολογικοί όσο και ενδεχομένως μη αναγνωρίσιμοι μέσω των σύγχρονων διαγνωστικών τεχνικών [25].

1.1.2.5.1 Γενετικοί Παράγοντες

Η γενετική προδιάθεση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως κατανοητό το είδος και ο τρόπος με τον οποίο επιδρά [25,26].

- Μικροχρωμοσωμικές ανωμαλίες: Σε μερικές περιπτώσεις, η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε μικροχρωμοσωμικές ανωμαλίες που δεν ανιχνεύονται μέσω των συμβατικών γενετικών εξετάσεων, όπως οι μικρές διαγραφές ή μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα που επηρεάζουν τη λειτουργία των γονιδίων.
- Ανεπαρκής σπερματογένεση: Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία σπερματογένεσης χωρίς να εντοπίζονται εμφανείς ανωμαλίες μέσω κλασικών εξετάσεων (όπως το σπέρμα ή η ορμονική αξιολόγηση).

1.1.2.5.2 Μικροβιολογικοί και Λοιμώδεις Παράγοντες

Σε πολλές περιπτώσεις υπογονιμότητας, ειδικά στις περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας, οι μικροβιολογικοί παράγοντες μπορεί να είναι παρόντες χωρίς να έχουν διαγνωστεί επαρκώς [26].

- Λοίμωξη του αναπαραγωγικού συστήματος: Ορισμένες λοιμώξεις, όπως οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις (π.χ., Chlamydia, Gonorrhea) μπορεί να προκαλούν φλεγμονή στον αναπαραγωγικό σωλήνα χωρίς να εκδηλώνουν εμφανή συμπτώματα, οδηγώντας σε μειωμένη γονιμότητα.
- Ασυμπτωματική βακτηριουρία: Η παρουσία βακτηρίων στο ουροποιητικό σύστημα, χωρίς εμφανή συμπτώματα, μπορεί επίσης να επηρεάσει τη γονιμότητα.
- Αποκρυμμένοι μικροοργανισμοί: Ειδικοί μικροοργανισμοί που δεν ανιχνεύονται εύκολα μέσω τυπικών εξετάσεων (π.χ., μυκόπλασμα ή ουρεοπλάσμα) μπορεί να συμβάλλουν στη μειωμένη γονιμότητα.

1.1.2.5.3 Ανοσολογικοί Παράγοντες

Η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού μπορεί να είναι ένας άλλος παράγοντας που δεν ανιχνεύεται συχνά σε παραδοσιακές εξετάσεις [26].

- Αντισώματα κατά του σπέρματος: Στην ιδιοπαθή υπογονιμότητα, η ύπαρξη αντισωμάτων κατά του σπέρματος μπορεί να παρεμβαίνει στην κινητικότητα ή στην ικανότητα του σπέρματος να διεισδύσει στο ωάριο, χωρίς να υπάρχουν ανωμαλίες στις παραδοσιακές εξετάσεις.
- Ανοσολογικές αντιδράσεις στο έμβρυο: Σε μερικές περιπτώσεις, το ανοσοποιητικό σύστημα της γυναίκας μπορεί να αναγνωρίζει το έμβρυο ως ξένο σώμα και να επιτίθεται σε αυτό, προκαλώντας αποβολές ή προβλήματα στην εμφύτευση, χωρίς να υπάρχει αναγνωρίσιμη αιτία για την αποτυχία σύλληψης.

1.1.2.5.4 Ορμονικές και Μεταβολικές Διαταραχές

Σε μερικές περιπτώσεις, η υπογονιμότητα μπορεί να προκύπτει από ήπιες ορμονικές ή μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες δεν είναι πάντα εύκολα ανιχνεύσιμες ή εμφανείς [26].

- Υποκλινικός υποθυρεοειδισμός: Οι γυναίκες με ήπιες ανωμαλίες στα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών μπορεί να παρουσιάσουν υπογονιμότητα χωρίς εμφανή συμπτώματα, τα οποία να εντοπίζονται μόνο μέσω πιο εξειδικευμένων εξετάσεων.

- Ανεπαρκής ρύθμιση των ορμονών της υπόφυσης: Η δυσλειτουργία της υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει τη λειτουργία των γονάδων, μπορεί να οδηγεί σε ήπιες ανωμαλίες στην παραγωγή των ορμονών FSH και LH, που είναι υπεύθυνες για την ωορρηξία και τη λειτουργία του ωοθηκικού κύκλου.
- Ανεπάρκεια ορμονών αναπαραγωγής σε άνδρες: Οι άνδρες με διαταραχές στην παραγωγή τεστοστερόνης ή άλλων ορμονών που είναι υπεύθυνες για τη σπερματογένεση, χωρίς όμως εμφανείς οργανικές ανωμαλίες, μπορούν να παρουσιάσουν με ιδιοπαθή υπογονιμότητα.

1.1.2.5.5 Περιβαλλοντικοί και Εξωγενείς Παράγοντες

Παρά το γεγονός ότι οι περιβαλλοντικοί και εξωγενείς παράγοντες συνήθως εντάσσονται στην κατηγορία της αναγνωρίσιμης υπογονιμότητας, σε πολλές περιπτώσεις η συνδυασμένη επίδραση πολλών παραμέτρων μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα, χωρίς να εντοπίζεται άμεσα η αιτία [26].

- Περιβαλλοντική ρύπανση και χημικές τοξίνες: Η έκθεση σε χημικές ουσίες, όπως πλαστικοποιητές (π.χ., BPA), φυτοφάρμακα και άλλες τοξικές ουσίες, μπορεί να επηρεάσει τις αναπαραγωγικές λειτουργίες και να οδηγήσει σε μείωση της γονιμότητας, χωρίς όμως να προσδιορίζεται σαφώς η αιτία.

1.1.3. Αξιολόγηση υπογονιμότητας – Η προσέγγιση του υπογόνιμου ζευγαριού

Η αξιολόγηση της υπογονιμότητας, τυπικά αφορά γυναίκες που προσπαθούν να πετύχουν εγκυμοσύνη και αποτυγχάνουν να συλλάβουν μετά από ένα ή περισσότερα χρόνια τακτικής και χωρίς προφυλάξεις συνουσίας, μιας και το 85% των ζευγαριών θα επιτύχει εγκυμοσύνη χωρίς βοήθεια μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα. Αξιολόγηση και θεραπεία πριν το ένα έτος ενδείκνυται σε γυναίκες με: 1) με ηλικία άνω των 35 ετών, 2) με ιστορικό oligomenόρροιας / αμηνόρροιας, 3) γνωστή ή πιθανή παθολογία της μήτρας / σάλπιγγας, ενδομητρίωση ή μειωμένο αποθεματικό των ωοθηκών, ή 4) υπογόνιμος σύντροφος ή με υποψία υπογονιμότητας [4,27,28].

Η κλινική και εργαστηριακή προσέγγιση του ζευγαριού πρέπει γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τις επιθυμίες του ζευγαριού, την ηλικία του, τη διάρκεια της προσπάθειας και τα στοιχεία του ιατρικού ιστορικού και της φυσικής εξέτασης [27].

Το ζευγάρι πρέπει να θεωρείται ως μια ενιαία μονάδα δεδομένου ότι και τα δύο φύλα μοιράζονται ένα μέρος στην πιθανότητα υπογονιμότητας του ζευγαριού. Η αρχική προσέγγιση του υπογόνιμου ζευγαριού θα πρέπει να περιλαμβάνει πλήρη ιατρικό, γυναικολογικό και ανδρολογικό ιστορικό, φυσική εξέταση, συμπεριλαμβανομένης και μιας ανασκόπησης του τρόπου ζωής και των κοινωνικών συνηθειών του [4,27,28].

Η αξιολόγηση της γυναικείας υπογονιμότητας προσεγγίζει κάθε στοιχείο της αναπαραγωγικής φυσιολογίας της, προκειμένου να εντοπιστεί πιθανή παθολογία: στον τράχηλο, την μήτρα, το ενδομήτριο, τη λειτουργία των ωοθηκών, σάλπιγγες, περιτόναιο και ορμονικό έλεγχο [28].

Η αρχική αξιολόγηση του ανδρός θα πρέπει να περιλαμβάνει, ιατρικό ιστορικό αναπαραγωγικό ιστορικό και δύο αναλύσεις σπέρματος. Μια προσεκτική αξιολόγηση του ιστορικού και της φυσικής εξέτασης κάθε ενός από τα δύο φύλα μπορεί να κατευθύνει την διαγνωση σε μία ενιαία ή μια πολυπαραγοντική αιτία και να κατευθύνει περαιτέρω την διερεύνηση και την θεραπεία. Η αξιολόγηση και των δύο πρέπει να ξεκινήσει ταυτόχρονα, καθώς είναι αναγκαίο να προσεγγιστεί η υπογονιμότητα ως διαταραχή του ζευγαριού [28].

Πολλοί συγγραφείς υποστηρίζουν πως το υπογόνιμο ζευγάρι πρέπει να διερευνηθεί σωστά πριν προταθεί οποιαδήποτε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Από την άλλη πλευρά, πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή άσκοπων δαπανηρών εξετάσεων και επεμβάσεων, ειδικά εκείνων με αμφισβητήσιμα διαγνωστικά και θεραπευτικά αποτελέσματα. Τα καλύτερα διαγνωστικά μέσα είναι αυτά με υψηλή διαγνωστική ακρίβεια αξιοπιστία, χαμηλό κόστος και ελάχιστη επεμβατικότητα [28].

Για γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας (περισσότερο από τριάντα πέντε χρόνια), η προσέγγιση είναι κάπως διαφορετική από αυτή των νεότερων ασθενών. Αυτοί οι ασθενείς έχουν ήδη χάσει σημαντικό μέρος του αναπαραγωγικού τους δυναμικού εξαιτίας της ελάττωσης των ωοθηκών εφεδρειών σε ωοθυλάκια. Σε αυτά τα ζευγάρια δεν

ενδείκνυται έντονη διαγνωστική διερεύνηση ενώ συστήνεται η άμεση θεραπεία μέσω ART για να εξασφαλιστούν καλύτερα αποτελέσματα χωρίς να σπαταληθεί πολύτιμος χρόνος [4].

Η πιο βασική και απλή διερεύνηση του υπογόνιμου ζευγαριού περιλαμβάνει την ανάλυση σπέρματος, η οποία είναι συνήθως παθολογική σε σχεδόν στο 50% των υπογόνιμων ζευγαριών. Ενώ η διερεύνηση της γυναίκας περιλαμβάνει: 1) την αξιολόγηση της ωορρηξίας (ωοθηκικός παράγοντας), 2) την αξιολόγηση της μορφολογίας της μήτρας (παράγοντας μήτρας) της διαβατότητας των σαλπίγγων (σαλπιγγικός παράγοντας), 3) ερευνητική λαπαροσκόπηση για την διερεύνηση ύπαρξης ενδομητρίωσης (περιτοναϊκός παράγοντας) και 4) το Huhner test (τραχηλικός παράγοντας). Στα παραπάνω θα πρέπει να προσθέσουμε τον έλεγχο των ωοθηκικών εφεδρειών, καθώς μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες και να συμβάλει στη διαμόρφωση της θεραπείας. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί πως η προγνωστική αξία και ο ρόλος της λαπαροσκόπησης και του Huhner test στην αξιολόγηση της στειρότητας τελευταία αμφισβητούνται [4,28].

1.1.3.1. Κλινική και εργαστηριακή προσέγγιση

1.1.3.1.1 Ιστορικό εμμήνου ρήσεως

Αν και το ιστορικό της εμμηνόρροιας μπορεί να είναι αρκετό για να προσδιορίσει εάν οι κύκλοι είναι ωορρηκτικοί ή ανοωορρηκτικοί. Συχνά απαιτείται να διενεργηθεί και εργαστηριακός έλεγχος προκειμένου να κατευθύνει την κλινική διερεύνηση και την αρχική διάγνωση. Οι γυναίκες που έχουν φυσιολογικό κύκλο (διάρκεια κύκλου από είκοσι δύο έως τριάντα πέντε ημέρες) και αναφέρουν τα μεσοκυκλικά και τα πρόεμμηνορρησιακά συμπτώματα (όπως φουσκώματα στη κοιλιά, κεφαλαλγίες και αίσθημα πίεσης των μαστών) είναι γυναίκες τυπικά ωορρηκτικές [28].

1.1.3.1.2 Συνεχόμενοι διακολπικοί υπέρηχοι (TVS)

Η υπερηχογραφική διακολπική εξέταση των ωοθηκών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποδειχθεί η ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου και μπορεί να παράσχει σοβαρές ενδείξεις ωορρηξίας και ωχρινοποίησης του ωοθυλακίου όπως την εμφάνιση υγρού στον χώρο του Douglas και αλλαγές στην παρυφή, το μέγεθος και το περιεχόμενο του ωοθυλακίου [29,30].

1.1.3.1.3 Μέτρηση της Βασικής Θερμοκρασίας του σώματος (ΒΘΣ)

Η μέτρηση της βασικής θερμοκρασία του σώματος (ΒΘΣ) είναι ένας απλός και φθηνός τρόπος τεκμηρίωσης της ωορρηξίας και σχετίζεται με τη βιολογική επίδραση της προγεστερόνης στη θερμοκρασία του σώματος. Οι καταγραφές της ΒΘΣ ως δοκιμασίας της ωορρηξίας βασίζονται στις θερμογενείς ιδιότητες της προγεστερόνης, τα επίπεδα της οποίας καθώς αυξάνονται επιδρούν στον υποθάλαμο και αλλάζουν το σημείο της ΒΘΣ κατά περίπου 0,4-0,8° C. Συνήθως η θερμοκρασία θα ανέβει πάνω από τους 36,6°C μετά την ωορρηξία και πέφτει και πάλι στα αρχικά επίπεδα σε κύκλους που δεν καταλήγουν σε κύηση αμέσως πριν ή μετά την έναρξη της εμμήνου ρύσεως. Μια σύντομη ανύψωση της θερμοκρασίας στην ωχρινική φάση (λιγότερο από ένδεκα ημέρες) μπορεί να υποδεικνύει λειτουργική ανεπάρκεια του ωχρού σωματίου. Η μέτρηση της ΒΘΣ είναι ανακριβής και δεν είναι αξιόπιστη μέθοδος για την αξιολόγηση της ωορρηξίας. Ενώ ένα διφασικό μοτίβο συνδέεται σχεδόν πάντα με την ωοθυλακιωρήξια, μερικές γυναίκες με ωορρηξία μπορεί να εμφανίζουν μονοφασικό διάγραμμα ΒΘΣ και η μέθοδος δεν μπορεί να καθορίσει αξιόπιστα τον χρόνο της ωορρηξίας [31].

1.1.3.1.4 Προγεστερόνη ορού

Η μέτρηση της προγεστερόνης στον ορό είναι μια άλλη έμμεση μέθοδος επιβεβαίωσης της ωορρηξίας. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο αίμα γενικά είναι κάτω από 1ng/ml στην παραγωγική φάση, αρχίζει να αυξάνεται μέσα σε δώδεκα ώρες από την έναρξη του κύματος της LH και φτάνει στην κορυφή της περίπου επτά έως οκτώ ημέρες μετά την ωορρηξία. Επίπεδα προγεστερόνης ορού 3 ng/ml αποτελούν ένδειξη ωορρηξίας (90).

Ο καλύτερος χρόνος για τη μέτρηση της, είναι το μέσον της εκκριτικής φάσης όταν αυτή έχει φτάσει στην αιχμή της. Λαμβάνοντας υπόψη τη φυσιολογική διάρκεια του κύκλου (είκοσι μία έως τριάντα πέντε ημέρες) είναι πρακτικότερο να γίνεται η μέτρηση περίπου μία εβδομάδα πριν από την αναμενόμενη εμμηνόρροια αντί της συνήθους πρακτικής σύστασης να εκτελεστεί η εξέταση την 21η ημέρα του κύκλου. Σε φυσικούς κύκλους, τιμές προγεστερόνης κάτω από 10 ng/ml έχουν συσχετιστεί με χαμηλότερο ποσοστό εγκυμοσύνης ανά κύκλο από ό,τι επίπεδα προγεστερόνης πάνω από 10 ng/ml [32].

1.1.3.1.5 Μέτρηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) στα ούρα

Καθώς πλησιάζει το μέσο του κύκλου, η αύξηση των οιστρογόνων που προέρχονται από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο προκαλεί μια απότομη αύξηση της LH. Η ωορρηξία συμβαίνει συνήθως 34 έως 36 ώρες μετά την έναρξη του κύματος της LH στον ορό και περίπου δέκα έως δώδεκα ώρες μετά την μέγιστη τιμή της LH. Η έναρξη του κύματος της LH είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης για την επικείμενη ωορρηξία, και η απότομη αύξηση της LH είναι σχετικά σύντομη, τυπικά διαρκεί 48-50 ώρες. Η LH έχει μικρό χρόνο ημιζωής και γρήγορα αποβάλλεται με τα ούρα [33].

Η αύξηση της τιμής της LH στα ούρα είναι απόδειξη της ωορρηξίας. Σε γυναίκες με τακτικούς κύκλους, η μέτρηση της LH στο σπίτι μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του χρονικού διαστήματος κατά το οποίο η σύλληψη είναι πιο πιθανή -πέντε ημέρες πριν έως και την ημέρα της ωορρηξίας [3].

Ο έλεγχος της LH στο σπίτι, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε περισσότερο από το 7% των περιπτώσεων, ενώ η ευκολία και η αξιοπιστία των τεστ ποικίλει ανάλογα με το προϊόν.

1.1.3.1.6 Βιοψία ενδομητρίου

Η βιοψία ενδομητρίου είναι μια έμμεση μέθοδος επιβεβαίωσης πως έχει συμβεί ωορρηξία και εξαρτάται από το βιολογικό αποτέλεσμα της προγεστερόνης. Μετά την ωορρηξία, η προγεστερόνη που εκκρίνεται από το ωχρο σωματίο προκαλεί μετασχηματισμό του ενδομητρίου από την παραγωγική στη εκκριτική φάση. Επομένως η ιστολογική εικόνα που δείχνει εκκριτική εικόνα του ενδομητρίου συνεπάγεται ωορρηξία ενώ το αντίθετο όχι. Εικόνα καθυστέρησης της ωρίμανσης του ενδομητρίου περισσότερο από δύο ημέρες συνήθως αποκαλύπτει ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης [3].

Ωστόσο, υπάρχουν αμφισβητήσεις σχετικά, με την ακρίβεια των διαγνωστικών κριτηρίων, τον καλύτερο χρόνο λήψης της βιοψίας, αλλά και τον επιπολασμό της ωχρινικής ανεπάρκειας και την κλινική σημασία της ως αίτιο υπογονιμότητας. Μια βιοψία του ενδομητρίου είναι μια επεμβατική διαδικασία και θα πρέπει να επιφυλάσσεται όταν υποψιαζόμαστε παθολογία του ενδομητρίου (όπως καρκίνος, υπερπλασία ή χρόνια ενδομητρίτιδα) [3].

1.1.3.2. Εκτίμηση της λειτουργικότητας των ανατομικών στοιχείων της γυναίκας

1.1.3.2.1 Τραχηλικός Παράγοντας

Πρόκειται για γυναίκες με στειρότητα εξαιτίας βλαβών του τραχήλου της μήτρας, συνήθως η αιτία οφείλεται σε στένωση του ισθμού του τραχήλου, η οποία εμποδίζει το σπερματοζωάριο να εισέλθει στη μήτρα και να φτάσει στο ωάριο [34].

Η ισθμική στένωση μπορεί να είναι συνέπεια χειρουργικής επέμβασης (π.χ. Loop εκτομής [LEEP]), μόλυνση του τραχήλου της μήτρας και επακόλουθη ινώδη αντίδραση, μειωμένη επίδραση ή ανταπόκριση στα οιστρογόνα, αλλοιώσεις λόγω επίδρασης ακτινοβολιών και σπανιότερα μπορεί το αίτιο να είναι συγγενούς αιτιολογίας [34].

Η υπογονιμότητα εξαιτίας του τραχηλικού παράγοντα μπορεί επίσης να περιλαμβάνει δυσλειτουργική ή ανεπαρκή βλέννη του τραχήλου της μήτρας. Η βλέννα του τραχήλου της μήτρας είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του σπέρματος από τον κόλπο στη μήτρα και παράγεται σε απόκριση της αύξησης των οιστρογόνων στο μέσον του κύκλου.

Κατά τη συνουσία το σπέρμα εναποτίθεται στον κόλπο, όπου έρχεται σε επαφή ταχέως με την βλέννα του τραχήλου της μήτρας. Η τραχηλική βλέννα στη συνέχεια φιλτράρει το σπέρμα με κακή μορφολογία και κινητικότητα και ως εκ τούτου μόνο μια μικρή ποσότητα σπέρματος εισέρχεται στην ουσία στον τράχηλο [34]. Η δοκιμασία μετά την συνουσία (γνωστή και ως Sims-Hauser τεστ) έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές κλινικές ως βασική εξέταση στη διερεύνηση του στειρού ζευγαριού. Η δοκιμασία αυτή προτάθηκε για τον προσδιορισμό της επάρκειας του σπέρματος και τη δεκτικότητα της τραχηλικής βλέννας της μήτρας και αποτελούσε θέμα συζήτησης τα τελευταία δέκα χρόνια.

Σε μια τυχαιοποιημένη 24μηνιαία μελέτη, γυναίκες ασθενείς με μη φυσιολογικό τεστ συγκρίθηκαν με εκείνες με φυσιολογικό τεστ [34]. Δεν υπήρξε διαφορά στα ποσοστά εγκυμοσύνης μεταξύ των δύο ομάδων. Σε μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αξιολόγησε τη χρήση του τεστ, αποκαλύφθηκαν προβλήματα ευαισθησίας και ειδικότητας, αυτά τα αποτελέσματα αλλά και η έλλειψη τυποποιημένης μεθοδολογίας οδήγησε πρακτικά στην εγκατάλειψη του τεστ.

1.1.3.2.2 Πυελοσαλπιγγικός παράγοντας

Σαλπιγγικής όσο και περιτοναϊκής αιτιολογίας παράγοντες (βλάβη των σαλπίγγων, απόφραξη των σαλπίγγων και συμφύσεις της πυέλου) αποτελούν τη συνηθέστερη αναγνωρίσιμη αιτία υπογονιμότητας. Αποτελούν την κύρια διάγνωση σε περίπου 30-40% των υπογόνιμων ζευγαριών. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για βλάβες στις σάλπιγγες είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν λοίμωξη, πυελική χειρουργική επέμβαση και ενδομητρίωση, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις η αιτία είναι απροσδιόριστη. Η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (PID) είναι η κύρια αιτία της βλάβης των σαλπίγγων. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων PID προκαλούνται από *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhea* ή και από τα δύο. Μελέτες σχετικά με τον επιπολασμό του *C. trachomatis* σε ασθενείς με αποδεδειγμένη PID έδειξαν ότι περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις PID προκαλούνται από *C. Trachomatis* [34].

1.1.3.2.3 Υστεροσαλπιγγογραφία (ΥΣΓ)

Η ΥΣΓ είναι η παραδοσιακή και συνήθης μέθοδος για την αξιολόγηση της διαβατότητας των σαλπίγγων. Παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με την κοιλότητα της μήτρας. Η υστεροσαλπιγγογραφία γίνεται με σκοπό τον έλεγχο του μεγέθους και του σχήματος της μητρικής κοιλότητας και της διαβατότητας των σαλπίγγων. Με την υστεροσαλπιγγογραφία μπορούν να διαγνωσθούν υποβλεννογόνια ινομύματα, ενδομητρικοί πολύποδες, ενδομητρικές συμφύσεις, διαφράγματα, συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας, απόφραξη των μητροσαλπιγγικών στομίων, ενδοσαλπιγγικές συμφύσεις, υδροσάλπιγγες και πλήρης απόφραξη των σαλπίγγων. Η εξέταση γίνεται μεταξύ 7ης και 11ης ημέρας του κύκλου (μετά το τέλος της εμμήνου ρύσεως και πριν την ωορρηξία ώστε να μην μεταφερθεί υλικό ενδομητρίου στη περιτοναϊκή κοιλότητα αλλά και να μην ακτινοβοληθεί το ωάριο) [34].

Τα μειονέκτηματα της υστεροσαλπιγγογραφίας είναι η έκθεση της ασθενούς σε ιονίζουσα ακτινοβολία και στο ιωδιούχο σκιαγραφικό υλικό που χρησιμοποιείται υποχρεωτικά στη εξέταση, είναι επίσης δυσάρεστη και συχνά επώδυνη.

Η χορήγηση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAID) τριάντα έως εξήντα λεπτά πριν την εξέταση είναι χρήσιμη και μειώνει την ταλαιπωρία της ασθενούς. Οι επιπλοκές είναι σπάνιες αλλά μπορεί να είναι σοβαρές αν συμβούν. Οι λοιμώξεις έχουν αναφερθεί σε

ποσοστό μέχρι 1-4% γυναίκες, και ο κίνδυνος αυξάνεται περίπου κατά 10% όταν υπάρχει σαλπινγική απόφραξη [34]. Η χρήση αντιβιοτικών μπορεί να αποτρέψει μια πιθανή λοίμωξη. Η υστεροσαλπινγογραφία υπερτερεί της λαπαροσκόπησης στην διάγνωση της διαβατότητας των σαλπίγγων.

1.1.3.2.4 Λαπαροσκόπηση

Ο ρόλος της λαπαροσκόπησης στην αξιολόγηση της υπογονιμότητας είναι αμφιλεγόμενος. Η λαπαροσκόπηση είναι επεμβατική και δαπανηρή και συνήθως δεν αλλάζει την επιλογή της θεραπείας του υπογόνιμου ζευγαριού, ιδιαίτερα σε ζευγάρια στα οποία η ΥΣΓ είναι φυσιολογική. Λαπαροσκόπηση με χρήση κυανού του μεθυλενίου θεωρείται το καλύτερο διαθέσιμο τεστ για τον έλεγχο της σαλπινγικής διαπερατότητας ή της απόφραξης των σαλπίγγων. Σε σύγκριση με την ΥΣΓ παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την πύελο, συμπεριλαμβανομένων πυελικών και περισαλπινγικών συμφύσεων, ενδομητρίωσης, και σαλπινγικής παθολογίας όπως π.χ. υδροσάλπιγγα. Σε αντίθεση με την ΥΣΓ, δεν παρέχει πληροφορίες για τη μητρική κοιλότητα ή την εσωτερική αρχιτεκτονική του αυλού των σαλπίγγων. Η λαπαροσκόπηση ενδείκνυται γενικά στην διερεύνηση της ενδομητρίωσης και σε περιπτώσεις όπου η ΥΣΓ υποδηλώνει σαλπινγική παθολογία ή άλλη πάθηση που επιδέχεται επιδιόρθωση και στον ίδιο χρόνο μπορεί να γίνει διάγνωση και χειρουργική θεραπεία, ειδικά εάν η εξωσωματική γονιμοποίηση δεν είναι άμεση εναλλακτική λύση [35].

1.1.3.2.5 Υστεροσκόπηση

Η υστεροσκόπηση είναι μια χειρουργική τεχνική ελάχιστης παρέμβασης και χρησιμοποιείται τόσο για διαγνωστικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς της ενδομήτριας κοιλότητας. Είναι η μέθοδος εκλογής για την αξιολόγηση της κοιλότητας της μήτρας και τη διάγνωση ανατομικών ανωμαλιών. Δεδομένου ότι η υστεροσκόπηση είναι η μια δαπανηρή και επεμβατική μέθοδος, επιφυλάσσεται για αξιολόγηση και θεραπεία ανωμαλιών που διαγιγνώσκονται από λιγότερο επεμβατικές μεθόδους όπως η (ΥΣΓ, υπερηχογραφία). Ωστόσο, η υστεροσκόπηση στο ιατρείο με τη χρήση μικρών (διαμέτρου <3,4 mm) εύκαμπτων υστεροσκοπίων είναι τώρα διαθέσιμη και έχει κάνει την αξιολόγηση της μήτρας γρήγορη, αποτελεσματική και καλά ανεκτή από τους ασθενείς [35].

1.1.3.2.6 Μαγνητική τομογραφία (MRI)

Αν και η υπερηχογραφία είναι η μέθοδος εκλογής για την αξιολόγηση της ανατομίας της πυέλου. Ωστόσο, υπάρχουν στιγμές που η υπερηχογραφική διάγνωση είναι μη ειδική και η μαγνητική τομογραφία βοηθά στην αποσαφήνιση των ανωμαλιών.

Η μαγνητική τομογραφία παρέχει μια λεπτομερή εικόνα της ανατομίας σε τρεις διαστάσεις και έχει την ικανότητα να χαρακτηρίζει τους ιστούς, επιτρέπει την εκτίμηση των ανωμαλιών των πόρων του Müller και στις περισσότερες περιπτώσεις στη διάκριση μεταξύ αδενομύωσης και ινομυωμάτων [35].

1.1.3.3. Εκτίμηση της Λειτουργικότητας των Ανατομικών Στοιχείων του Άνδρα

Η αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνει τη διερεύνηση της λειτουργικότητας των βασικών ανατομικών δομών του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Οι ανατομικές ανωμαλίες μπορεί να επηρεάσουν την παραγωγή, την ωρίμανση, την αποθήκευση ή τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων, οδηγώντας σε διαταραχές της γονιμότητας. Η ανάλυση της λειτουργικότητας των δομών αυτών πραγματοποιείται μέσω φυσικής εξέτασης, απεικονιστικών τεχνικών και εξειδικευμένων διαγνωστικών μεθόδων [36].

1.1.3.3.1 Όρχεις και Σπερματογένεση

Οι όρχεις είναι οι βασικές δομές παραγωγής σπερματοζωαρίων και τεστοστερόνης. Η δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε oligospermia, azoospermia ή χαμηλή ποιότητα σπέρματος [36].

Κλινική Εξέταση

- **Μέγεθος και σύσταση:** Οι φυσιολογικοί όρχεις έχουν όγκο 15-25 mL. Η μικρορχιδία (<12 mL) μπορεί να υποδηλώνει πρωτοπαθή υπογοναδισμό ή γενετικά σύνδρομα (π.χ. σύνδρομο Klinefelter).
- **Ασύμμετρη ή ατροφική ανάπτυξη:** Συχνά υποδηλώνει υποσπερματογένεση ή αγγειακές διαταραχές (π.χ. κισσοκήλη).
- **Απλασία ή έκτοποι όρχεις:** Μπορεί να οφείλεται σε κρυφορχία, που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υπογονιμότητας.

Υπερηχογραφικός Έλεγχος

- Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δομικών ανωμαλιών, όγκων ή φλεγμονών.
- Ο Doppler υπέρηχος αξιολογεί τη ροή αίματος και ανιχνεύει κίρσοκήλη.

Ορμονικός Έλεγχος

- Ελέγχεται η λειτουργικότητα του υποθαλαμο-υποφυσιακού-γοναδικού άξονα.
- **FSH, LH, τεστοστερόνη, προλακτίνη:** Αποκαλύπτουν διαταραχές στην παραγωγή σπερματοζωαρίων.

1.1.3.3.2 Επιδιδυμίδα και Ωρίμανση Σπερματοζωαρίων

Η επιδιδυμίδα είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και αποθήκευση των σπερματοζωαρίων. Ανωμαλίες σε αυτή τη δομή μπορεί να προκαλέσουν ασπερμία ή χαμηλή κινητικότητα σπερματοζωαρίων [37].

Κλινική και Υπερηχογραφική Αξιολόγηση

- Πάχυνση ή απόφραξη της επιδιδυμίδας μπορεί να είναι αποτέλεσμα λοίμωξης (επιδιδυμίτιδας) ή συγγενών διαμαρτιών (π.χ. κυστική ίνωση).
- Ο υπέρηχος Doppler ανιχνεύει φλεγμονές και αγγειακές διαταραχές.

Βιοχημικοί Δείκτες Επιδιδυμικής Λειτουργίας

- Η μέτρηση επιπέδων α-γλυκοσιδάσης στο σπερματικό υγρό αξιολογεί τη λειτουργία της επιδιδυμίδας.

1.1.3.3.3 Σπερματικοί Πόροι και Μεταφορά Σπέρματος

Οι σπερματικοί πόροι είναι απαραίτητοι για τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα προς την ουρήθρα. Αποφρακτικές ή συγγενείς ανωμαλίες επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα [37].

Συγγενής Απλασία των Σπερματικών Πόρων

- Σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR (κυστική ίνωση).
- Προκαλεί αζωοσπερμία με φυσιολογική σπερματογένεση.

Απόφραξη Σπερματικών Πόρων

- Μπορεί να προκληθεί από λοιμώξεις, χειρουργικές επεμβάσεις ή τραύματα.
- Η διάγνωση γίνεται με υπερηχογραφία και βιοψία όρχεων.

1.1.3.3.4 Προστατικός Αδένας και Σπερματοδόχες Κύστεις

Οι αδένες αυτοί παράγουν το πλάσμα του σπέρματος, το οποίο είναι απαραίτητο για τη θρέψη και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [36].

Προστατίτιδα και Λοιμώξεις

- Φλεγμονές του προστάτη μπορεί να επηρεάσουν τη σύσταση του σπερματικού υγρού.
- Διάγνωση μέσω προστατικού υπερήχου και καλλιέργειας σπέρματος.

Απόφραξη Σπερματοδόχων Κύστεων

- Προκαλεί μειωμένο όγκο εκσπερμάτισης και ασπερμία.
- Ανιχνεύεται με μαγνητική τομογραφία πυέλου.

1.1.3.3.5 Κιρσοκήλη και Αγγειακή Ροή

Η κιρσοκήλη είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας. Προκαλεί αυξημένη θερμοκρασία στο όσχεο, οδηγώντας σε βλάβη της σπερματογένεσης [36].

Κλινική και Υπερηχογραφική Διάγνωση

- Εμφανίζεται ως διόγκωση του σπερματικού τόνου.
- Ο υπέρηχος Doppler ανιχνεύει την παθολογική φλεβική ροή.

Επιδράσεις στη Γονιμότητα

- Μειώνει την κινητικότητα και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων.
- Μπορεί να επηρεάσει τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

1.1.3.3.6 Ουρήθρα και Μηχανισμοί Εκσπερμάτισης

Ανωμαλίες στην ουρήθρα ή στους μηχανισμούς εκσπερμάτισης μπορεί να προκαλέσουν παλίνδρομη εκσπερμάτιση ή στυτική δυσλειτουργία [36].

Παλίνδρομη Εκσπερμάτιση

- Το σπέρμα κατευθύνεται προς την ουροδόχο κύστη αντί να εκσπερματωθεί φυσιολογικά.
- Σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη, νευρολογικές διαταραχές ή προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις.

Στυτική Δυσλειτουργία και Υπογονιμότητα

- Αδυναμία επίτευξης ή διατήρησης στύσης μπορεί να οφείλεται σε αγγειακά, νευρολογικά ή ψυχογενή αίτια.
- Διάγνωση μέσω Doppler πέους και νευρολογικών εξετάσεων.

1.1.4. Αντιμετώπιση της Υπογονιμότητας

Η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας εξαρτάται από την αιτία που την προκαλεί, τη διάρκεια του προβλήματος, την ηλικία των ατόμων και τη γενική τους υγεία. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις μπορούν να χωριστούν σε συντηρητικές παρεμβάσεις, φαρμακευτικές θεραπείες, χειρουργικές επεμβάσεις και τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Σε αρκετές περιπτώσεις, ο συνδυασμός περισσότερων της μιας μεθόδων αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας [38].

1.1.4.1. Τροποποίηση του τρόπου ζωής και συντηρητικές παρεμβάσεις

Για αρκετές μορφές υπογονιμότητας, ειδικά όταν σχετίζονται με μεταβολικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, η αλλαγή του τρόπου ζωής μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα [38].

Βελτίωση της διατροφής και του σωματικού βάρους

- Το υπερβολικό ή χαμηλό βάρος μπορεί να διαταράξει τις ορμονικές ισορροπίες και να επηρεάσει την ωορρηξία και την ποιότητα του σπέρματος.
- Δίαιτα πλούσια σε αντιοξειδωτικά, βιταμίνες (A, C, E, D), μέταλλα (ψευδάργυρο, σελήνιο) και απαραίτητα λιπαρά οξέα μπορεί να ενισχύσει τη γονιμότητα.
- Ο περιορισμός των επεξεργασμένων τροφών, των τρανς λιπαρών και της υπερβολικής ζάχαρης βελτιώνει την ορμονική λειτουργία.

Διακοπή καπνίσματος, μείωση αλκοόλ και αποφυγή ναρκωτικών ουσιών

- Το κάπνισμα επηρεάζει τη γονιμότητα μειώνοντας την ποιότητα και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και επιταχύνοντας την εξάντληση των ωοθηκικών αποθεμάτων στις γυναίκες.
- Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να οδηγήσει σε ορμονικές διαταραχές και μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα.
- Οι ναρκωτικές ουσίες, όπως η μαριχουάνα και τα αναβολικά στεροειδή, μειώνουν σημαντικά την παραγωγή σπέρματος και διαταράσσουν την ωορρηξία.

Διαχείριση του στρες

- Το χρόνιο στρες μπορεί να διαταράξει τη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες και να προκαλέσει ανωορρηξία ή μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων.
- Τεχνικές όπως η γιόγκα, ο διαλογισμός και η ψυχοθεραπεία βοηθούν στην αντιμετώπιση του άγχους.

Ρύθμιση της σεξουαλικής δραστηριότητας

- Οι συχνές επαφές (ανά 2-3 ημέρες) αυξάνουν τις πιθανότητες σύλληψης, ενώ η υπερβολική αποχή μπορεί να μειώσει την ποιότητα του σπέρματος.
- Ο προσδιορισμός των γόνιμων ημερών (μέσω τεστ ωορρηξίας ή παρακολούθησης βασικής θερμοκρασίας) βελτιώνει τις πιθανότητες σύλληψης.

1.1.4.2. Φαρμακευτική αντιμετώπιση

Η φαρμακευτική θεραπεία αποτελεί μία από τις κύριες μεθόδους αντιμετώπισης της υπογονιμότητας, ιδιαίτερα όταν το πρόβλημα σχετίζεται με ορμονικές διαταραχές, ανωορρηξία, δυσλειτουργία των ωοθηκών ή διαταραχές στην παραγωγή και την ποιότητα του σπέρματος. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στοχεύουν κυρίως:

- Στη διέγερση της ωορρηξίας στις γυναίκες.
- Στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του σπέρματος στους άνδρες.
- Στην εξισορρόπηση ορμονικών ανωμαλιών που επηρεάζουν τη γονιμότητα.

1.1.4.2.1 Φαρμακευτική θεραπεία για τη γυναικεία υπογονιμότητα

Η φαρμακευτική αγωγή στις γυναίκες εστιάζει κυρίως στη διέγερση της ωορρηξίας και στη ρύθμιση των ορμονικών διαταραχών που επηρεάζουν τη γονιμότητα.

Φάρμακα διέγερσης της ωορρηξίας

Τα φάρμακα αυτά διεγείρουν την παραγωγή FSH και LH, που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την απελευθέρωση ώριμων ωαρίων. Χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις ανωορρηξίας, όπως στο σύνδρομο PCOS ή σε ανεξήγητη υπογονιμότητα [39–41].

Ι) Κλομιφαίνη (Clomiphene Citrate - Clomid, Serophene)

- Είναι ένας εκλεκτικός τροποποιητής των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM), που διεγείρει την παραγωγή FSH και LH από την υπόφυση, προάγοντας την ωοθυλακιογένεση και την ωορρηξία.
- Χορηγείται συνήθως από τη 2η έως την 6η ημέρα του εμμηνορροϊκού κύκλου.
- Χρησιμοποιείται κυρίως σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και σε περιπτώσεις ανωορρηξίας.
- Πιθανές παρενέργειες: εξάψεις, ναυτία, αϋπνία, κίνδυνος πολύδυμης κύησης (5-10%).

II) Γοναδοτροπίνες (FSH, LH, hMG, hCG)

- Ενέσιμες ορμόνες που περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένη FSH (Follitropin α/β), LH ή συνδυασμό των δύο (hMG – ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη).
- Προκαλούν ανάπτυξη ωοθυλακίων στις ωοθήκες και χορηγούνται συνήθως στις γυναίκες που δεν ανταποκρίνονται στην κλομιφαίνη ή που υποβάλλονται σε IVF.
- Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) χρησιμοποιείται για να προκαλέσει την τελική ωρίμανση του ωοθυλακίου και την ωορρηξία.
- Πιθανές παρενέργειες: υπερδιέγερση ωοθηκών, αυξημένος κίνδυνος πολύδυμης κύησης και σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (OHSS).

III) Αναστολείς αρωματάσης (Letrozole, Anastrozole)

- Αναστέλλουν τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, μειώνοντας τα επίπεδα οιστρογόνων και αυξάνοντας την παραγωγή FSH.
- Το Letrozole χρησιμοποιείται κυρίως σε γυναίκες με PCOS που δεν ανταποκρίνονται στην κλομιφαίνη.
- Προσφέρει χαμηλότερο κίνδυνο πολύδυμης κύησης σε σχέση με την κλομιφαίνη.

Μετφορμίνη

- Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση των επιπέδων ινσουλίνης σε γυναίκες με σύνδρομο PCOS.
- Βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, μειώνοντας την υπερινσουλιναίμια και επιτρέποντας την επαναφορά της φυσιολογικής ωορρηξίας.
- Συχνά συνδυάζεται με κλομιφαίνη για καλύτερα αποτελέσματα.

Προγεστερόνη

- Χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της ωχρινικής φάσης και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης σε γυναίκες με ανεπάρκεια προγεστερόνης ή ιστορικό αποβολών.
- Χορηγείται κυρίως υπό τη μορφή κολπικών υπόθετων ή ενέσεων.

1.1.4.2.2 Φαρμακευτική θεραπεία για την ανδρική υπογονιμότητα

Οι φαρμακευτικές θεραπείες στους άνδρες στοχεύουν στη βελτίωση της σπερματογένεσης, στη διόρθωση ορμονικών διαταραχών και στην ενίσχυση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων [39–41].

Γοναδοτροπίνες (hCG, FSH)

- Χρησιμοποιούνται σε άνδρες με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό για την τόνωση της παραγωγής τεστοστερόνης και τη βελτίωση της σπερματογένεσης.
- Η hCG χορηγείται για τη διέγερση των κυττάρων Leydig, ενώ η FSH ενισχύει την ανάπτυξη των σπερματικών σωληναρίων.

Αναστολείς αρωματάσης (Anastrozole, Letrozole)

- Μειώνουν τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστρογόνα, βελτιώνοντας τα επίπεδα τεστοστερόνης και την ποιότητα του σπέρματος.
- Χρησιμοποιούνται κυρίως σε άνδρες με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και χαμηλή αναλογία τεστοστερόνης/οιστραδιόλης.

Αντιοξειδωτικά και συμπληρώματα

Η χρήση αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την ποιότητα του σπέρματος μειώνοντας το οξειδωτικό στρες:

- Βιταμίνη C και E: Προστατεύουν τα σπερματοζωάρια από οξειδωτικές βλάβες.
- Συνένζυμο Q10: Βελτιώνει την κινητικότητα του σπέρματος.
- L-καρνιτίνη: Ενισχύει τη μιτοχονδριακή λειτουργία των σπερματοζωαρίων.
- Ψευδάργυρος και Σελήνιο: Βελτιώνουν τη σπερματογένεση.

Τεστοστερόνη

- Χρησιμοποιείται σπάνια, καθώς η εξωγενής χορήγηση τεστοστερόνης μπορεί να καταστείλει την παραγωγή σπέρματος μέσω της αναστολής της FSH και της LH.
- Σε επιλεγμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται φάρμακα που διεγείρουν τη φυσική παραγωγή τεστοστερόνης αντί για άμεση χορήγηση της ορμόνης.

1.1.4.3. Χειρουργική αντιμετώπιση

Η χειρουργική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου ανατομικές ανωμαλίες, απόφραξη των αναπαραγωγικών οργάνων, παθολογίες της μήτρας ή των ωοθηκών στις γυναίκες, καθώς και παθήσεις των όρχεων ή του σπερματικού πόρου στους άνδρες, εμποδίζουν τη φυσιολογική σύλληψη [42].

Η επιλογή της κατάλληλης χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από την αιτία της υπογονιμότητας, το ιστορικό του ασθενούς και την πιθανότητα αποκατάστασης της γονιμότητας μέσω της επέμβασης. Οι περισσότερες επεμβάσεις πραγματοποιούνται με ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές, όπως η λαπαροσκόπηση και η υστεροσκόπηση, προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος ανάρρωσης και να ελαχιστοποιηθούν οι επιπλοκές [42].

1.1.4.3.1 Χειρουργικές επεμβάσεις για τη γυναικεία υπογονιμότητα

Οι επεμβάσεις στις γυναίκες στοχεύουν κυρίως:

- Στην αποκατάσταση της βατότητας των σαλπίγγων.
- Στην αφαίρεση ανατομικών ανωμαλιών ή παθολογικών σχηματισμών στη μήτρα και στις ωοθήκες.
- Στη διόρθωση ενδομητρίωσης ή συμφύσεων που επηρεάζουν τη σύλληψη.

1.1.4.3.1.1 Χειρουργική αντιμετώπιση απόφραξης των σαλπίγγων

Η απόφραξη των σαλπίγγων εμποδίζει τη συνάντηση του ωαρίου με το σπερματοζώαριο, καθιστώντας αδύνατη τη φυσική γονιμοποίηση [43].

I) Σαλπινγοπλαστική

- Είναι η χειρουργική αποκατάσταση των σαλπίγγων που έχουν υποστεί απόφραξη λόγω φλεγμονών (π.χ. υδροσάλπιγγα), συμφύσεων ή προηγούμενων λοιμώξεων (χλαμύδια, γονόρροια).
- Συνήθως εκτελείται λαπαροσκοπικά.
- Η επιτυχία της επέμβασης εξαρτάται από τη σοβαρότητα της απόφραξης.

II) Σαλπινγκεκτομή

- Σε περιπτώσεις σοβαρής υδροσάλπιγγας, μπορεί να αφαιρεθεί η πάσχουσα σάλπιγγα, καθώς η φλεγμονώδης συλλογή υγρού μπορεί να μειώσει την πιθανότητα επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

1.1.4.3.1.2 Χειρουργική αντιμετώπιση ενδομητρίωσης

Η ενδομητρίωση μπορεί να προκαλέσει χρόνιο πόνο και υπογονιμότητα λόγω των συμφύσεων και των φλεγμονωδών αλλοιώσεων [44].

Λαπαροσκοπική αφαίρεση εστιών ενδομητρίωσης

- Η ενδομητρίωση μπορεί να αντιμετωπιστεί με λαπαροσκοπική αφαίρεση ή καυτηριασμό των ενδομητριωσικών εστιών.
- Η απομάκρυνση των ενδομητριωσικών κύστεων (ενδομητριωμάτων) από τις ωοθήκες μπορεί να βελτιώσει τη γονιμότητα.
- Βελτιώνει τα ποσοστά φυσικής σύλληψης, ειδικά σε περιπτώσεις ήπιας και μέτριας ενδομητρίωσης.

1.1.4.3.1.3 Χειρουργική αντιμετώπιση ινομυωμάτων

Τα ινομυώματα είναι καλοήθεις όγκοι της μήτρας που μπορεί να εμποδίζουν την εμφύτευση του εμβρύου ή να προκαλούν αποβολές [45].

Ινομυωματεκτομή

Η ινομυωματεκτομή είναι η χειρουργική αφαίρεση των ινομυωμάτων και μπορεί να πραγματοποιηθεί λαπαροσκοπικά, ρομποτικά ή ανοιχτά, ανάλογα με το μέγεθος και την θέση των όγκων. Ενδείκνυται όταν τα ινομυώματα προκαλούν υπογονιμότητα ή αποβολές.

1.1.4.3.1.4 Υστεροσκοπικές επεμβάσεις

Η υστεροσκόπηση είναι μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος που επιτρέπει την άμεση απεικόνιση και χειρουργική αποκατάσταση ενδομητρικών παθολογιών.

Αφαίρεση ενδομήτριων πολυπόδων

- Οι πολύποδες είναι καλοήθεις σχηματισμοί του ενδομητρίου που μπορεί να παρεμποδίζουν την εμφύτευση του εμβρύου.

Διατομή διαφράγματος μήτρας

- Ανατομικές ανωμαλίες, όπως το ενδομήτριο διάφραγμα, μπορούν να διορθωθούν με υστεροσκοπική διατομή.

1.1.4.3.2 Χειρουργικές επεμβάσεις για την ανδρική υπογονιμότητα

Οι επεμβάσεις στους άνδρες στοχεύουν στη διόρθωση ανατομικών ή λειτουργικών ανωμαλιών του αναπαραγωγικού συστήματος [46].

Χειρουργική αντιμετώπιση κισσοκήλης

Η κισσοκήλη είναι η πιο συχνή αναστρέψιμη αιτία ανδρικής υπογονιμότητας και οφείλεται στη διάταση των φλεβών του σπερματικού τόνου, που προκαλεί αυξημένη θερμοκρασία στους όρχεις και βλάβη στη σπερματογένεση.

Μικροχειρουργική κισσοκηλεκτομή

- Εκτελείται μέσω μικρής τομής και χρησιμοποιεί μικροσκόπιο για την απολίνωση των παθολογικών φλεβών.
- Βελτιώνει τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία του σπέρματος.

Αποκατάσταση απόφραξης του σπερματικού πόρου

Ορισμένοι άνδρες παρουσιάζουν αποφρακτική αζωοσπερμία λόγω απόφραξης στον σπερματικό πόρο ή στη σπερματική λήκυθο.

Βαζο-βαζοστομία και βαζο-επιδιδυμοστομία

- Χειρουργικές επεμβάσεις που αποκαθιστούν τη ροή των σπερματοζωαρίων μέσω του σπερματικού πόρου.
- Ενδείκνυνται σε περιπτώσεις απόφραξης λόγω τραυματισμού, λοιμώξεων ή προηγούμενης βαζεκτομής.

Χειρουργική ανάκτηση σπέρματος

Σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας με αζωοσπερμία (απουσία σπερματοζωαρίων στο σπέρμα), μπορεί να γίνει εξαγωγή σπερματοζωαρίων από τους όρχεις ή την επιδιδυμίδα.

I) TESE (Testicular Sperm Extraction) & Micro-TESE

- Χειρουργική βιοψία όρχεων για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (ICSI).
- Το Micro-TESE χρησιμοποιεί μικροσκόπιο για ακριβέστερο εντοπισμό των σπερματογόνων σωληναρίων.

II) PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) & MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration)

- Εξαγωγή σπέρματος από την επιδιδυμίδα, συχνά σε περιπτώσεις αποφρακτικής αζωοσπερμίας.

1.1.4.4. Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technologies - ART) περιλαμβάνουν ιατρικές παρεμβάσεις που βοηθούν ζευγάρια με προβλήματα γονιμότητας να επιτύχουν σύλληψη. Αυτές οι τεχνικές εφαρμόζονται όταν φυσικές μέθοδοι ή άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις (φαρμακευτική ή χειρουργική αντιμετώπιση) δεν είναι αποτελεσματικές [47].

Οι κύριες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν:

1. Ενδομήτρια Σπερματέγχυση (IUI - Intrauterine Insemination)
2. Εξωσωματική Γονιμοποίηση (IVF - In Vitro Fertilization)
3. Μικρογονιμοποίηση (ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection)
4. Μεταφορά Βλαστοκύστης
5. Κατάψυξη Γαμετών και Εμβρύων
6. Δωρεά Ωαρίων, Σπέρματος ή Εμβρύων
7. Παρένθετη Μητρότητα
8. Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (PGT - Preimplantation Genetic Testing)

1.1.4.4.1 Ενδομήτρια Σπερματέγχυση (IUI - Intrauterine Insemination)

Η ενδομήτρια σπερματέγχυση είναι μία από τις απλούστερες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και περιλαμβάνει την τοποθέτηση επεξεργασμένου σπέρματος απευθείας μέσα στη μήτρα κατά την ωορρηξία.

Διαδικασία

- Η γυναίκα παρακολουθείται για να εντοπιστεί η ωορρηξία είτε φυσικά είτε με τη χρήση ωοθηκικών διεγερτικών φαρμάκων.
- Το σπέρμα του συντρόφου ή δότη υποβάλλεται σε εργαστηριακή επεξεργασία, ώστε να επιλεγούν τα πιο κινητικά και υγιή σπερματοζωάρια.
- Το σπέρμα εισάγεται στη μήτρα μέσω ενός λεπτού καθετήρα.
- Η γονιμοποίηση γίνεται φυσικά μέσα στις σάλπιγγες.

Ενδείξεις

- Ήπια ανδρική υπογονιμότητα (χαμηλή κινητικότητα ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων).
- Ανεξήγητη υπογονιμότητα.
- Δυσλειτουργία τραχηλικής βλέννας.
- Ζευγάρια που χρησιμοποιούν δότη σπέρματος.

Ποσοστά Επιτυχίας

- Περίπου 10-20% ανά κύκλο, ανάλογα με την ηλικία και την υποκείμενη αιτία υπογονιμότητας.

1.1.4.4.2 Εξωσωματική Γονιμοποίηση (IVF - In Vitro Fertilization)

Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι μία από τις πιο διαδεδομένες και αποτελεσματικές μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Περιλαμβάνει τη γονιμοποίηση του ωαρίου με σπερματοζωάριο έξω από το σώμα, στο εργαστήριο, και την επανεμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα [48].

Διαδικασία

1. Διέγερση Ωοθηκών

- Χορηγούνται ορμονικά φάρμακα (FSH, LH) για την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων στις ωοθήκες.

2. Ωοληψία

- Τα ώριμα ωάρια συλλέγονται με διακολπική παρακέντηση υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση.

3. Γονιμοποίηση

- Τα ωάρια γονιμοποιούνται με σπερματοζωάρια στο εργαστήριο.

4. Καλλιέργεια Εμβρύων

- Τα έμβρυα αναπτύσσονται στο εργαστήριο για 3-5 ημέρες.

5. Εμβρυομεταφορά

- Επιλέγονται 1-2 έμβρυα και μεταφέρονται στη μήτρα.

Ενδείξεις

- Απόφραξη σαλπίγγων.
- Ενδομητρίωση.
- Σοβαρή ανδρική υπογονιμότητα.
- Αποτυχημένες προσπάθειες ΙUI.

Ποσοστά Επιτυχίας

- Εξαρτώνται από την ηλικία της γυναίκας, τη γονιμότητα του άνδρα και την ποιότητα των εμβρύων.

1.1.4.4.3 Μικρογονιμοποίηση (ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection)

Η ICSI είναι μια εξειδικευμένη μορφή εξωσωματικής γονιμοποίησης, όπου ένα σπερματοζωάριο εγχέεται απευθείας μέσα στο ωάριο με μικροβελόνα [49].

Ενδείξεις

- Σοβαρή ολιγοασθενοτερατοσπερμία.
- Αζωοσπερμία (σπέρμα που λαμβάνεται χειρουργικά).
- Αποτυχημένες προσπάθειες IVF.

Ποσοστά Επιτυχίας

- Υψηλότερα από την κλασική IVF, ειδικά σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας.

1.1.4.4.4 Μεταφορά Βλαστοκύστης

- Περιλαμβάνει την καλλιέργεια του εμβρύου έως την 5η ημέρα, όταν έχει αναπτυχθεί σε βλαστοκύστη.
- Αυξάνει την πιθανότητα εμφύτευσης λόγω καλύτερης επιλογής εμβρύων.

1.1.4.4.5 Κατάψυξη Γαμετών και Εμβρύων

Κατάψυξη Ωαρίων

- Επιτρέπει σε γυναίκες που καθυστερούν τη μητρότητα ή που υποβάλλονται σε θεραπείες (π.χ. χημειοθεραπεία) να διατηρήσουν τη γονιμότητά τους.

Κατάψυξη Σπέρματος

- Εφαρμόζεται σε άνδρες πριν από θεραπείες ή σε περιπτώσεις μειωμένης ποιότητας σπέρματος.

Κατάψυξη Εμβρύων

- Χρησιμοποιείται για μελλοντικές εμβρυομεταφορές.

1.1.4.4.6 Δωρεά Ωαρίων, Σπέρματος ή Εμβρύων

- Επιλογή για γυναίκες με ανεπαρκή ωάρια ή άνδρες με αζωοσπερμία.
- Χρησιμοποιείται και σε ζευγάρια με γενετικές ασθένειες.

1.1.4.4.7 Παρένθετη Μητρότητα

- Όταν η γυναίκα δεν μπορεί να κυοφορήσει, μια άλλη γυναίκα (παρένθετη μητέρα) κυοφορεί το έμβρυο.

1.1.4.4.8 Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (PGT - Preimplantation Genetic Testing)

- Γενετικός έλεγχος εμβρύων πριν από την εμφύτευση για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών.
- Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις γενετικών ασθενειών ή αποβολών.
- Επιλέγουμε μόνο τα υγιή έμβρυα για εμφύτευση.

1.1.5. Η διερεύνηση της γυναικείας υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική κατάσταση που επηρεάζει τόσο τους άνδρες όσο και τις γυναίκες, με αιτίες που εκτείνονται από γενετικούς, ορμονικούς και ανατομικούς παράγοντες μέχρι περιβαλλοντικές επιδράσεις και ιδιοπαθείς μηχανισμούς. Η σύγχρονη επιστημονική προσέγγιση στη διάγνωση και την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας απαιτεί μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση όλων των πιθανών αιτιών, αξιοποιώντας τόσο την ανάλυση του σπέρματος όσο και τη διερεύνηση της ωοθηκικής λειτουργίας στις γυναίκες. Η διερεύνηση της γυναικείας υπογονιμότητας αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στη διάγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης για τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν δυσκολίες σύλληψης. Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη γυναικεία γονιμότητα είναι ζωτικής σημασίας, καθώς οι γυναίκες διαθέτουν έναν περιορισμένο αριθμό ωοκυττάρων, ο οποίος μειώνεται με την ηλικία, ενώ παράλληλα η αναπαραγωγική τους ικανότητα επηρεάζεται από πολυάριθμους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Στο πλαίσιο της διερεύνησης της γυναικείας υπογονιμότητας, η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων των ωοθυλακίων αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία. Η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων αποτελεί ένα νέο και ελπιδοφόρο πεδίο έρευνας, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε πιο στοχευμένες και εξατομικευμένες θεραπείες για τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα γονιμότητας. Τα κοκκώδη κύτταρα παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης του ωοκυττάρου, στην υποστήριξη της γονιμοποίησης και στη διατήρηση της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Πέρα από την προγνωστική αξία της μελέτης των κοκκωδών κυττάρων, η μελέτη τους παίζει σημαντικό ρόλο και στις μεθόδους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η ποιότητα των ωοκυττάρων και η ικανότητά τους να γονιμοποιηθούν είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της

διαδικασίας. Στην προσπάθεια βελτίωσης των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση [50].

1.2 Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά των κοκκωδών κυττάρων

Τα κοκκώδη ή κοκκιώδη κύτταρα (granulosa cells) είναι ένα βασικό κυτταρικό συστατικό των ωοθυλακίων των ωοθηκών και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη, ωρίμανση και λειτουργία των ωοκυττάρων. Βρίσκονται γύρω από το ωοκύτταρο, σχηματίζοντας ένα προστατευτικό και υποστηρικτικό μικροπεριβάλλον. Η παρουσία και η λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ωρίμανση του ωοκυττάρου, την έκκριση στεροειδών ορμονών και τη ρύθμιση της διαδικασίας της ωορρηξίας [50].

Τα κοκκώδη κύτταρα προέρχονται από το επιθήλιο των ωοθηκών και διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ανάλογα με το στάδιο του ωοθυλακίου, διαφοροποιούνται σε δύο τύπους [50]:

- **Τα κύρια κοκκώδη κύτταρα**, τα οποία περιβάλλουν το ωοκύτταρο και το συνοδεύουν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου.
- **Τα κύτταρα της στιβάδας**, τα οποία σχηματίζουν πολλαπλά στρώματα γύρω από το αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο.

Κατά την ωρίμανση του ωοθυλακίου, τα κοκκώδη κύτταρα υφίστανται προγραμματισμένες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές. Μετά την ωορρηξία, διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ωχρού σωματίου, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή προγεστερόνης και την υποστήριξη μιας πιθανής εγκυμοσύνης.

1.2.1 Ιστορική αναδρομή της μελέτης των κοκκωδών κυττάρων

Η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων έχει τις ρίζες της στη μακρόχρονη έρευνα για τη γυναικεία αναπαραγωγική φυσιολογία. Από τον 19ο αιώνα, οι επιστήμονες είχαν αρχίσει να παρατηρούν την παρουσία κυτταρικών σχηματισμών γύρω από τα ωοκύτταρα, χωρίς όμως να είναι σε θέση να κατανοήσουν πλήρως τη λειτουργία τους [51].

19ος - αρχές 20ού αιώνα: Πρώτες παρατηρήσεις

Στα τέλη του 19ου αιώνα, οι πρώτες ιστολογικές αναλύσεις των ωοθηκών έδειξαν ότι τα ωοκύτταρα περιβάλλονται από κυτταρικά στρώματα, τα οποία αργότερα ονομάστηκαν κοκκώδη κύτταρα. Οι αρχικές μελέτες βασίζονταν κυρίως σε μικροσκοπική παρατήρηση, χωρίς να υπάρχει λεπτομερής κατανόηση της βιολογικής τους σημασίας.

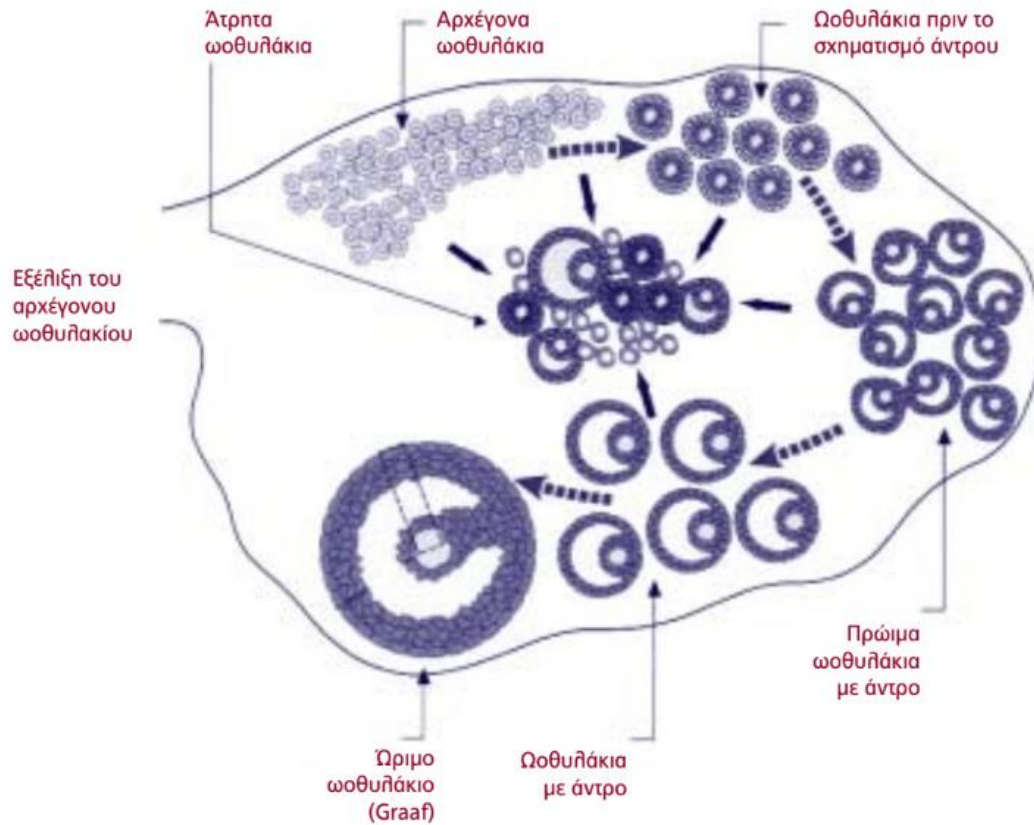
Μέσα 20ού αιώνα: Κατανόηση της ενδοκρινικής λειτουργίας

Στη δεκαετία του 1950 και 1960, η ανάπτυξη νέων μεθόδων βιοχημικής ανάλυσης επέτρεψε την κατανόηση της στεροειδογενετικής λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι τα κοκκώδη κύτταρα ήταν υπεύθυνα για τη μετατροπή των ανδρογόνων που παράγονται από τα κύτταρα του τοιχώματος σε οιστρογόνα, γεγονός που εξηγούσε τον κεντρικό τους ρόλο στη ρύθμιση του έμμηνου κύκλου.

Τέλη 20ού - αρχές 21ου αιώνα: Μοριακή και γενετική ανάλυση

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας και της γονιδιωματικής τις τελευταίες δεκαετίες, οι επιστήμονες άρχισαν να αναλύουν τα γονίδια που ρυθμίζουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα μπορεί να επηρεάσει άμεσα την ποιότητα των ωοκυττάρων και την πιθανότητα επιτυχίας της γονιμοποίησης.

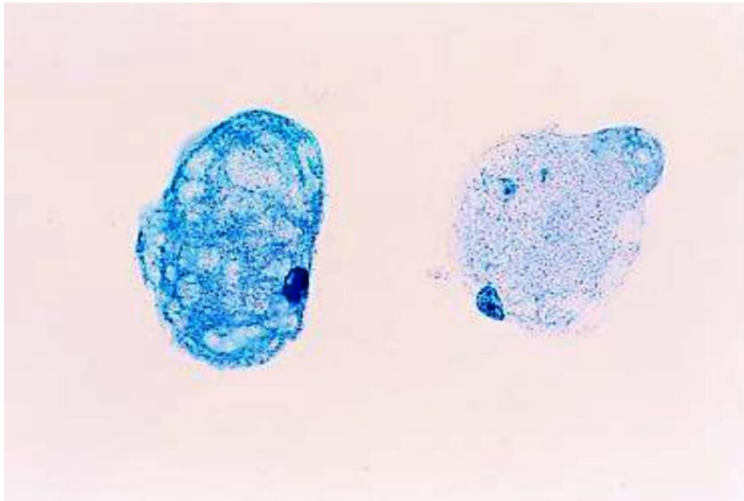
Σήμερα, η έρευνα συνεχίζεται με στόχο την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των κοκκωδών κυττάρων, την ανάπτυξη νέων τεχνικών για τη βελτίωση της γονιμότητας και την εφαρμογή τους σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.



Σχήμα 3. Στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου

1.2.2 Σημασία των Κοκκωδών Κυττάρων στη Φυσιολογία του Θηλυκού Αναπαραγωγικού Συστήματος

Τα κοκκώδη κύτταρα είναι θεμελιώδη για την ανάπτυξη και λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Παίζουν κρίσιμο ρόλο σε κάθε στάδιο της ωοθυλακικής ανάπτυξης, από τη γέννηση του ωοθυλακίου έως την ωορρηξία και τη μετέπειτα διαφοροποίησή του σε ωχρό σωματίο. Μέσω της ενδοκρινικής και παρακρινικής τους δράσης, τα κοκκώδη κύτταρα συμβάλλουν καθοριστικά στη ρύθμιση της γονιμότητας, της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, της ορμονικής ισορροπίας και της επιτυχούς σύλληψης [52].



Η μικροσκοπική όψη δύο μεγάλων κυττάρων που χαρακτηρίζουν μια κύστη ωχρού σωματίου, χρωματισμένα με χρώση Παπανικολάου. Τα κύτταρα είναι εμφανώς περιγραμμένα σε ένα διαυγές φόντο, με το καθένα να εμφανίζει έναν μικρό, σκούρο πυρήνα τοποθετημένο κοντά στην περιφέρεια. Το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται άφθονο, γεμίζοντας το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του κυττάρου, και είναι ελαφρώς χρωματισμένο σε απαλή μπλε απόχρωση, παρουσιάζοντας μια λεπτή κενοτοπιώδη υφή. Τα κενοτόπια είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλο το κυτταρόπλασμα, δίνοντας στα κύτταρα μια κοκκώδη και κάπως ημιδιαφανή εμφάνιση. Τα δύο κύτταρα είναι διακριτά και απομονωμένα, επιτρέποντας μια σαφή εικόνα της ατομικής τους μορφολογίας.

1.2.2.1. Υποστήριξη της Ανάπτυξης και Ωρίμανσης των Ωοκυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα βρίσκονται σε άμεση επικοινωνία με το ωοκύτταρο μέσω διακυτταρικών συνδέσεων (gap junctions). Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν τη μεταφορά ιόντων, αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και μικρών μορίων σηματοδότησης, διασφαλίζοντας έτσι την παροχή θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων στο ωοκύτταρο [52].

Η επικοινωνία αυτή είναι απαραίτητη για:

- Τη ρύθμιση της ανάπτυξης του ωοκυττάρου μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του cAMP (κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης), που διατηρεί το ωοκύτταρο σε ανώριμη φάση μέχρι να φτάσει στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης.
- Την προστασία του ωοκυττάρου από οξειδωτικό στρες μέσω της παροχής αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη.
- Την εξασφάλιση της μεταβολικής υποστήριξης του ωοκυττάρου, αφού τα κοκκώδη κύτταρα παρέχουν απαραίτητα ενεργειακά μόρια, όπως το πυροσταφυλικό και το γαλακτικό οξύ.

Αν η λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων είναι ανεπαρκής ή δυσλειτουργική, η ποιότητα των ωοκυττάρων μπορεί να μειωθεί, επηρεάζοντας αρνητικά τη γονιμότητα της γυναίκας και μειώνοντας τις πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης και εμφύτευσης του εμβρύου.

1.2.2.2. Παραγωγή και Ρύθμιση Στεροειδών Ορμονών

Τα κοκκώδη κύτταρα είναι κύριοι παραγωγοί στεροειδών ορμονών, όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, που είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση του εμμηνορροϊκού κύκλου και την υποστήριξη μιας πιθανής εγκυμοσύνης [53].

A. Σύνθεση οιστρογόνων

- Τα κοκκώδη κύτταρα περιέχουν το ένζυμο αρωματάση, το οποίο μετατρέπει τα ανδρογόνα (ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη) που παράγονται από τα κύτταρα της θήκης σε οιστραδιόλη.
- Η οιστραδιόλη είναι το κύριο οιστρογόνο που ρυθμίζει την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, την πάχυνση του ενδομητρίου και την προετοιμασία της μήτρας για πιθανή εμφύτευση εμβρύου.

B. Σύνθεση προγεστερόνης

- Μετά την ωορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ωχρού σωματίου και αρχίζουν να παράγουν προγεστερόνη.
- Η προγεστερόνη προετοιμάζει το ενδομήτριο για εμφύτευση και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης στα αρχικά στάδια.

Η δυσλειτουργία των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ορμονικές διαταραχές, όπως η ανεπαρκής παραγωγή οιστρογόνων ή προγεστερόνης, που σχετίζονται με ανωμαλίες στον εμμηνορροϊκό κύκλο, μειωμένη γονιμότητα και αυξημένο κίνδυνο αποβολής.

1.2.2.3. Ρύθμιση της Ωορρηξίας

Τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην έναρξη και εκτέλεση της ωορρηξίας, μιας πολύπλοκης διαδικασίας που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ωοθηκικών κυττάρων και των γοναδοτροπινών της υπόφυσης (FSH και LH) [54].

- Κατά την τελική φάση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, η αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων από τα κοκκώδη κύτταρα οδηγεί σε θετική ανάδραση, προκαλώντας απότομη αύξηση της ωχρινोटρόπου ορμόνης (LH).
- Η LH προκαλεί ρήξη του ωοθυλακίου και απελευθέρωση του ώριμου ωοκυττάρου.
- Τα κοκκώδη κύτταρα επίσης παράγουν ένζυμα και φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως μεταλλοπρωτεΐνες και προσταγλανδίνες, που διευκολύνουν τη διάσπαση του τοιχώματος του ωοθυλακίου και την έξοδο του ωαρίου.

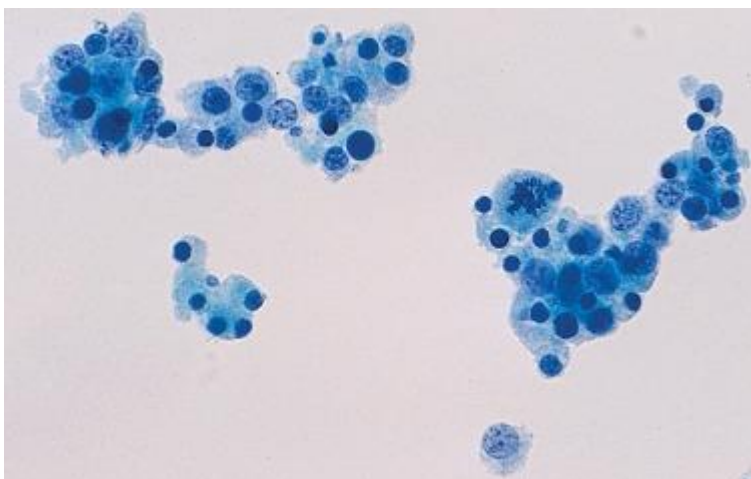
Οποιαδήποτε διαταραχή στη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να επηρεάσει την ομαλή ωορρηξία και να οδηγήσει υπογονιμότητα.

1.2.2.4. Συμβολή στον Σχηματισμό και τη Διατήρηση του Ωχρού Σώματος

Μετά την ωορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπονται σε κύτταρα του ωχρού σωματίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή προγεστερόνης [54].

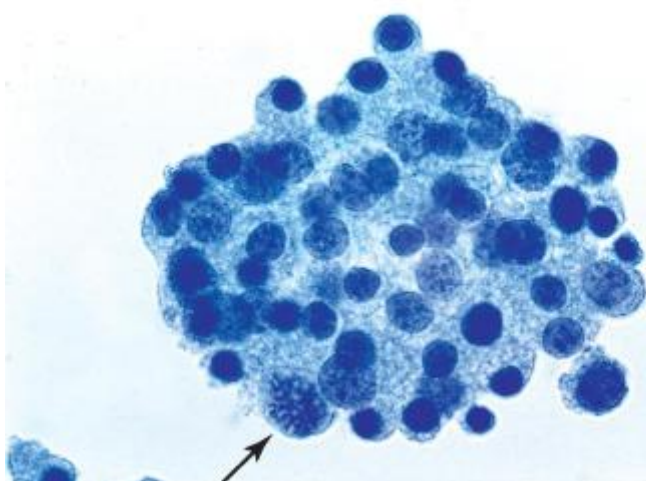
- Αν υπάρξει γονιμοποίηση, το ωχρο σωματίο διατηρείται χάρη στη δράση της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), την οποία εκκρίνει το αναπτυσσόμενο έμβρυο.
- Αν δεν υπάρξει γονιμοποίηση, το ωχρο σωματίο εκφυλίζεται, προκαλώντας πτώση των επιπέδων της προγεστερόνης και έναρξη της εμμηνορρυσίας.

Η δυσλειτουργία των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια του ωχρού σωματίου, μια κατάσταση που σχετίζεται με προβλήματα εμφύτευσης του εμβρύου και αποβολές στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης.



Θυλακική κύστη.

Τα κοκκώδη κύτταρα ομαδοποιούνται σε χαλαρά συσσωματώματα (χρώση Παπανικολάου).



Θυλακική κύστη.

Τα κοκκιώδη κύτταρα έχουν στρογγυλό πυρήνα και μέτρια ποσότητα κοκκιώδους κυτταροπλάσματος.

Τα εκφυλισμένα κοκκιώδη κύτταρα με πυκνωτικούς πυρήνες είναι ένα συνηθισμένο εύρημα, όπως και οι μιτώσεις (βέλος) (χρώση Παπανικολάου).

1.2.2.5. Δείκτης Ποιότητας των Ωοκυττάρων

Στην εξωσωματική γονιμοποίηση, η ανάλυση των κοκκωδών κυττάρων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωοκυττάρων [55].

- Η γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων συσχετίζεται με την ικανότητα του ωοκυττάρου να γονιμοποιηθεί και να οδηγήσει σε βιώσιμο έμβρυο.
- Ορισμένα γονίδια στα κοκκώδη κύτταρα θεωρούνται βιοδείκτες καλής ποιότητας ωαρίων, βοηθώντας τους ειδικούς να επιλέξουν τα πιο υγιή ωάρια για εμφύτευση.

Η έρευνα συνεχίζεται για να προσδιοριστούν οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που συνδέουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων με την επιτυχία της γονιμοποίησης και της εγκυμοσύνης.

1.2.3 Βιολογικός ρόλος και λειτουργία κοκκωδών κυττάρων

1.2.3.1 Συμμετοχή των Κοκκωδών Κυττάρων στη Στήριξη και Ανάπτυξη του Ωοκυττάρου

Τα κοκκώδη κύτταρα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την υποστήριξη του ωοκυττάρου, παρέχοντάς του τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, αυξητικούς παράγοντες και μοριακά σήματα για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της ωρίμανσής του. Ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν στη διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μηχανισμούς μεταφοράς ουσιών, διακυτταρική επικοινωνία και μεταβολική υποστήριξη [55].

Διακυτταρική επικοινωνία μέσω gap junctions

Τα κοκκώδη κύτταρα είναι συνδεδεμένα με το ωοκύτταρο μέσω εξειδικευμένων διακυτταρικών συνδέσεων, γνωστών ως gap junctions. Αυτές οι συνδέσεις αποτελούνται από πρωτεΐνες κοννεξίνες (κυρίως Cx37 και Cx43) και επιτρέπουν τη ροή μικρών μορίων, όπως:

- Ιόντα (Ca^{2+} , K^+), που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σηματοδότησης των κυττάρων.
- Νουκλεοτίδια και cAMP, που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης του ωοκυττάρου.
- Αμινοξέα και μεταβολίτες, που είναι απαραίτητα για τη θρέψη του ωοκυττάρου.

Ρύθμιση της ωρίμανσης του ωοκυττάρου μέσω μοριακών σημάτων

Το ωοκύτταρο διατηρείται σε ανώριμη κατάσταση (στο στάδιο της μείωσης Ι) μέχρι να φτάσει στο τελικό στάδιο ωρίμανσης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μεταφοράς cAMP από τα κοκκώδη κύτταρα στο ωοκύτταρο, που αναστέλλει την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου. Μόνο όταν οι ορμονικές συνθήκες γίνουν κατάλληλες, το επίπεδο του cAMP μειώνεται, επιτρέποντας στο ωοκύτταρο να συνεχίσει τη μείωση και να φτάσει στο στάδιο της μετάφασης, που είναι το τελικό στάδιο πριν από τη γονιμοποίηση.

Μεταβολική υποστήριξη του ωοκυττάρου

Το ωοκύτταρο εξαρτάται από τα κοκκώδη κύτταρα για την παροχή θρεπτικών συστατικών, καθώς δεν έχει τη μεταβολική ικανότητα να παράγει επαρκή ποσότητα ATP από μόνο του. Τα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπουν:

- Γλυκόζη σε πυροσταφυλικό, το οποίο χρησιμοποιεί το ωοκύτταρο ως ενεργειακό υπόστρωμα.
- Χοληστερόλη και λιπαρά οξέα, που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία των κυτταρικών μεμβρανών.

Η διατάραξη αυτής της υποστηρικτικής σχέσης μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλής ποιότητας ωοκύτταρα, μειώνοντας τις πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης.

1.2.3.2 Ενδοκρινικός και Παρακρινικός Ρόλος των Κοκκωδών Κυττάρων (Παραγωγή Ορμονών και Αυξητικών Παραγόντων)

Τα κοκκώδη κύτταρα λειτουργούν ως σημαντικά ενδοκρινικά και παρακρινικά κύτταρα, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την προετοιμασία του οργανισμού για πιθανή εγκυμοσύνη μέσω της έκκρισης στεροειδών ορμονών και αυξητικών παραγόντων [55].

Ενδοκρινικός ρόλος: Παραγωγή στεροειδών ορμονών

Τα κοκκώδη κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και την έκκριση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, δύο ορμονών απαραίτητων για τον εμμηνορροϊκό κύκλο και την υποστήριξη της αναπαραγωγικής διαδικασίας.

Παραγωγή οιστρογόνων

- Τα κοκκώδη κύτταρα περιέχουν το ένζυμο αρωματάση, το οποίο μετατρέπει τα ανδρογόνα (παραγόμενα από τα κύτταρα της θήκης) σε οιστραδιόλη.
- Η παραγωγή οιστραδιόλης διεγείρεται από την FSH, προωθώντας την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την προετοιμασία του ενδομητρίου για εμφύτευση.

Παραγωγή προγεστερόνης

- Μετά την ωορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του ωχρού σωματίου, αυξάνοντας την παραγωγή προγεστερόνης, η οποία είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης.

Παρακρινικός ρόλος: Αυξητικοί παράγοντες και τοπικά σήματα

Τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ωοθυλακική ανάπτυξη και την επικοινωνία με το ωοκύτταρο. Μερικοί από τους σημαντικότερους είναι:

- GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9) και BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein 15): Παράγονται από το ωοκύτταρο και διεγείρουν την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων.

- IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1): Ρυθμίζει την ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων στην FSH, προάγοντας την ανάπτυξη του ωοθυλακίου.
- Ακτιβίνη και Ινχιβίνη: Ρυθμίζουν την έκκριση της FSH και ελέγχουν την ωοθυλακική ανάπτυξη.

1.2.3.3 Διαφοροποίηση και Μοριακοί Μηχανισμοί Ρύθμισης των Κοκκωδών Κυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα προέρχονται από πολυδύναμα πρόδρομα κύτταρα και διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης υπό την επίδραση ενδοκρινικών και τοπικών σημάτων [55].

Στάδια διαφοροποίησης

Η εξέλιξη των κοκκωδών κυττάρων περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- **Προγεννητική φάση:** Τα αρχέγονα ωοκύτταρα περιβάλλονται από επίπεδα κύτταρα προγονικών κοκκωδών κυττάρων.
- **Πρωτογενές ωοθυλάκιο:** Τα κύτταρα γίνονται κυβοειδή και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται.
- **Δευτερογενές ωοθυλάκιο:** Αυξάνεται ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων και αναπτύσσεται η διαφανής ζώνη, μια πρωτεϊνική δομή γύρω από το ωοκύτταρο.
- **Τριτογενές ωοθυλάκιο (ωοθυλάκιο με άντρο):** Τα κοκκώδη κύτταρα οργανώνονται σε συγκεκριμένες δομές και αρχίζουν να εκκρίνουν υγρό, σχηματίζοντας την κοιλότητα του άντρου.

Μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης

Η διαφοροποίηση και η λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων ρυθμίζεται από [55]:

- **Γοναδοτροπίνες (FSH & LH),** που ενεργοποιούν κυτταρικά μονοπάτια όπως το cAMP/PKA.
- **Αυξητικούς παράγοντες (GDF-9, IGF-1),** που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων.
- **Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (FOXL2, SF-1),** που ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση των στεροειδών ορμονών.

Η μελέτη αυτών των μηχανισμών παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και τη θεραπεία της υπογονιμότητας.

1.2.4 Κοκκώδη Κύτταρα και Ωοθυλακική Ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου είναι μια πολυσύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση διαφόρων κυττάρων του ωοθυλακίου, συμπεριλαμβανομένων των κοκκωδών κυττάρων, των κυττάρων της θήκης και του ωοκυττάρου. Τα κοκκώδη κύτταρα διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη, την υποστήριξη και την τελική ωρίμανση του ωοκυττάρου, μέσω αλληλεπιδράσεων που ενισχύουν τη βιωσιμότητα του ωοθυλακίου και την ικανότητα του ωοκυττάρου για γονιμοποίηση [55].

1.2.4.1 Ρόλος των Κοκκωδών Κυττάρων στα Διάφορα Στάδια της Ανάπτυξης του Ωοθυλακίου

- **Πρωτογενές ωοθυλάκιο:** Στο πρωτογενές στάδιο ανάπτυξης, το ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα στρώμα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων. Σε αυτήν τη φάση, τα κοκκώδη κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται και να γίνονται πιο παχιά και κυβοειδή. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική για την έναρξη της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, με τα κοκκώδη κύτταρα να παρέχουν αρχικά τη θρέψη και τη στήριξη του ωοκυττάρου [56].
- **Δευτερογενές ωοθυλάκιο:** Στο δευτερογενές ωοθυλάκιο, τα κοκκώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν μια επαγωγική δομή γύρω από το ωοκύτταρο, που ονομάζεται διαφανής ζώνη. Στη συνέχεια, η ανάπτυξη του ωοθυλακίου συνεχίζεται, και οι κοκκώδεις κυτταρικές δομές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκκριτική δραστηριότητα και την παραγωγή στεροειδών ορμονών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του ωοθυλακίου [56].
- **Τριτογενές ωοθυλάκιο:** Στην τελευταία φάση ανάπτυξης, τα κοκκώδη κύτταρα οργανώνονται σε διαφορετικά επίπεδα γύρω από το ωοκύτταρο και δημιουργούν την κοιλότητα του άντρου. Αυτή η κοιλότητα γεμίζει με υγρό, το οποίο παρέχει θρεπτικά συστατικά και υποστηρίζει τη συνέχεια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, ενώ τα κοκκώδη κύτταρα συνεχίζουν να εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και

στεροειδείς ορμόνες. Αυτή η διαδικασία προετοιμάζει το ωοθυλάκιο για την ωορρηξία [56].

1.2.4.2 Αλληλεπιδράσεις με τα Θυλακικά Κύτταρα και το Ωοκύτταρο

Τα κοκκώδη κύτταρα αλληλεπιδρούν με δύο σημαντικά συστατικά του ωοθυλακίου: τα θυλακικά κύτταρα και το ωοκύτταρο [57,58].

- **Αλληλεπίδραση με τα Θυλακικά Κύτταρα:** Τα θυλακικά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν το εξωτερικό της ωοθυλακικής δομής, παρέχουν πρόσθετη υποστήριξη μέσω της παραγωγής ανδρογόνων και άλλων στεροειδών ορμονών. Οι θυλακικές και οι κοκκώδεις κυτταρικές στρώσεις συνεργάζονται για να προάγουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ωρίμανση του ωοκυττάρου, μέσω της ανταλλαγής αυξητικών παραγόντων και ενδοκρινών σημάτων. Η FSH επάγεται από τα κύτταρα θήκης και αναστέλλει την έκκριση ανδρογόνων από αυτά τα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε οιστρογόνα από τα κοκκώδη κύτταρα μέσω του ενζύμου αρωματάση. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κρίσιμες για την ισορροπία των ορμονών και την ικανότητα του ωοθυλακίου να συνεχίσει την ανάπτυξή του.
- **Αλληλεπίδραση με το Ωοκύτταρο:** Τα κοκκώδη κύτταρα παρέχουν στο ωοκύτταρο θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες μέσω των gap junctions (διακυτταρικών συνδέσεων), που επιτρέπουν τη ροή μικρών μορίων μεταξύ των κυττάρων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα και την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, καθώς τα κοκκώδη κύτταρα προμηθεύουν το ωοκύτταρο με αμινοξέα, πυροσταφυλικό, καθώς και με αυξητικούς παράγοντες όπως το GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9) και το BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein 15), οι οποίοι υποστηρίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του ωοκυττάρου.

1.2.4.3 Ρυθμιστικοί Μηχανισμοί (FSH, LH, Αυξητικοί Παράγοντες)

Η ωοθυλακική ανάπτυξη και η ωρίμανση του ωοκυττάρου ρυθμίζονται από πολυάριθμα ενδοκρινικά και παρακρινικά σήματα, κυρίως μέσω των γοναδοτροπινών FSH και LH, καθώς και μέσω της δράσης αυξητικών παραγόντων.

1. **FSH:** Η FSH είναι η κύρια γοναδοτροπική ορμόνη που ρυθμίζει την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων. Διεγείρει τα κοκκώδη κύτταρα να εκκρίνουν οιστρογόνα και ενισχύει την αύξηση του αριθμού τους. Τα υψηλά επίπεδα FSH συμβάλλουν στην εκκίνηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων [59].
2. **LH:** Η LH είναι επίσης κρίσιμη για την ολοκλήρωση της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Κατά την ωορρηξία, το κύριο έργο της LH είναι να ενεργοποιήσει τη διαδικασία που οδηγεί στην ωορρηξία, με την ενεργοποίηση των κοκκωδών κυττάρων να παράγουν προγεστερόνη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου [60].
3. **Αυξητικοί Παράγοντες:** Στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, οι αυξητικοί παράγοντες όπως το IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), το GDF-9 και το BMP-15 είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των κοκκωδών κυττάρων και τη διατήρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων του ωοθυλακίου και του ωοκυττάρου. Αυτοί οι παράγοντες είναι κρίσιμοι για την επιβίωση και την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, καθώς ενισχύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και την παραγωγή αυξητικών σημάτων για τη συνέχιση της διαδικασίας ανάπτυξης [61].

Η σύνθεση αυτών των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, είναι σημαντικές για τη διατήρηση της φυσιολογικής ανάπτυξης του ωοθυλακίου και την αποδοτική ωορρηξία. Διαταραχές σε αυτούς τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα και προβλήματα αναπαραγωγής.

1.2.5 Μεταβολικές και Μοριακές Ιδιότητες των Κοκκωδών Κυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην υποστήριξη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου, επιτελώντας σημαντικές μεταβολικές και μοριακές λειτουργίες. Η λειτουργία τους απαιτεί τον ενεργειακό μεταβολισμό, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και τη σύνθεση και δράση πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη σηματοδότηση και τον έλεγχο των αναπαραγωγικών διεργασιών. Επομένως, η κατανόηση των μεταβολικών και μοριακών ιδιοτήτων των κοκκωδών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη μελέτη της αναπαραγωγής και της γονιμότητας.

1.2.5.1 Ενεργειακός μεταβολισμός και υποστήριξη του ωοκυττάρου

Ο ενεργειακός μεταβολισμός των κοκκωδών κυττάρων είναι καίριος για την επιβίωση και την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, καθώς τα κοκκώδη κύτταρα παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την καλή λειτουργία του ωοθυλακίου. Αν και το ωοκύτταρο είναι το κύριο κύτταρο που συμμετέχει στην παραγωγή και έκκριση ενέργειας, τα κοκκώδη κύτταρα συμβάλλουν στην υποστήριξη του ενεργειακού μεταβολισμού μέσω διάφορων μηχανισμών [62]:

1. Γλυκόλυση

Τα κοκκώδη κύτταρα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας, ακόμα και όταν το οξυγόνο είναι διαθέσιμο. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την αναγωγή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό, το οποίο μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Η γλυκόλυση παρέχει ταχύτερη ενέργεια για τα κοκκώδη κύτταρα, υποστηρίζοντας τις απαιτήσεις τους για αυξημένη κυτταρική δραστηριότητα.

2. Κυτταρική Αερόβια Οξείδωση

Παρά τη βασική εξάρτηση από τη γλυκόλυση, τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν και στην αερόβια οξείδωση για την παραγωγή ATP μέσω του κυτταρικού αναπνευστικού συστήματος. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη δημιουργία ATP με πιο αποδοτικό τρόπο και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη κατά την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων και την παραγωγή των απαραίτητων μεταβολιτών που απαιτούνται για τη λειτουργία τους.

3. Αλληλεπίδραση με το Ωοκύτταρο

Ο μεταβολισμός των κοκκωδών κυττάρων είναι στενά συνδεδεμένος με τον μεταβολισμό του ωοκυττάρου. Τα κοκκώδη κύτταρα παρέχουν το ωοκύτταρο με γλυκόζη και άλλους μεταβολίτες μέσω των gap junctions. Ειδικά, τα κοκκώδη κύτταρα υποστηρίζουν την παραγωγή πυροσταφυλικού και γαλακτικού οξέος, τα οποία είναι κρίσιμα για την ενεργειακή παραγωγή και την επιβίωση του ωοκυττάρου.

1.2.5.2 Γονιδιακή έκφραση και μοριακοί δείκτες

Η γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων ρυθμίζεται με τη συμμετοχή των γοναδοτροπινών και άλλων σημάτων, οι οποίες ενισχύουν ή αναστέλλουν την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών και ενζύμων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και τη γονιμότητα [63].

1. Εκφραζόμενα Γονίδια

Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν πλήθος γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ορμονών, πρωτεϊνών και αυξητικών παραγόντων. Ενδεικτικά, η γονιδιακή έκφραση της αρωματάσης, ενός ενζύμου υπεύθυνου για τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του ωοθυλακίου. Επίσης, η GDF-9 (Growth Differentiation Factor 9) και το BMP-15 είναι γονίδια που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και προάγουν τη διαφοροποίηση του ωοκυττάρου.

2. Μοριακοί Δείκτες

Μοριακοί δείκτες όπως η αρωματάση και οι μικροϋποδοχείς για το FSH (FSHR) είναι σημαντικοί για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Η ύπαρξη αυτών των μοριακών δεικτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρακολουθήσει την υγεία των κοκκωδών κυττάρων και τη λειτουργία του ωοθυλακίου, καθώς και να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της αναπαραγωγικής υγείας.

1.2.5.3 Σημαντικές πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μονοπάτια

Τα κοκκώδη κύτταρα συνθέτουν σημαντικές πρωτεΐνες και παράγουν σήματα που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ωρίμανση του ωοκυττάρου. Η σηματοδότηση των πρωτεϊνών και η διαμόρφωση σηματοδοτικών μονοπατιών είναι καθοριστικά στοιχεία της λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων [64–66].

1. Πρωτεΐνες Κλειδιά

- **Αρωματάση:** Το ένζυμο αρωματάση μετατρέπει τα ανδρογόνα (που παράγονται από τα κύτταρα της θήκης) σε οιστρογόνα, ενισχύοντας την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Η αρωματάση είναι κρίσιμη για την ορμονική ισορροπία και τη σωστή ωρίμανση του ωοκυττάρου.
- **GDF-9 και BMP-15:** Αυτές οι πρωτεΐνες αυξάνουν την επιβίωση του ωοκυττάρου και προάγουν τη συνεργασία μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου. Ειδικότερα, το GDF-9 είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του ωοκυττάρου.
- **FSHR (Υποδοχέας FSH):** Ο υποδοχέας FSH βρίσκεται στα κοκκώδη κύτταρα και ενεργοποιεί την έκκριση οιστρογόνων, ενισχύοντας την ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

2. Σηματοδοτικά Μονοπάτια

Τα κοκκώδη κύτταρα ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια για να διαχειριστούν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου [64–66]:

- **Σήματα μέσω FSH και LH:** Η ενεργοποίηση του υποδοχέα FSH στα κοκκώδη κύτταρα διεγείρει την παραγωγή οιστρογόνων και την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Η αυξημένη συγκέντρωση LH συμβάλλει στην προώθηση της ωορρηξίας.
- **Σήματα από BMPs και GDFs:** Οι πρωτεΐνες BMP και GDF-9 ενισχύουν τη διαφοροποίηση και τη συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων με το ωοκύτταρο, υποστηρίζοντας τη βιωσιμότητα και την κανονική ανάπτυξή του.

Οι μεταβολικές και μοριακές ιδιότητες των κοκκωδών κυττάρων είναι κρίσιμες για την επιτυχή ανάπτυξη και την επιβίωση του ωοκυττάρου. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που

ενισχύουν την ενεργειακή υποστήριξη και τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις διασφαλίζουν την αναπαραγωγική υγεία και παρέχουν θεμελιώδεις γνώσεις για την κατανόηση και την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.

1.2.6 Διαδικασία Διαφοροποίησης και Ενεργοποίησης των Προκοκκωδών Κυττάρων στην Ανάπτυξη των Ωοθυλακίων και τη Λειτουργία των Ωοθηκών.

Η διαφοροποίηση και η ενεργοποίηση των προκοκκωδών κυττάρων είναι θεμελιώδεις διαδικασίες για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τη λειτουργία των ωοθηκών. Τα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία περιβάλλουν το ωκύτταρο και υποστηρίζουν τη φυσιολογία του, αναπτύσσονται μέσω μιας σειράς διαφοροποιημένων σταδίων που καθορίζονται από γενετικούς, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αυτές οι διαδικασίες επηρεάζουν την ποιότητα του ωαρίου, την ικανότητα γονιμοποίησης και την επιτυχία της ωορρηξίας [67,68].

1.2.6.1 Εμβρυονικοί Προγεννήτορες

Η διαδικασία διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων ξεκινά από τα εμβρυονικά προγεννητικά κύτταρα που βρίσκονται στις αρχικές φάσεις της ανάπτυξης των ωοθηκών. Κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα αρχικά κυτταρικά κύτταρα της ωοθήκης, τα οποία είναι ανεξάρτητα και μη διαφοροποιημένα, υπόκεινται σε εξωτερικά και εσωτερικά σήματα για να διαφοροποιηθούν. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με τη μορφολογική και μοριακή αναγνώριση των κυττάρων αυτών ως προκοκκώδη, τα οποία είναι έτοιμα να αναπτύξουν τις απαιτούμενες λειτουργίες για την υποστήριξη του ωοκυττάρου [67].

Αυτά τα προγεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παρέχουν τη σήμανση για την ανάπτυξή τους. Ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνουν το Wnt-4, το RSPO1, και άλλους παράγοντες που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αρχική καθοδήγηση του κυτταρικού προγραμματισμού [67].

1.2.6.2 Κυτταροκίνηση των Ωοθυλακίων

Η κυτταροκίνηση αναφέρεται στην μετακίνηση των κοκκωδών κυττάρων γύρω από το ωκύτταρο για την υποστήριξη της ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Αυτός ο μηχανισμός είναι καθοριστικός για την ακριβή τοποθέτηση των κυττάρων γύρω από το ωκύτταρο, εξασφαλίζοντας την αλληλεπίδραση των κυττάρων του ωοθυλακίου, καθώς και τη σωστή δομή του ωοθυλακίου. Η σωστή οργάνωση αυτών των κυττάρων επιτρέπει την αποτελεσματική λειτουργία των κυτταρικών συνδέσεων μέσω των gap junctions και την επιτυχή μεταφορά των μεταβολιτών και ιόντων μεταξύ των κυττάρων, δημιουργώντας μια συνεργατική αλληλεπίδραση μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου [69].

Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την εξασφάλιση της πρόσβασης σε θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες που είναι αναγκαία για την υγιή ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Όσο πιο οργανωμένα είναι τα κοκκώδη κύτταρα, τόσο καλύτερη είναι η ποιότητα του ωοκυττάρου αυξάνοντας τις πιθανότητες για επιτυχή ωορρηξία και γονιμοποίηση [70].

1.2.6.3 Ενεργοποίηση Ανεξάρτητη από Γοναδοτροπίνες & Ενεργοποίηση της Ανάπτυξης

Στην αρχή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, τα κοκκώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από τις εξωτερικές γοναδοτροπίνες όπως η FSH και η LH. Αυτή η πρώιμη ενεργοποίηση οφείλεται σε τοπικούς αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ωοθυλακίου. Οι αυξητικοί παράγοντες όπως το GDF-9 και το BMP-15 είναι καθοριστικοί για την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των προκοκκωδών κυττάρων και την προώθηση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου [70].

Αυτοί οι παράγοντες διεγείρουν τη δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων και βοηθούν στην υποστήριξη της ανάπτυξης του ωοθυλακίου χωρίς τη συμβολή εξωτερικών γοναδοτροπικών σημάτων. Επιπλέον, οι αυξητικοί παράγοντες εξασφαλίζουν ότι η ανάπτυξη του ωοθυλακίου είναι ακριβής και συγχρονισμένη με τη λειτουργία των ωοθηκών [70].

1.2.6.4 Πολλαπλασιασμός στο Προαντρικό Στάδιο

Κατά το προαντρικό στάδιο, τα κοκκώδη κύτταρα υφίστανται γρήγορο πολλαπλασιασμό και ενσωματώνονται στην περιφέρεια του ωοθυλακίου, δημιουργώντας την απαιτούμενη υποδομή για την υποστήριξη της ανάπτυξης του ωοκυττάρου. Η απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, όπως το FSH, προκαλεί την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών και την προώθηση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού [70].

Αυτός ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων είναι κρίσιμος για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, καθώς τοποθετεί τα κύτταρα στη σωστή θέση γύρω από το ωοκύτταρο, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την παραγωγή ορμονών, όπως τα οιστρογόνα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη συνέχιση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου [69].

1.2.6.5 Διαφοροποίηση στο Προωρητικό Στάδιο

Κατά το προωρητικό στάδιο, τα κοκκώδη κύτταρα συνεχίζουν τη διαφοροποίησή τους και εκκρίνουν σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες που ενισχύουν τη διαμόρφωση του ωοθυλακίου και την ωρίμανση του ωοκυττάρου. Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως το GDF-9 και το BMP-15, είναι κρίσιμοι για την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων και την αύξηση της παραγωγής οιστρογόνων, τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την προετοιμασία του για ωορρηξία [71].

Επιπλέον, η συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων με τα κύτταρα της θήκης είναι απαραίτητη για τη σωστή ωρίμανση του ωοθυλακίου. Οι κυτταρικές επικοινωνίες μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου ενισχύονται μέσω των gap junctions, επιτρέποντας την αμοιβαία μεταφορά θρεπτικών συστατικών και μεταβολιτών, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου [71].

1.2.6.6 Ωοφόρα Κύτταρα και Στεροειδογένεση

Τα κοκκώδη κύτταρα συντελούν στην παραγωγή οιστρογόνων μέσω της διαδικασίας της στεροειδογένεσης. Η στεροειδογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν στεροειδείς ορμόνες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των γεννητικών οργάνων και τη ρύθμιση του αναπαραγωγικού συστήματος [71].

Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από την δράση των γοναδοτροπινών (FSH και LH) που ενισχύουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων και καθιστούν τα ωοθυλάκια ικανά να παράγουν τις ορμόνες αυτές για την προετοιμασία της ωορρηξίας [71].

1.2.6.7 Ωορρηξία και Τελική Διαφοροποίηση: Ωχρινοποίηση

Στην περίοδο πριν και κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας, τα κοκκώδη κύτταρα ολοκληρώνουν την τελική διαφοροποίησή τους και προετοιμάζονται για την απελευθέρωση του ωοκυττάρου κατά τη διαδικασία της ωορρηξίας. Αυτή η διαδικασία είναι ενεργή κατά τη διάρκεια της διέγερσης από την LH και την FSH, τα οποία οδηγούν σε ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων [71].

1.2.6.8 Γήρανση των Κοκκωδών Κυττάρων

Η γήρανση των κοκκωδών κυττάρων σχετίζεται με την αποτυχία της σωστής ανάπτυξης των ωοθυλακίων και την μείωση της γονιμότητας. Καθώς η γυναίκα γερνά, η ικανότητα των κοκκωδών κυττάρων να υποστηρίξουν τα ωοκύτταρα μειώνεται, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη ποιότητα των ωαρίων και αυξημένη συχνότητα αποτυχίας της γονιμοποίησης ή αποβολών. Οι μηχανισμοί γήρανσης των κοκκωδών κυττάρων περιλαμβάνουν την απώλεια της ικανότητας για παραγωγή αυξητικών παραγόντων και την μείωση της κυτταρικής επικοινωνίας με το ωοκύτταρο [71,72].

1.2.7 Σημασία των κοκκωδών κυττάρων στην αναπαραγωγική ιατρική

Τα κοκκώδη κύτταρα διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ποιότητα του ωοκυττάρου και στην επιτυχία της γονιμοποίησης, καθιστώντας τα ένα σημαντικό στοιχείο της αναπαραγωγικής ιατρικής. Η μελέτη και η κατανόηση των λειτουργιών τους είναι απαραίτητη για την προώθηση της γυναικείας γονιμότητας και την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών για την υπογονιμότητα. Επιπλέον, η έρευνα στον τομέα των κοκκωδών κυττάρων προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για την εφαρμογή και βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής [73].

1.2.7.1 Ρόλος τους στην ποιότητα του ωοκυττάρου και στη γονιμοποίηση

Τα κοκκώδη κύτταρα συνδέονται στενά με την ποιότητα του ωοκυττάρου και τη διαδικασία της γονιμοποίησης, καθώς παρέχουν υποστήριξη, θρεπτικά συστατικά και ρυθμίζουν την ορμονική ισορροπία, που είναι κρίσιμα για την καλή ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Ειδικότερα [73–75]:

1. Υποστήριξη της ωρίμανσης του ωοκυττάρου

Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης, τα κοκκώδη κύτταρα ρυθμίζουν την έκκριση των οιστρογόνων και των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι είναι αναγκαίοι για την ωρίμανση του ωοκυττάρου. Αυτές οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν την καλή ποιότητα του ωοκυττάρου, καθώς η ωρίμανση του ωοκυττάρου και η κανονική λειτουργία των ωοθυλακίων είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της γονιμοποίησης.

2. Ενίσχυση της βιωσιμότητας του ωοκυττάρου

Τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν στην επιβίωση του ωοκυττάρου μέσω της παραγωγής αυξητικών παραγόντων, όπως το GDF-9 και το BMP-15, που προάγουν τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, βελτιώνοντας την ποιότητά του και τις πιθανότητες γονιμοποίησης.

3. Επιρροή στη γονιμοποιητική ικανότητα του ωοκυττάρου

Τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν επίσης στην επιτυχία της γονιμοποίησης, καθώς βοηθούν στη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος του ωοκυττάρου. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα εξασφαλίζουν την υγιή λειτουργία των κυτταρικών μηχανισμών του ωοκυττάρου και ενισχύουν την ικανότητα του ωοκυττάρου να συνδεθεί και να γονιμοποιηθεί από το σπερματοζώαριο.

1.2.7.2 Συσχέτιση με τη γυναικεία γονιμότητα και τη θεραπεία υπογονιμότητας

Η σημασία των κοκκωδών κυττάρων είναι ιδιαίτερως σημαντική στη γυναικεία γονιμότητα, καθώς η υγεία και η λειτουργικότητά τους επηρεάζουν άμεσα τις δυνατότητες σύλληψης. Διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν υπογονιμότητα, όπως:

1. **Πολυκυστικές Ωοθήκες (PCOS):** Στις γυναίκες με PCOS, η δυσλειτουργία των κοκκωδών κυττάρων σχετίζεται με ανωμαλίες στη σύνθεση των ορμονών και τη διαδικασία της ωοθυλακικής ανάπτυξης. Η διαταραχή αυτή μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του ωοκυττάρου και την ικανότητά του να γονιμοποιηθεί, προκαλώντας υπογονιμότητα. Η θεραπεία αυτής της κατάστασης περιλαμβάνει την ενίσχυση της σωστής λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων μέσω της χορήγησης φαρμάκων που ενισχύουν την ωοθυλακική ανάπτυξη, όπως το clomiphene citrate ή οι γοναδοτροπίνες [76].
2. **Απόθεμα ωοθυλακίων:** Σε περιπτώσεις που η γυναίκα παρουσιάζει μειωμένο απόθεμα ωοθυλακίων λόγω γήρανσης ή άλλων αιτίων, τα κοκκώδη κύτταρα ενδέχεται να μην παρέχουν την απαιτούμενη υποστήριξη στα ωοκύτταρα. Αυτό μπορεί να μειώσει την ποιότητα του ωοκυττάρου και να περιορίσει τις πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης. Εφαρμογές όπως η ωοθυλακική διέγερση και η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι σημαντικές για την ενίσχυση της λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων [75].
3. **Αποτυχία ωοθυλακικής ανάπτυξης:** Η αποτυχία των κοκκωδών κυττάρων να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε ατελή ωοθυλακική ανάπτυξη και υπογονιμότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου (π.χ., αποτυχία στη λειτουργία των gap junctions) μπορεί να απαιτήσει φαρμακευτική ή χειρουργική παρέμβαση για την αποκατάσταση της φυσιολογικής ανάπτυξης του ωοθυλακίου [75].

1.2.7.3 Δυνατότητες Εφαρμογών στη Βιοϊατρική και στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Η κατανόηση των ρόλων και των λειτουργιών των κοκκωδών κυττάρων έχει ανοίξει νέες δυνατότητες για τη βιοϊατρική και την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ορισμένες από τις πιο σημαντικές εφαρμογές περιλαμβάνουν [77]:

1. **Βελτίωση της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής:** Η έρευνα για τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων έχει επιτρέψει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η IVF και η ωοθηλακική διέγερση. Η χρήση των κοκκωδών κυττάρων για τη βελτίωση της ποιότητας των ωοκυττάρων και την αύξηση των ποσοστών επιτυχίας των θεραπειών υπογονιμότητας είναι μια από τις πιο καινοτόμες εφαρμογές της σύγχρονης αναπαραγωγικής ιατρικής.
2. **Αξιολόγηση και Διατήρηση της Γυναικείας Γονιμότητας:** Η κατανόηση του ρόλου των κοκκωδών κυττάρων στην αναπαραγωγική υγεία επιτρέπει την ανάπτυξη πιο εξειδικευμένων και ακριβών μεθόδων για την αξιολόγηση της γονιμότητας των γυναικών, καθώς και τη διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες που αντιμετωπίζουν προβλήματα λόγω ηλικίας ή άλλων αιτιών. Η κρυοσυντήρηση ωοθυλακίων, για παράδειγμα, είναι μια στρατηγική που εκμεταλλεύεται τις γνώσεις για την υποστήριξη των κοκκωδών κυττάρων, προκειμένου να διατηρηθεί η γονιμότητα για μελλοντική χρήση.
3. **Αναγεννητική Ιατρική:** Η αναγεννητική ιατρική εξετάζει τη δυνατότητα αναδημιουργίας ωοθυλακίων και την ενίσχυση της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέσω της αναγέννησης των κοκκωδών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας κύτταρα προγονικά ή άλλες μορφές αναγεννητικής θεραπείας, υπάρχει η δυνατότητα να αναπτυχθούν νέα ωοθυλάκια και να αποκατασταθεί η γονιμότητα σε γυναίκες με μειωμένο αποθεματικό ωοθυλακίων ή άλλες αναπαραγωγικές ανωμαλίες.

Συνολικά, τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν έναν κρίσιμο στόχο στην αναπαραγωγική ιατρική και τη θεραπεία υπογονιμότητας, προσφέροντας νέες δυνατότητες για βελτίωση της ποιότητας των θεραπειών και για την ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων στη γυναικεία αναπαραγωγική υγεία.

1.2.8 Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις για τη Μελέτη των Κοκκωδών Κυττάρων

Η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων είναι θεμελιώδης για την κατανόηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, των μηχανισμών γονιμοποίησης και της γυναικείας γονιμότητας γενικότερα. Η φύση των κοκκωδών κυττάρων, που περιβάλλουν το ωκύτταρο και αποτελούν βασικό συστατικό της αναπαραγωγικής διαδικασίας, απαιτεί την εφαρμογή διαφόρων επιστημονικών και τεχνικών προσεγγίσεων. Οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις για τη μελέτη αυτών των κυττάρων περιλαμβάνουν μια ποικιλία τεχνικών από τις βιολογικές, μοριακές, κυτταρολογικές και αναλυτικές επιστήμες. Ακολουθούν οι πιο διαδεδομένες και σημαντικές μέθοδοι [77,78]:

1.2.8.1 Κυτταρολογικές και ιστολογικές μέθοδοι

Οι κυτταρολογικές και ιστολογικές μέθοδοι είναι θεμελιώδεις για την παρατήρηση, την κατηγοριοποίηση και την κατανόηση της λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ανάλυση της μορφολογίας, της κυτταρικής διάταξης, των αλληλεπιδράσεων των κυττάρων, και της έκφρασης διαρθρωτικών και μοριακών χαρακτηριστικών. Η κυτταρολογική και ιστολογική προσέγγιση, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η χρώση, η μικροσκοπία φθορισμού, και η ηλεκτρονική μικροσκοπία, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της φυσιολογίας και της παθολογίας των κοκκωδών κυττάρων [77,78].

1.2.8.1.1 Κυτταρολογικές Μέθοδοι

Οι κυτταρολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των κυττάρων σε απομονωμένη κατάσταση, συχνά μέσω καλλιέργειας κυττάρων σε εργαστηριακές συνθήκες. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν τη μελέτη της κυτταρικής δομής, των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και της μοριακής δραστηριότητας των κοκκωδών κυττάρων. Απομόνωση και Καλλιέργεια Κοκκωδών Κυττάρων: Η απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από τις ωοθήκες είναι μια βασική διαδικασία που επιτρέπει τη μελέτη των κυττάρων σε απομονωμένο περιβάλλον. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει

την αποκόλληση των κυττάρων από τους ιστούς και την καλλιέργεια τους σε ειδικά διαμορφωμένα θρεπτικά υλικά. Η καλλιέργεια επιτρέπει την ανάλυση της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

- **Ανάλυση Κυτταρικής Δομής και Σύνθεσης:** Για να κατανοήσουμε την κυτταρική δομή και την κατανομή των συστατικών τους, οι μέθοδοι κυτταρολογικής χρώσης, όπως η Hematoxylin & Eosin (H&E) ή η Giemsa, χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση της κυτταρικής ανατομίας, της τοποθέτησης και της διαστρωμάτωσης των κοκκωδών κυττάρων σε ιστολογικά δείγματα.
- **Ανάλυση Κυτταρικής Κινητικότητας και Μοριακής Αντίδρασης:** Η κυτταρική κινητικότητα και η αντίδραση των κοκκωδών κυττάρων σε εξωτερικά σήματα είναι κεντρικά για την κατανόηση των διαδικασιών διαφοροποίησης και ανάπτυξης. Δοκιμασίες όπως wound healing assay και scratch assay επιτρέπουν την αξιολόγηση της κινητικότητας των κυττάρων, δίνοντας στοιχεία για την ικανότητά τους να κινηθούν και να αλληλεπιδράσουν με το περιβάλλον τους, ενώ δοκιμασίες proliferation assay (όπως η MTT assay) χρησιμοποιούνται για να μετρήσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

1.2.8.1.2 Ιστολογικές Μέθοδοι

Οι ιστολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανάλυση των κυττάρων σε πλήρη ιστολογικά δείγματα, επιτρέποντας την παρατήρηση της φυσιολογίας των κοκκωδών κυττάρων σε τοπικό και ολόκληρο ιστό. Οι μέθοδοι αυτές είναι κρίσιμες για την κατανόηση της ρυθμιστικής διάταξης και της αλληλεπίδρασης των κοκκωδών κυττάρων με το ωκύτταρο και άλλα γύρω κύτταρα του ωοθυλακίου [79].

- **Μελέτη Ιστολογικών Δειγμάτων:** Τα ιστολογικά δείγματα λαμβάνονται από τις ωοθήκες με βιοψία και περιλαμβάνουν μονιμοποίηση των ιστών, με τη χρήση φορμαλίνης και παραφίνης. Ακολουθεί η διάτμηση των δειγμάτων με μικροτόμο για τη δημιουργία πολύ λεπτών τομών που επιτρέπουν τη μελέτη της κυτταρικής δομής.

- **Χρώση Ιστολογικών Δειγμάτων:** Η χρώση αποτελεί σημαντική διαδικασία στην ιστολογία για την ενίσχυση της ορατότητας των κυττάρων και των δομών τους. Η H&E χρώση είναι η πιο κοινή μέθοδος για την παρατήρηση γενικών κυτταρικών δομών, ενώ η PAS (Periodic Acid-Schiff) χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των γλυκοζαμινογλυκανών που ενδέχεται να παράγονται από τα κοκκωδών κύτταρα. Η immunohistochemistry (IHC), χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών μορίων που είναι σημαντικά για τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων.
- **Μικροσκοπία Φθορισμού και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία:** Οι τεχνικές φθορισμού επιτρέπουν τη στοχευμένη απεικόνιση των διαρθρωτικών και μοριακών στοιχείων των κοκκωδών κυττάρων μέσω της χρήσης φθορισμόμενων δεικτών. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM) παρέχει εξαιρετικά υψηλή ανάλυση της μικροδομής των κοκκωδών κυττάρων και των αλληλεπιδράσεών τους με τα γειτονικά κύτταρα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανάλυση της δομής των gap junctions και άλλων κυτταρικών επαφών, οι οποίες είναι κρίσιμες για την αλληλεπίδραση των κοκκωδών κυττάρων με το ωκύτταρο και για τη σηματοδότηση στην ανάπτυξη του ωθυλακίου.

1.2.8.2 Γονιδιακή Ανάλυση και Ανάλυση Έκφρασης Γονιδίων

Η γονιδιακή ανάλυση και η ανάλυση έκφρασης γονιδίων είναι κρίσιμες μέθοδοι για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων και τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του ωθυλακίου, την ποιότητα του ωκυττάρου και τη γονιμοποίηση. Οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν την ανίχνευση, τη μελέτη και την ποσοτική αξιολόγηση των γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκωδών κύτταρα και παρέχουν πληροφορίες για τη μοριακή ρύθμιση και τους μηχανισμούς διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων [80–82].

Γονιδιακή Ανάλυση

Η γονιδιακή ανάλυση αναφέρεται στη μελέτη των γονιδίων, των γενετικών αλληλουχιών και των μεταλλάξεων που ενδέχεται να επηρεάζουν τη λειτουργία και τη συμπεριφορά των κοκκωδών κυττάρων. Οι σύγχρονες τεχνικές γονιδιακής ανάλυσης

επιτρέπουν την αναγνώριση συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, τη ρύθμιση της ωορρηξίας και την ποιότητα των ωαρίων.

- **Αναγνώριση Γενετικών Αλληλουχιών:** Η ανάλυση της γονιδιακής αλληλουχίας περιλαμβάνει την εφαρμογή τεχνικών PCR (Polymerase Chain Reaction) και Sequencing (Αλληλουχία DNA) για την αναγνώριση και απομόνωση συγκεκριμένων γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκωδών κύτταρα. Μέσω της αλληλούχισης DNA, μπορούμε να εντοπίσουμε τη δομή και την κανονικότητα των γονιδίων που ρυθμίζουν τη λειτουργία αυτών των κυττάρων, καθώς και να εντοπίσουμε τυχόν μεταλλάξεις ή παραλλαγές που ενδέχεται να επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα.
- **Γονιδιακές Μεταλλάξεις και Πολυμορφισμοί:** Οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί στο DNA των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων και να συμβάλλουν σε καταστάσεις υπογονιμότητας ή άλλες αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες. Η μελέτη αυτών των γενετικών διαφορών παρέχει πληροφορίες για την αναγνώριση κινδύνων και για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών.
- **Γονιδιακές Μικροαλλαγές και Σύνθετοι Ρύθμιστικοί Μηχανισμοί:** Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφής και επιγενετικής μελέτης αποκαλύπτει πως συγκεκριμένα γονίδια αλληλεπιδρούν και συντονίζονται για τη ρύθμιση των κυτταρικών διαδικασιών, όπως η διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, η ανάπτυξη του ωοθυλακίου και η ωορρηξία. Αυτές οι γονιδιακές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση των γοναδοτροπινών, αυξητικών παραγόντων, και της στεροειδογένεσης.

Ανάλυση Έκφρασης Γονιδίων

Η ανάλυση έκφρασης γονιδίων είναι η διαδικασία μέτρησης του επιπέδου των μεταγραφικών προϊόντων ενός γονιδίου (RNA) για να κατανοήσουμε την ενεργό δραστηριότητα των γονιδίων σε συγκεκριμένα κυτταρικά περιβάλλοντα, όπως τα κοκκωδών κύτταρα. Μέσω αυτής της ανάλυσης, μπορούμε να αναγνωρίσουμε τα

γονίδια που εκφράζονται ενεργά και να συνδέσουμε αυτή την έκφραση με τις κυτταρικές λειτουργίες, τις αλληλεπιδράσεις με άλλα κύτταρα, και την ανάπτυξη του ωοθυλακίου [83,84].

- **Reverse Transcription PCR (RT-PCR):** Η RT-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της RNA έκφρασης των γονιδίων. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη μετατροπή του RNA σε cDNA και την ανάλυση της ποσότητας του cDNA που σχετίζεται με την έκφραση των γονιδίων στα κοκκωδών κύτταρα. Μέσω της RT-PCR, μπορούμε να αξιολογήσουμε τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση των κοκκωδών κυττάρων.
- **Μικροσυστοιχίες (Microarrays) και RNA-Seq:** Οι τεχνικές microarrays και RNA-Seq παρέχουν δυνατότητες για τη μελέτη του συνολικού προφίλ έκφρασης γονιδίων σε έναν οργανισμό ή σε έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρου, όπως τα κοκκωδών κύτταρα. Η RNA-Seq είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, καθώς επιτρέπει την ανάλυση όλων των RNA μορίων (μεταγραφών) του γονιδιώματος, προσδιορίζοντας ποια γονίδια εκφράζονται και ποια είναι τα επίπεδα της έκφρασης τους σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου.
- **Quantitative PCR (qPCR):** Η qPCR επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων, με βάση την παρακολούθηση της ενίσχυσης του DNA σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με ορμόνες όπως η FSH, η LH, και άλλοι αυξητικοί παράγοντες.

Γονιδιακή Έκφραση και Ρυθμιστικοί Μηχανισμοί

Η γονιδιακή έκφραση στα κοκκωδών κύτταρα είναι ρυθμιζόμενη από πολύπλοκους μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν την επιγενετική ρύθμιση, τα σήματα που λαμβάνονται από το εξωτερικό περιβάλλον (όπως οι γοναδοτροπίνες και οι αυξητικοί παράγοντες), και τις ενδογενείς ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Αυτές οι διακυμάνσεις στην έκφραση γονιδίων σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, την πολλαπλασιαστική ικανότητα,

την ικανότητα στεροειδογένεσης και την υποστήριξη του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου [85,86].

- **Επιγενετική Ρύθμιση:** Η επιγενετική ρύθμιση είναι κρίσιμη για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά των κοκκωδών κυττάρων. Εξετάζοντας τις επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA και η ιστομεθυλίωση, μπορούμε να κατανοήσουμε πώς οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ή οι γονιδιακές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων.
- **Αλληλεπίδραση με Αύξηση Παραγόντων και Γοναδοτροπίνες:** Η γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων επηρεάζεται από εξωτερικά σήματα όπως οι γοναδοτροπίνες (FSH, LH), οι οποίες ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, καθώς και την παραγωγή ορμονών και αυξητικών παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την ωρίμανση του ωοθυλακίου και την ωοθηλακιορρηξία.

1.2.8.3 Ανάλυση Προφίλ Πρωτεϊνών και Πρωτεομική Ανάλυση

Η ανάλυση του προφίλ πρωτεϊνών και η πρωτεομική ανάλυση είναι κρίσιμες τεχνικές που επιτρέπουν την εις βάθος κατανόηση της λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων μέσω της μελέτης των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα. Αυτές οι τεχνικές συμβάλλουν σημαντικά στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την υποστήριξη της ωοκυτταρικής ωρίμανσης, καθώς οι πρωτεΐνες αποτελούν τους κύριους τελεστές των κυτταρικών διαδικασιών.

Ανάλυση Προφίλ Πρωτεϊνών

Η ανάλυση του προφίλ πρωτεϊνών (ή προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης) περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, όπως τα κοκκώδη κύτταρα. Μέσω αυτής της διαδικασίας, μπορούμε να εντοπίσουμε ποια πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες

και να προσδιορίσουμε τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες ή κυτταρικές δομές [87,88].

- **Διαχωρισμός Πρωτεϊνών:** Το πρώτο βήμα σε μια ανάλυση προφίλ πρωτεϊνών είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα κυτταρικά δείγματα. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται συνήθως μέσω ηλεκτροφόρησης (όπως η SDS-PAGE), η οποία διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθός τους. Άλλες μέθοδοι, όπως η ισοηλεκτρική εστίαση, διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το pH του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Στη συνέχεια, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες αναλύονται περαιτέρω για να εντοπιστούν τα χαρακτηριστικά τους.
- **Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών:** Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση τεχνικών όπως η μαζική φασματομετρία (Mass Spectrometry, MS), η οποία παρέχει ακριβείς πληροφορίες για την ακολουθία αμινοξέων, το μόρια μάζας και άλλες δομικές πληροφορίες των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας τη φασματομετρία μάζας, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε εκατοντάδες ή και χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στα κοκκωδών κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα αναγνωρίζουμε τυχόν τροποποιήσεις (όπως η φωσφορυλίωση) που συμβαίνουν στις πρωτεΐνες αυτές.
- **Ποσοτική Ανάλυση Πρωτεϊνών:** Η ποσοτική ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης μπορεί να γίνει με την εφαρμογή ισχυρών τεχνικών, όπως η πρωτεομική ανάλυση υψηλής απόδοσης (high-throughput proteomics). Μέσω αυτής, μπορούμε να μετρήσουμε τα επίπεδα των πρωτεϊνών σε διάφορες συνθήκες ή στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και να συνδέσουμε τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση με τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων.

Πρωτεομική Ανάλυση

Η πρωτεομική ανάλυση είναι μια εξελιγμένη προσέγγιση για την ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και τον χαρακτηρισμό του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα κυτταρικό τύπο ή σε έναν ιστό. Η πρωτεομική μελέτη των κοκκωδών κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση της βιολογίας αυτών των κυττάρων και της

συμμετοχής τους στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ποιότητα του ωοκυττάρου [89,90].

- **Στρατηγικές Πρωτεομικής Ανάλυσης:** Η πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιεί μια σειρά από τεχνικές για την ανακάλυψη και ανάλυση των πρωτεϊνών. Οι δύο κυριότερες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται είναι:
 - **Bottom-up προσέγγιση:** Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει την διάσπαση των πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτίδια μέσω ενζυμικής διάσπασης (όπως η τρυψίνη), και στη συνέχεια την ανάλυση αυτών των πεπτιδίων μέσω φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.
 - **Top-down προσέγγιση:** Αντί να αναλύονται τα πεπτίδια, η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρων πρωτεϊνών στην αρχική τους μορφή. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανάλυση μεγάλων, πολύπλοκων πρωτεϊνών και για την ανίχνευση πρωτεϊνικών τροποποιήσεων.
- **Αναλυτική Χρησιμότητα:** Η πρωτεομική ανάλυση μας επιτρέπει να αναγνωρίσουμε τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην υποστήριξη του ωοκυττάρου, στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ωορρηξία. Εντοπίζουμε πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόκριση σε γοναδοτροπίνες και αυξητικούς παράγοντες, την επιδιόρθωση των κυτταρικών βλαβών και τη μεταβολική υποστήριξη των κοκκωδών κυττάρων.
- **Αξιολόγηση Πρωτεϊνικών Τροποποιήσεων:** Η ανάλυση των τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, όπως η φωσφορυλίωση, η γλυκοζυλίωση και η ακετυλίωση, είναι επίσης κρίσιμη, καθώς αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν τη λειτουργία και την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να προσδιορίσουν ποιοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται σε επίπεδο κυττάρου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ωοθυλακίου και πώς αυτά τα σήματα οδηγούν στην απόφαση για την ωορρηξία.

Χρήση Πρωτεομικής Ανάλυσης στη Βιοϊατρική και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Η πρωτεομική ανάλυση έχει πρακτική εφαρμογή στην ιατρική έρευνα και στη βιοϊατρική, με ιδιαίτερη έμφαση στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και τις θεραπείες υπογονιμότητας. Οι βασικοί τομείς εφαρμογής περιλαμβάνουν [91–93]:

- **Αναγνώριση Βιοδεικτών:** Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση νέων βιοδεικτών για την ποιότητα των ωοκυττάρων και την επιτυχία της γονιμοποίησης. Αυτοί οι βιοδείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης ή για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών.
- **Κατανόηση Υπογονιμότητας:** Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της υπογονιμότητας, εντοπίζοντας ανωμαλίες στην πρωτεϊνική έκφραση που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, την ποιότητα των ωαρίων και την ικανότητα για γονιμοποίηση.
- **Βελτίωση Θεραπευτικών Στρατηγικών:** Με τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τις διαδικασίες αυτές, μπορούμε να αναπτύξουμε καλύτερες στρατηγικές θεραπείας για γυναίκες με υπογονιμότητα, αξιοποιώντας τη γνώση που αποκτούμε από τις πρωτεομικές αναλύσεις.

1.2.8.4 Κυτταρική καλλιέργεια και Πειράματα Κινητικότητας και Πολλαπλασιασμού

Η κυτταρική καλλιέργεια και τα πειράματα κινητικότητας και πολλαπλασιασμού είναι θεμελιώδεις προσεγγίσεις για τη μελέτη της βιολογίας των κοκκωδών κυττάρων, καθώς επιτρέπουν την απομόνωση και την παρακολούθηση των διαδικασιών διαφοροποίησης, ανάπτυξης και λειτουργίας αυτών των κυττάρων σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Η καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων και η μελέτη της κινητικότητας και του πολλαπλασιασμού τους είναι κρίσιμη για την κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου και τη λειτουργία των ωοθηκών [78,94,95].

Κυτταρική Καλλιέργεια Κοκκωδών Κυττάρων

Η καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να διατηρηθούν τα κύτταρα ζωντανά και λειτουργικά εκτός του οργανισμού, παρέχοντας ένα εξαιρετικό μοντέλο για μελέτες *in vitro*. Η καλλιέργεια αυτών των κυττάρων επιτρέπει την παρακολούθηση των διαδικασιών διαφοροποίησης, την εξέταση της ανταπόκρισής τους σε εξωτερικούς παράγοντες και τη διερεύνηση της λειτουργίας τους σε συνθήκες που μιμούνται εκείνες του οργανισμού.

- **Πηγή και Απομόνωση Κοκκωδών Κυττάρων:** Τα κοκκώδη κύτταρα συνήθως απομονώνονται από τις ωοθήκες σε διάφορα στάδια ωοθυλακικής ανάπτυξης, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η αναρρόφηση ή η ενζυμική διάσπαση του ιστού. Μετά την απομόνωση, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικά μέσα που παρέχουν τα θρεπτικά συστατικά και τις αυξητικές ουσίες που απαιτούνται για την επιβίωσή τους.
- **Μέσα Καλλιέργειας και Συνθήκες Καλλιέργειας:** Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων απαιτεί ειδικά μέσα, τα οποία περιλαμβάνουν αμινοξέα, βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες, όπως η FSH και η LH, οι οποίες επηρεάζουν τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξή τους. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (37°C), υγρασίας και συγκέντρωσης CO₂ (5%).
- **Στρατηγικές Επιβίωσης και Διέγερσης:** Για την επίτευξη της επιβίωσης των κοκκωδών κυττάρων, τα μέσα καλλιέργειας πρέπει να περιέχουν θρεπτικά συστατικά που υποστηρίζουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα, καθώς και αυξητικούς παράγοντες που ενισχύουν την ανάπτυξή τους. Ειδικά μέσα που περιέχουν ορμόνες όπως η FSH ενισχύουν τη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, ενώ η LH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση της ωορρηξίας σε πειράματα.

Πειράματα Κινητικότητας των Κοκκωδών Κυττάρων

Η κινητικότητα των κοκκωδών κυττάρων είναι ένας σημαντικός δείκτης της ικανότητας τους να ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα και να αλληλεπιδρούν με άλλες

κυτταρικές δομές. Η κινητικότητα είναι κρίσιμη για τη διαδικασία της ωοθυλακικής ανάπτυξης, καθώς τα κοκκωδών κύτταρα πρέπει να μεταναστεύσουν και να επεκταθούν γύρω από το ωοκύτταρο κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου [96–98].

- **Δοκιμασία Μετακίνησης (Migration Assay):** Η κινητικότητα των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση διαφόρων πειραματικών μεθόδων, όπως wound healing assay, όπου στα κύτταρα δημιουργείται μια διαμήκης αμυχή και στη συνέχεια παρακολουθείται η ικανότητά τους να καλύπτουν το κενό που δημιουργήθηκε. Αυτό το σύστημα αξιολογεί τη διακυτταρική επικοινωνία και τη δυναμική μετακίνησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επισκευής του ιστού.
- **Κινητικότητα και Ρυθμιστικοί Μηχανισμοί:** Πειράματα κινητικότητας των κοκκωδών κυττάρων μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν μεταναστευτικά μονοπάτια μέσω της εφαρμογής διαφόρων μοριακών ερεθισμάτων, όπως αυξητικοί παράγοντες (π.χ. EGF, FGF) ή γοναδοτροπίνες. Εξετάζοντας την επίδραση αυτών των παραγόντων στην κινητικότητα των κοκκωδών κυττάρων, είναι δυνατόν να κατανοήσουμε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που συντονίζουν τη διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ωοθυλακίου.

Πειράματα Πολλαπλασιασμού των Κοκκωδών Κυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων αποτελεί βασικό στάδιο στην ανάπτυξή τους και στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Η ικανότητα των κοκκωδών κυττάρων να διαιρούνται και να επεκτείνονται είναι καθοριστική για τη δημιουργία της σωστής κυτταρικής μάζας γύρω από το ωοκύτταρο, προκειμένου να υποστηριχθεί η ανάπτυξή του [99,100].

- **Αξιολόγηση Πολλαπλασιασμού (Proliferation Assay):** Οι δοκιμασίες πολλαπλασιασμού χρησιμοποιούν συνήθως δείκτες της κυτταρικής διαιρέσεως, όπως το BrdU (bromodeoxyuridine) ή το Ki67, που επισημαίνουν τα κύτταρα που είναι ενεργά στο κυτταρικό κύκλο. Αυτές οι μέθοδοι παρέχουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό των κοκκωδών κυττάρων που διαιρούνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες ή μετά την εφαρμογή μιας θεραπείας ή ενός αυξητικού παράγοντα.

- **Μοριακοί Μηχανισμοί Πολλαπλασιασμού:** Η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την κυτταρική διάκριση και επέκταση. Γοναδοτροπίνες, αυξητικοί παράγοντες και άλλα βιολογικά σήματα είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη διαδικασία αυτή μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το PI3K-Akt και το MAPK.

1.2.8.5 Ανάλυση Ενδοκρινικής Δραστηριότητας και Σηματοδοτικών Μονοπατιών

Η ανάλυση της ενδοκρινικής δραστηριότητας και των σηματοδοτικών μονοπατιών των κοκκωδών κυττάρων είναι κρίσιμη για την κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών που ελέγχουν την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, την ωοθηκική λειτουργία και τη γυναικεία αναπαραγωγική υγεία. Τα κοκκώδη κύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο στην παραγωγή ορμονών και στην αλληλεπίδραση με άλλες κυτταρικές δομές μέσω μιας πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κανονικότητα των αναπαραγωγικών διαδικασιών.

Ενδοκρινική Δραστηριότητα των Κοκκωδών Κυττάρων

Η ενδοκρινική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση σημαντικών ορμονών που ρυθμίζουν τη λειτουργία των ωοθηκών και τη γυναικεία αναπαραγωγική διαδικασία. Τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν κυρίως οιστρογόνα, αλλά επίσης συνθέτουν άλλες ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες που υποστηρίζουν τη διαδικασία της ωορρηξίας και την ανάπτυξη του ωοθυλακίου [101–103].

- **Οιστρογόνα:** Τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνουν οιστρογόνα, κυρίως το 17β-οιστραδιόλη, που είναι υπεύθυνο για την ανατροφοδότηση των ορμονών της υπόφυσης, καθώς και την ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων. Τα οιστρογόνα επηρεάζουν την ωοθυλακική ανάπτυξη, το σχηματισμό των γυναικείων αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών και την προετοιμασία του ενδομητρίου για εμφύτευση.

- **Αυξητικοί Παράγοντες:** Τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες όπως ο EGF (Epidermal Growth Factor) και ο FGF (Fibroblast Growth Factor), οι οποίοι ρυθμίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ωοθυλακίων και των κυττάρων θήκης. Η αυξητική αυτή δραστηριότητα έχει αντίκτυπο στην κυτταρική αναπαραγωγή και στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων.

Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Ρύθμιση των Κοκκωδών Κυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους και με άλλες κυτταρικές δομές μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τις διαδικασίες ανάπτυξης, διαφοροποίησης και λειτουργίας των ωοθυλακίων. Τα σήματα αυτά περιλαμβάνουν κυρίως τις γοναδοτροπίνες, τις αυξητικές ουσίες και τα μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη γονιμοποίηση. Ορισμένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια σηματοδότησης περιλαμβάνουν τα εξής:

α. Σηματοδότηση μέσω FSH και LH (Γοναδοτροπίνες)

Οι γοναδοτροπίνες FSH και LH, που εκκρίνονται από την υπόφυση, είναι τα κεντρικά σήματα που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωορρηξία. Τα κοκκώδη κύτταρα είναι ευαίσθητα στις γοναδοτροπίνες, οι οποίες ενεργοποιούν μια σειρά από σηματοδοτικά μονοπάτια, κυρίως μέσω της δραστηριότητας της κυκλικής AMP (cAMP) και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Τα μονοπάτια αυτά ενισχύουν την παραγωγή οιστρογόνων και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων [104,105].

- **FSH-Ρυθμιζόμενη Σηματοδότηση:** Η σύνδεση του FSH με τον υποδοχέα FSH (FSH-R) στα κοκκωδών κύτταρα ενεργοποιεί το μονοπάτι cAMP/PKA, το οποίο ενισχύει τη σύνθεση και την έκκριση οιστρογόνων.
- **LH-Ρυθμιζόμενη Σηματοδότηση:** Η LH, μέσω του υποδοχέα LH (LH-R), ενεργοποιεί το μονοπάτι cAMP, το οποίο στη συνέχεια οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή αυξητικών παραγόντων και στην ωορρηξία.

β. Σηματοδότηση μέσω PI3K/Akt και MAPK

- **PI3K/Akt Σηματοδότηση:** Η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) /Akt (Protein kinase B) είναι σημαντική για την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων. Η ενεργοποίηση της

Akt επηρεάζει τη μετάφραση του DNA, ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων και συμβάλλει στη μείωση του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Η σηματοδότηση μέσω PI3K/Akt είναι επίσης εμπλεκόμενη στη σύνθεση πρωτεϊνών που υποστηρίζουν τη γονιμοποίηση [106].

- **MAPK Σηματοδότηση:** Το μονοπάτι MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) είναι επίσης κρίσιμο για την κυτταρική διαφοροποίηση και την ωορρηξία. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK μέσω FSH ή LH ενισχύει την παραγωγή οιστρογόνων και αυξητικών παραγόντων, και ενδέχεται να ενεργοποιήσει άλλους μηχανισμούς ρύθμισης για τη σύνθεση των γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων [107].

γ. Σηματοδότηση μέσω TGF-β και Inhibins

- **TGF-β (Transforming Growth Factor-β):** Οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας TGF-β, όπως οι Activins και οι Inhibins, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των ορμονών και στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η σηματοδότηση μέσω αυτών των παραγόντων ρυθμίζει την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων και την παραγωγή οιστρογόνων [108].
- **Inhibins:** Οι Inhibins εκκρίνονται από τα κοκκωδών κύτταρα και αναστέλλουν την παραγωγή FSH από την υπόφυση, συμμετέχοντας στη ρύθμιση της ανατροφοδότησης του κύκλου ωοθυλακικής ανάπτυξης [109].

δ. Σηματοδότηση μέσω Wnt/β-catenin και Notch

- **Wnt/β-catenin Σηματοδότηση:** Το μονοπάτι Wnt/β-catenin είναι επίσης ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Το Wnt ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τη διαφοροποίηση και τη μεταναστευτική ικανότητα των κοκκωδών κυττάρων. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού προάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωορρηξία.
- **Notch Σηματοδότηση:** Το μονοπάτι Notch εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση και επικοινωνία. Η σηματοδότηση μέσω του Notch επηρεάζει την ανάπτυξη και την επιβίωση των κοκκωδών κυττάρων και την αλληλεπίδραση τους με τα ωοκύτταρα.

1.2.9 Τεχνικές απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων

Η απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό ή τον ιστό των ωοθηκών είναι μια κρίσιμη διαδικασία για τη μελέτη της λειτουργίας τους, των σηματοδοτικών μονοπατιών τους, καθώς και των ρόλων τους στη φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος. Η ακριβής απομόνωση αυτών των κυττάρων απαιτεί την εφαρμογή εξειδικευμένων τεχνικών που επιτρέπουν την απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων με υψηλή καθαρότητα και βιωσιμότητα, ενώ παράλληλα διατηρείται η φυσιολογική τους κατάσταση. Οι κυριότερες μέθοδοι απομόνωσης περιλαμβάνουν τη μηχανική απομόνωση, την ένζυμική απομόνωση και τις σύγχρονες τεχνικές διαχωρισμού με κυτταρομετρία ροής (FACS), καθώς και τη μαγνητική απομόνωση [78,86,110–115].

1.2.9.1 Μηχανική Απομόνωση (*Mechanical Isolation*)

Η μηχανική απομόνωση είναι μια παραδοσιακή και απλή μέθοδος για την απομόνωση κυττάρων από τον ιστό, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στις επιστημονικές έρευνες όταν απαιτείται ο διαχωρισμός κυττάρων με τρόπο που να διατηρεί την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητά τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μηχανική απομόνωση χρησιμοποιείται για την απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από τον ωοθηκικό ιστό ή το ωοθυλακικό υγρό, με στόχο την απομόνωση αυτών των κυττάρων σε συνθήκες που να επιτρέπουν περαιτέρω ανάλυση ή χρήση τους σε καλλιέργειες.

Η διαδικασία αυτή συνήθως ακολουθεί τα εξής βήματα:

Προετοιμασία του Ιστού και Απομόνωση των Ωοθυλακίων

Στην αρχή της διαδικασίας, ο ωοθηκικός ιστός ή το ωοθυλακικό υγρό πρέπει να συλλεχθούν προσεκτικά από τις ωοθήκες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω μικροχειρουργικών τεχνικών ή με τη χρήση βελόνων και συρίγγων μικρής διαμέτρου για να απομονωθούν τα ωοθυλάκια από τον περιβάλλοντα ωοθηκικό ιστό. Ωοθηκικός ιστός μπορεί να απομονωθεί με ακρίβεια από το περιβάλλον του, χωρίς να προκαλούνται μηχανικές βλάβες, χρησιμοποιώντας είτε φυσικές μεθόδους είτε με ειδικές χειρουργικές διαδικασίες.

Απομόνωση και Καθαρισμός των Κοκκωδών Κυττάρων

Η αποκόλληση των κοκκωδών κυττάρων από τα ωοθυλάκια γίνεται με τη βοήθεια της φυγοκέντρωσης, η οποία βοηθά στον διαχωρισμό των κυττάρων από άλλα συστατικά του υγρού, όπως τα κύτταρα θήκης ή τα ωοκύτταρα. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρείται σε χαμηλές ταχύτητες για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κυττάρων με βάση το βάρος και την πυκνότητά τους. Τα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία έχουν μια μικρότερη πυκνότητα από άλλα κυτταρικά στοιχεία, συγκεντρώνονται σε ανώτερο επίπεδο, ενώ τα άλλα κύτταρα (π.χ. τα ωοκύτταρα) καταλήγουν στον πυθμένα του δοχείου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται φίλτρα με μικρές διαμέτρους για να διαχωρίσουν τα κοκκωδών κύτταρα από τα υπολείμματα άλλων κυττάρων ή τοξικών ουσιών που μπορεί να υπάρχουν στο διάλυμα.

Έλεγχος Καθαρότητας και Βιωσιμότητας

Μια από τις κύριες προκλήσεις στην μηχανική απομόνωση είναι η διατήρηση της καθαρότητας των απομονωμένων κοκκωδών κυττάρων και η αποφυγή οποιασδήποτε τοξικότητας ή κατεστραμμένων κυττάρων κατά τη διαδικασία. Η καθαρότητα των κυττάρων μπορεί να ελεγχθεί μέσω μικροσκοπίας, χρησιμοποιώντας χρώματα ή αντισώματα για τη σήμανση των κοκκωδών κυττάρων και τη διάκριση από άλλους τύπους κυττάρων. Για τη διατήρηση της βιωσιμότητας, χρησιμοποιούνται καλλιέργειες κυττάρων ή δείγματα χρωματογραφίας που επιτρέπουν την παρακολούθηση της λειτουργικότητας των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο.

Η μηχανική απομόνωση, αν και αποτελεσματική για τη διατήρηση της φυσιολογίας των κυττάρων και εύκολη στην εφαρμογή, ενδέχεται να οδηγήσει σε μειωμένη καθαρότητα σε σχέση με άλλες μεθόδους, όπως η ενζυμική απομόνωση ή η μαγνητική απομόνωση. Ωστόσο, παραμένει η προτιμώμενη μέθοδος σε περιπτώσεις όπου είναι σημαντικό να διατηρηθεί η ανατομική ακεραιότητα των κυττάρων και να αποφεύγεται η βλάβη τους από χημικές ουσίες ή ένζυμα.

Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Μηχανικής Απομόνωσης

Πλεονεκτήματα:

- **Φυσική αποκόλληση:** Η μηχανική αποκόλληση των κυττάρων από τα ωοθυλάκια μπορεί να διατηρήσει την ανατομική ακεραιότητα των κυττάρων χωρίς τη χρήση χημικών ή τοξικών ουσιών.
- **Απλότητα και ευκολία:** Η μηχανική απομόνωση είναι μία σχετικά απλή διαδικασία που δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό ή χημικά.
- **Καλή διατήρηση της φυσιολογίας των κυττάρων:** Καθώς η διαδικασία δεν περιλαμβάνει την έκθεση σε ένζυμα ή άλλες χημικές ουσίες, η φυσιολογία των κυττάρων μπορεί να διατηρηθεί καλύτερα, με ελάχιστες μεταβολές στις συνθήκες τους.

Περιορισμοί:

- **Χαμηλότερη καθαρότητα:** Τα κύτταρα μπορεί να μην είναι τόσο καθαρά, καθώς τα άλλα κυτταρικά συστατικά, όπως τα κύτταρα θήκης ή τα ωοκύτταρα, μπορεί να παραμείνουν στην τελική συλλογή.
- **Διαφορετική βιωσιμότητα:** Η μηχανική διαδικασία μπορεί να προκαλέσει τραυματισμούς στα κύτταρα, γεγονός που μειώνει τη βιωσιμότητά τους σε σύγκριση με άλλες μεθόδους απομόνωσης.

1.2.9.2 Ενζυμική Απομόνωση

Η ενζυμική απομόνωση αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες και αποδοτικές μεθόδους για την απομόνωση κυττάρων από ιστούς και υγρά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ενζυμική απομόνωση χρησιμοποιείται για την απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από τα ωοθυλάκια και τον ωοθηκικό ιστό, με τη χρήση ειδικών ενζύμων που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία και επιτρέπουν την αποδέσμευση των κυττάρων χωρίς να προκαλούν βλάβες στην ακεραιότητά τους [116,117].

Η ενζυμική απομόνωση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αποδέσμευση και απομόνωση κυττάρων από ιστούς με ιδιαίτερα ισχυρούς ή πυκνούς συνδετικούς ιστούς, όπως οι ωοθήκες, όπου τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε ένα πυκνό δίκτυο εξωκυττάρων

πρωτεϊνών και συστατικών. Ο στόχος είναι να διατηρηθεί η ακεραιότητα των κυττάρων, ενώ παράλληλα να διασπαστούν τα δομικά συστατικά που συγκρατούν τα κύτταρα ενωμένα.

Στάδια Ενζυμικής Απομόνωσης

Η ενζυμική απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από τα ωοθυλάκια περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Συλλογή και Προετοιμασία Ιστολογικού Δείγματος

Το πρώτο βήμα στην ενζυμική απομόνωση είναι η προετοιμασία του δείγματος. Ο ωοθηκικός ιστός ή το ωοθυλακικό υγρό συλλέγεται μέσω μικροχειρουργικών διαδικασιών ή άλλων τεχνικών που επιτρέπουν τη διατήρηση του ιστού ή του υγρού χωρίς να προκαλείται σημαντική βλάβη στα κυτταρικά στοιχεία. Τα ωοθυλάκια που περιέχουν τα κοκκώδη κύτταρα απομονώνονται και προετοιμάζονται για την επεξεργασία με τα ένζυμα.

Επιλογή Ενζύμων για Απομόνωση

Η επιλογή των ενζύμων είναι κρίσιμη για την επιτυχία της διαδικασίας, καθώς τα ένζυμα πρέπει να διασπούν την εξωκυττάρια μήτρα και να αποδεσμεύσουν τα κοκκώδη κύτταρα χωρίς να τα καταστρέψουν. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται τα εξής ένζυμα:

- **Κολλαγενάση (Collagenase):** Η κολλαγενάση διασπά το κολλαγόνο, το βασικό συστατικό του συνδετικού ιστού, επιτρέποντας την αποδέσμευση των κυττάρων από τον ιστό.
- **Υαλουρονιδάση (Hyaluronidase):** Το ένζυμο αυτό διασπά το υαλουρονικό οξύ, ένα σημαντικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας που συγκρατεί τα κύτταρα.
- **Δεσμονολυτικά ένζυμα (Disaggregating enzymes):** Ορισμένα ένζυμα, όπως η βρωμελαΐνη και η αλτάση, χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση των δεσμών μεταξύ των κυττάρων, χωρίς να προκαλούν βλάβη στην κυτταρική τους δομή.

Τα ένζυμα προστίθενται στο δείγμα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και θερμοκρασία για να διασπάσουν τη μήτρα των κυττάρων χωρίς να επηρεάσουν τη βιωσιμότητά τους.

Επαγόμενη Διάσπαση και Αποδέσμευση Κυττάρων

Μετά την προσθήκη των ενζύμων, το δείγμα αναμιγνύεται προσεκτικά, ώστε τα ένζυμα να κατανεμηθούν ομοιόμορφα και να αρχίσουν τη διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει από μερικά λεπτά έως μία ώρα, ανάλογα με τον τύπο του ιστού και τη συγκέντρωση των ενζύμων. Συνήθως, η διαδικασία παρακολουθείται συνεχώς με μικροσκόπιο για να διασφαλιστεί ότι τα κοκκώδη κύτταρα αποδεσμεύονται σωστά και δεν θα υποστούν βλάβη.

Απομάκρυνση των Ενζύμων και Καθαρισμός των Κυττάρων

Μετά την ολοκλήρωση της διάσπασης της εξωκυττάριας μήτρας, τα ένζυμα απομακρύνονται χρησιμοποιώντας διάλυμα πλύσης ή φυγοκέντρωση. Η φυγοκέντρωση επιτρέπει τη συγκέντρωση των κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα, απομακρύνοντας ταυτόχρονα τα ένζυμα και άλλα περιττά συστατικά. Στη συνέχεια, τα κοκκωδών κύτταρα πλένονται επανειλημμένα με ένα ειδικό διάλυμα (όπως PBS) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων των ενζύμων και άλλων τοξικών ουσιών.

Επαλήθευση της Καθαρότητας και Βιωσιμότητας των Κυττάρων

Αφού τα κοκκώδη κύτταρα απομονωθούν, γίνεται έλεγχος της καθαρότητας των κυττάρων, προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η απομόνωση ήταν επιτυχής. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω μικροσκοπίας, χρωματογραφίας ή με τη χρήση μοριακών μεθόδων, όπως η PCR, για την ανίχνευση χαρακτηριστικών γονιδίων των κοκκωδών κυττάρων.

Επιπλέον, πραγματοποιείται έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων με χρώση ζωντανών και νεκρών κυττάρων, όπως η χρήση του προσδιορισμού της ζωτικότητας με τη μέθοδο του Trypan Blue, ή άλλες μεθόδους που επιτρέπουν την αξιολόγηση της κυτταρικής ζωτικότητας.

Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Ενζυμικής Απομόνωσης

Πλεονεκτήματα:

- **Υψηλή απόδοση και καθαρότητα:** Η ενζυμική απομόνωση προσφέρει υψηλή καθαρότητα των κοκκωδών κυττάρων, καθώς τα ένζυμα επιτρέπουν τη διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας χωρίς να προκαλούν σημαντική βλάβη στα κύτταρα.

- **Μειωμένος μηχανικός τραυματισμός:** Σε σύγκριση με άλλες μηχανικές μεθόδους, η ενζυμική απομόνωση μειώνει τις μηχανικές βλάβες που προκαλούνται στα κύτταρα κατά την αποκόλληση.
- **Αναπαραγωγιμότητα:** Η διαδικασία αυτή έχει αναπαραγωγίμη φύση και μπορεί να εκτελείται με ακρίβεια, επιτρέποντας την επανάληψη των πειραμάτων με συνέπεια.

Περιορισμοί:

- **Δαπανηρότητα και χρονοβόρες διαδικασίες:** Η ενζυμική απομόνωση απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων ενζύμων, τα οποία μπορεί να είναι ακριβά. Επίσης, η διαδικασία απαιτεί χρόνο για την προετοιμασία και εφαρμογή των ενζύμων.
- **Κίνδυνος υπερβολικής διάσπασης:** Υπερβολική ή ανεπαρκής εφαρμογή των ενζύμων μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική διάσπαση των κυττάρων ή της εξωκυττάριας μήτρας, κάτι που θα μπορούσε να μειώσει την ποιότητα ή τη βιωσιμότητα των κυττάρων.
- **Αναγκαία εξειδικευμένη τεχνογνωσία:** Η ενζυμική απομόνωση απαιτεί την προσεκτική εφαρμογή των ενζύμων και την κατανόηση των βιοχημικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα, γεγονός που καθιστά την τεχνική πιο περίπλοκη και απαιτητική.

1.2.9.3 Ανάλυση με FACS

Η ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής (FACS, από τα αγγλικά Fluorescence-Activated Cell Sorting) είναι μια ισχυρή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, τον προσδιορισμό και την απομόνωση κυττάρων ή άλλων κυτταρικών παραμέτρων με βάση την έκφραση συγκεκριμένων μοριακών δεικτών στην επιφάνεια των κυττάρων ή τις εσωτερικές τους ιδιότητες. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση φθορισμού και διάφορων ανιχνευτικών αντισωμάτων, με τις οποίες τα κύτταρα κατατάσσονται με εξαιρετική ακρίβεια και καθαρότητα, επιτρέποντας την ανάλυση των κυτταρικών υποπληθυσμών με βάση τους μοριακούς τους δείκτες. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν και να απομονωθούν σε διάφορους τύπους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, όπως η κυτταρική επιφάνεια, ο κυτταρικός όγκος, η μορφολογία ή άλλες παραμέτρους [118].

Η βασική αρχή της ανάλυσης FACS είναι ότι τα κύτταρα σημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές ή αντισώματα που συνδέονται με συγκεκριμένα αντιγόνα ή χαρακτηριστικά των κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα περνούν μέσω ενός μικρού οπτικού φωτεινού σημείου και αναλύονται ένα προς ένα από ένα σύστημα ανίχνευσης, το οποίο μετρά το φθορισμό και άλλες παραμέτρους κάθε κυττάρου σε πραγματικό χρόνο.

Οι παράμετροι που συνήθως αναλύονται περιλαμβάνουν:

- **Μεγέθη κυττάρων (forward scatter):** Δείχνει τη σχετική διάμετρο ή το μέγεθος των κυττάρων.
- **Πλευρικός διάσπαρτος φωτισμός (side scatter):** Αξιολογεί την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων, η οποία συνδέεται με την ποσότητα και την κατανομή των κοκκίων ή των οργανιδίων, όπως τα λυσοσώματα και τα πυρηνικά συστατικά.
- **Φθορισμός (fluorescence):** Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών χρωστικών ή αντισωμάτων που δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μόρια στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αυτές οι μετρήσεις παρέχουν μια λεπτομερή εικόνα των κυτταρικών χαρακτηριστικών και επιτρέπουν την ανάλυση της ταυτότητας, της διαφοροποίησης και των λειτουργιών των κυττάρων σε μοριακό επίπεδο.

Διαδικασία Ανάλυσης FACS

Η διαδικασία της ανάλυσης κυτταρικής ροής περιλαμβάνει διάφορα στάδια που εξασφαλίζουν την ακριβή ανάλυση και την απομόνωση των κυττάρων με βάση τα χαρακτηριστικά τους. Τα κύρια βήματα είναι:

Παρασκευή Δείγματος

Το πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία του δείγματος, το οποίο μπορεί να προέρχεται από ωοθήκες, ωοθυλάκια ή άλλους ιστούς. Ο ιστός ή το υγρό πρέπει να διασπαστεί και να αναλυθεί με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων απομόνωσης κυττάρων, όπως η ενζυμική ή μηχανική απομόνωση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα του δείγματος στερεοποιούνται ή αναστέλλονται με ειδικά διαλύματα για να διατηρηθούν βιώσιμα και να αποφευχθεί η αποκοπή ή βλάβη των κυτταρικών δομών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Σήμανση με Φθορίζουσες Ουσίες ή Αντισώματα

Τα κύτταρα επισημαίνονται με τη χρήση φθορισμού, που μπορεί να περιλαμβάνει είτε μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που συνδέονται με κυτταρικά συστατικά (π.χ. πυρηνικά οξέα ή λυσοσώματα) είτε ειδικά αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτά τα αντισώματα ή οι χρωστικές συνήθως συνδέονται με φθορισμούς διαφορετικών χρωμάτων, ώστε κάθε υποπληθυσμός κυττάρων να μπορεί να αναγνωριστεί με βάση τη φθορίζουσα ένταση και το χρώμα.

Ροή Κυττάρων

Τα επισημασμένα κύτταρα εισάγονται στον αναλυτή ροής κυττάρων, όπου διαχωρίζονται με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες και τα φθορίζοντα χαρακτηριστικά τους. Τα κύτταρα περνούν το ένα προς το άλλο μέσα από ένα μικρό φωτεινό σημείο και φωτίζονται από μια πηγή φωτός (συνήθως λέιζερ). Καθώς το φως διαχέεται από κάθε κύτταρο, οι ανιχνευτές μετρούν την ένταση του φωτός για να προσδιορίσουν τις διάφορες παραμέτρους του κυττάρου, όπως το μέγεθος, την πολυπλοκότητα και τον φθορισμό.

Ανάλυση και Ταξινόμηση

Οι πληροφορίες που συλλέγονται από την ανάλυση με ροή κυττάρων εισάγονται σε έναν υπολογιστή, ο οποίος επεξεργάζεται τα δεδομένα και δημιουργεί διαγράμματα ή γραφήματα, όπως τα διαγράμματα διάσπασης (scatter plots) ή τα ιστογράμματα. Αυτά τα γραφήματα επιτρέπουν την ταξινόμηση των κυττάρων σε υποπληθυσμούς, με βάση τα χαρακτηριστικά τους. Στη συνέχεια, οι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να απομονωθούν μέσω της τεχνικής FACS.

Ταξινόμηση και Απομόνωση Κυττάρων

Η δυνατότητα απομόνωσης (sorting) κυττάρων είναι το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής FACS. Η διαδικασία sorting επιτρέπει την διαλογή κυττάρων από το σύνολο των κυττάρων του δείγματος βάσει των χαρακτηριστικών τους, όπως η φθορίζουσα σήμανση ή η φυσική τους κατάσταση. Τα κύτταρα κατευθύνονται σε διάφορους θαλάμους ή συλλέγονται σε διαφορετικά δοχεία, ανάλογα με το αν πληρούν τα προκαθορισμένα κριτήρια (π.χ. επίπεδο φθορισμού ή μέγεθος). Ταυτόχρονα, η διαδικασία αυτή διατηρεί τη βιωσιμότητα των κυττάρων, κάτι που επιτρέπει τη μελέτη τους σε περαιτέρω πειράματα ή εφαρμογές.

Εφαρμογές της Ανάλυσης FACS

Η τεχνική FACS έχει πολλές εφαρμογές, ιδιαίτερα στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής, της κυτταρικής βιολογίας και της μοριακής βιολογίας. Ορισμένες βασικές εφαρμογές περιλαμβάνουν:

- **Αναγνώριση και απομόνωση υποπληθυσμών κυττάρων:** Όπως τα κοκκώδη κύτταρα που ενδέχεται να εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην επιφάνειά τους, επιτρέποντας την απομόνωσή τους για περαιτέρω μελέτη ή εφαρμογή.
- **Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών:** Η ανάλυση με FACS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των διαφορών στην έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων.
- **Μελέτες κυτταρικής διαφοροποίησης:** Η FACS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της διαφοροποίησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια των βιολογικών διαδικασιών, όπως η ανάπτυξη του ωοθυλακίου ή η διαφοροποίηση των γονιμοποιημένων ωαρίων.
- **Μελέτες γονιμότητας και υπογονιμότητας:** Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γυναικείας γονιμότητας, της ποιότητας των ωαρίων και της σχέσης με την παραγωγή ορμονών.

Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί

Η μέθοδος FACS προσφέρει ακριβή ανάλυση, πολλαπλές παραμέτρους και ικανότητα απομόνωσης, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Παρόλα αυτά, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και εκπαίδευση για την εφαρμογή της, καθώς και υψηλό κόστος λειτουργίας. Η ταχύτητα της ανάλυσης και η δυνατότητα διάκρισης υποπληθυσμών είναι πλεονεκτήματα, ενώ η ανάγκη για εκπαίδευση των χειριστών και η δυνατότητα σφαλμάτων στη διαδικασία ανάλυσης αποτελούν περιορισμούς.

Αξιολογώντας τη χρησιμότητα της τεχνικής FACS για την απομόνωση και ανάλυση κοκκωδών κυττάρων, η μέθοδος παρέχει αναλυτικά αποτελέσματα που συμβάλλουν στην κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών και της αναπαραγωγικής βιολογίας.

1.2.9.4 Μαγνητική απομόνωση

Η μαγνητική απομόνωση κυττάρων (Magnetic Cell Sorting, MACS) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την απομόνωση και το διαχωρισμό συγκεκριμένων κυττάρων από μείγματα κυττάρων με βάση την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μοριακών χαρακτηριστικών στην επιφάνειά τους. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων που συνδέονται με αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται σε συγκεκριμένα επιφανειακά αντιγόνα των κυττάρων-στόχων. Αυτά τα συνδεδεμένα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να απομονωθούν και να διαχωριστούν μέσω μαγνητικού πεδίου [110].

Αρχή της Τεχνικής

Η μαγνητική απομόνωση κυττάρων εκμεταλλεύεται την ιδιότητα ορισμένων κυττάρων να συνδέονται με μαγνητικά σωματίδια που φέρουν αντισώματα ή υποδοχείς έναντι συγκεκριμένων κυτταρικών πρωτεϊνών ή άλλων μοριακών στόχων στην επιφάνειά τους. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- **Σήμανση των κυττάρων:** Οι μαγνητικές σφαίρες, που είναι επενδεδυμένες με ειδικά αντισώματα ή μαγνητικά νανοσωματίδια, προσδένονται σε κυτταρικές επιφάνειες που εκφράζουν συγκεκριμένα μόρια-στόχους (π.χ. αντιγόνα ή πρωτεΐνες).
- **Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου:** Όταν το δείγμα περνά από ένα μαγνητικό πεδίο, τα κύτταρα που φέρουν τα μαγνητικά σωματίδια προσκολλώνται στη μαγνητική στήλη ή στον μαγνητικό απορροφητή, ενώ τα μη επισημασμένα κύτταρα περνούν ελεύθερα.
- **Απομόνωση των επισημασμένων κυττάρων:** Μετά την εφαρμογή του μαγνητικού πεδίου, τα κύτταρα που έχουν δεσμευτεί στα μαγνητικά σωματίδια μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω πειράματα ή αναλύσεις.

Πλεονεκτήματα της Μαγνητικής Απομόνωσης

Η μαγνητική απομόνωση κυττάρων προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα:

- **Ταχύτητα και αποδοτικότητα:** Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ταχεία απομόνωση κυττάρων από μίγματα, με υψηλή απόδοση, σε σχέση με άλλες μεθόδους απομόνωσης.

- **Επιλεκτικότητα:** Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση υποπληθυσμών κυττάρων με εξαιρετική ειδικότητα, επιλέγοντας μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα ή άλλες επιφανειακές πρωτεΐνες.
- **Αξιοπιστία:** Η απομόνωση κυττάρων με χρήση μαγνητικών πεδίων είναι συνήθως λιγότερο επιρρεπής σε μηχανικά ή χημικά σφάλματα, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κυτταρική ανάλυση ή καλλιέργεια με υψηλή βιωσιμότητα.

Μειονεκτήματα των Υφιστάμενων Μεθόδων Μαγνητικής Απομόνωσης

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μαγνητική απομόνωση κυττάρων έχει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη χρήση της σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Αυτά περιλαμβάνουν:

- **Ανεπιθύμητη μόλυνση των κυττάρων-στόχων:** Η προσκόλληση των μαγνητικών σωματιδίων στις επιφάνειες των κυττάρων μπορεί να επηρεάσει τις κυτταρικές λειτουργίες. Οι συνθήκες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, όπως η ύπαρξη υπολειμματικών μαγνητικών σωματιδίων, μπορεί να αλλοιώσουν τις κυτταρικές διαδικασίες.
- **Μη πλήρης απομόνωση:** Σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα-στόχοι εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα των αντιγόνων ή των μοριακών δεικτών που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση, η απομόνωση δεν είναι πάντα πλήρης, και μπορεί να υπάρχουν επιπλέον κυτταρικοί πληθυσμοί που δεν ανιχνεύονται ή απομονώνονται.
- **Διαταραχή της κυτταρικής ακεραιότητας:** Ορισμένα κυτταρικά χαρακτηριστικά, όπως η μορφολογία και η ενεργοποίηση κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, μπορεί να επηρεάζονται από τη διαδικασία σήμανσης και απομόνωσης.
- **Απαιτήσεις για εξειδικευμένο εξοπλισμό:** Η τεχνική απαιτεί τη χρήση ειδικού μαγνητικού εξοπλισμού και ρυθμισμένων αντισωμάτων ή συνδέσεων, κάτι που μπορεί να αυξήσει το κόστος και να περιορίσει τη δυνατότητα χρήσης της σε ορισμένα εργαστήρια.
- **Περιορισμένη ευελιξία:** Η μαγνητική απομόνωση είναι περιορισμένη στο ότι απαιτεί μια συγκεκριμένη επιφανειακή έκφραση αντιγόνου για την σήμανση. Εάν τα κύτταρα δεν εκφράζουν τον επιθυμητό δείκτη ή αν είναι πολύ χαμηλά τα επίπεδα του, η μέθοδος δεν θα είναι αποτελεσματική.

Ανάγκη για Νέες Βελτιωμένες Τεχνικές

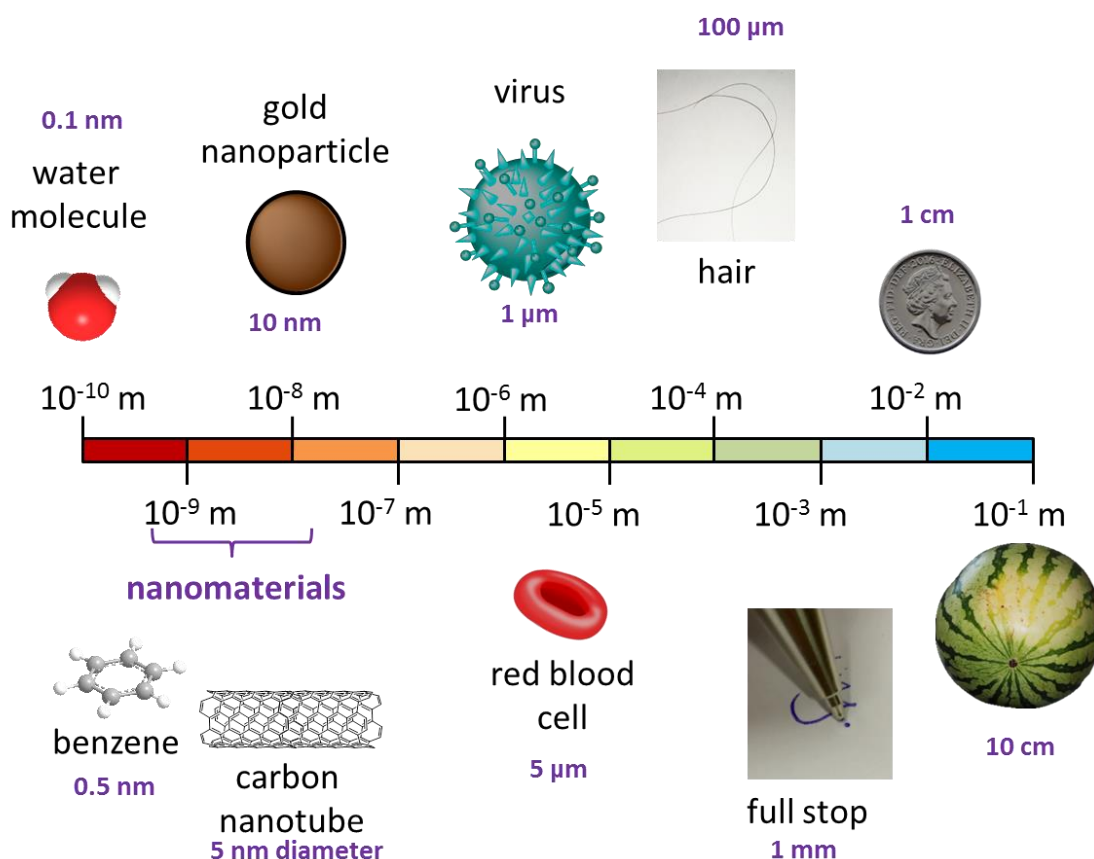
Τα παραπάνω μειονεκτήματα καθιστούν σαφή την ανάγκη για νέες βελτιωμένες τεχνικές απομόνωσης που να ξεπερνούν τους περιορισμούς της παραδοσιακής μαγνητικής απομόνωσης. Ορισμένες προτάσεις και ερευνητικά ενδιαφέροντα περιλαμβάνουν:

- **Βελτίωση της εκλεκτικότητας:** Η ανάπτυξη πιο εξειδικευμένων αντισωμάτων ή μοριακών δεικτών για τη στόχευση κυττάρων που εκφράζουν χαμηλά ή υποτυπώδη επίπεδα συγκεκριμένων μορίων θα μπορούσε να βελτιώσει την ακρίβεια της απομόνωσης.
- **Ανάπτυξη δυναμικών μαγνητικών συστημάτων:** Η χρήση προηγμένων μαγνητικών συστημάτων, που να επιτρέπουν την πιο ήπια και ευέλικτη εφαρμογή μαγνητικών πεδίων, μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη βλάβη στα κύτταρα και να αυξήσει τη βιωσιμότητά τους.
- **Συνδυασμός με άλλες μεθόδους:** Η συνδυασμένη χρήση μαγνητικής απομόνωσης με άλλες τεχνικές, όπως η ροή κυττάρων (FACS), μπορεί να προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη και ακριβή ανάλυση και απομόνωση, με τη δυνατότητα να επιλεγούν και να απομονωθούν κυτταρικοί πληθυσμοί με περισσότερα χαρακτηριστικά.
- **Μειωμένη παρουσία υπολειμμάτων:** Η ανάπτυξη τεχνικών για τη μείωση των υπολειμμάτων μαγνητικών σωματιδίων στις κυτταρικές καλλιέργειες ή στις κατευθυνόμενες διαδικασίες ανάλυσης μπορεί να μειώσει τις αρνητικές επιπτώσεις στα κύτταρα και να εξασφαλίσει τη βιωσιμότητά τους.

Εν κατακλείδι, η μαγνητική απομόνωση κυττάρων παραμένει μία από τις βασικές τεχνικές στην κυτταρική βιολογία και στην αναπαραγωγική ιατρική, ωστόσο η ανάγκη για καινοτόμες βελτιώσεις και την ανάπτυξη νέων, πιο αποδοτικών και λιγότερο επιβλαβών μεθόδων απομόνωσης είναι ιδιαίτερα επιτακτική, προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί της τεχνικής και να βελτιωθεί η ακρίβεια και η βιωσιμότητα των απομονωμένων κυττάρων.

1.3 Νανοϋλικά

Ακρογωνιαίοι λίθοι της νανοεπιστήμης και της νανοτεχνολογίας θεωρούνται τα νανοϋλικά. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Περιβάλλοντος (European Commissioner for the Environment), τα νανοϋλικά ορίζονται ως «τα φυσικά, τυχαία ή κατασκευασμένα υλικά που περιέχουν σωματίδια, σε αδέσμευτη κατάσταση, ως συσσωματώματα ή ως ένα συσσωμάτωμα, όπου το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων, με βάση την κατανομή μεγέθους τους, έχουν μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις που κυμαίνονται μεταξύ 1 nm και 100 nm». Σε ειδικές περιπτώσεις και εφόσον αυτό δικαιολογείται από τις ανησυχίες για το περιβάλλον, την υγεία, την ασφάλεια ή την ανταγωνιστικότητα, το κατώτατο όριο κατανομής μεγέθους (50%) μπορεί να αντικατασταθεί από ένα κατώτατο όριο μεταξύ 1 και 50%. Κατά παρέκκλιση από τα ανωτέρω, τα φουλερένια, οι νιφάδες γραφενίου (graphene flakes) και οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος, με μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις κάτω του 1 nm πρέπει να θεωρούνται ως νανοϋλικά. Στην Εικόνα 1 φαίνονται σε κλίμακα τα μεγέθη διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών [119–121].



Εικόνα 1: Κλίμακα μεγέθους διαφόρων σωματιδίων

1.3.1 Χαρακτηριστικά νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά, λόγω της νανοδιάστασης τους (1-100 νανόμετρα), παρουσιάζουν μια σειρά από μοναδικά χαρακτηριστικά που διαφέρουν σημαντικά από τα αντίστοιχα υλικά σε μακροσκοπική κλίμακα. Αυτά τα χαρακτηριστικά προκύπτουν από την ενισχυμένη επιφάνεια, τη μειωμένη διάσταση και τη δυναμική συμπεριφορά των νανοϋλικών, τα οποία οδηγούν σε νέες ή ενισχυμένες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών, τα οποία είναι κρίσιμα για την κατανόηση της συμπεριφοράς τους και των εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς [119,122,123].

Υψηλή Επιφάνεια προς Όγκο

Ένα από τα πιο θεμελιώδη χαρακτηριστικά των νανοϋλικών είναι η υψηλή επιφάνεια προς όγκο. Αυτή η χαρακτηριστική επιφάνεια είναι αυξημένη σε σχέση με το συνολικό όγκο του υλικού λόγω των μικρών του διαστάσεων. Για παράδειγμα, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων ενός νανοϋλικού, τόσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνειά του αναλογικά με τον όγκο του. Αυτό προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως:

- **Αυξημένη δραστηριότητα:** Τα νανοϋλικά με υψηλή επιφάνεια προς όγκο επιδεικνύουν αυξημένη χημική δραστηριότητα, διότι οι αντιδράσεις τους με άλλες ουσίες συμβαίνουν στην επιφάνειά τους. Αυτό τα καθιστά εξαιρετικά χρήσιμα για καταλυτικές εφαρμογές ή στην απορρόφηση και απομάκρυνση ρύπων.
- **Αυξημένη αντιδραστηριότητα:** Τα νανοϋλικά είναι πολύ πιο αντιδραστικά σε σχέση με τα αντίστοιχα υλικά σε μεγαλύτερη κλίμακα, κάτι που τα καθιστά χρήσιμα σε διάφορες εφαρμογές, όπως η καταλυτική δράση ή η τοξικότητα σε βιολογικά συστήματα.

Κβαντικά Φαινόμενα και Κβαντική Συμπεριφορά

Στην κλίμακα των νανοϋλικών, οι κβαντικές ιδιότητες αρχίζουν να κυριαρχούν. Σε αυτήν την κλίμακα, τα υλικά συμπεριφέρονται με τρόπους που δεν ακολουθούν τους νόμους της κλασικής φυσικής, αλλά επηρεάζονται από τα κβαντικά φαινόμενα. Οι βασικότερες επιδράσεις αυτής της συμπεριφοράς περιλαμβάνουν [124]:

- **Κβαντική σύγκρουση:** Όταν τα σωματίδια είναι μικρότερα από τη διάσταση της διάθλασης του ηλεκτρονίου (που είναι περίπου 1-10 νανόμετρα), οι ηλεκτρονικές καταστάσεις τους δεν είναι συνεχείς, αλλά διακριτές. Αυτό οδηγεί σε μεταβολές στην ηλεκτρική, θερμική και οπτική συμπεριφορά του υλικού.
- **Αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα:** Για παράδειγμα, τα νανοσωματίδια άνθρακα ή τα νανοσωλήνες άνθρακα παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτρική αγωγιμότητα από τα μεγαλύτερα υλικά, λόγω της κβαντικής σύγκρουσης και της τροποποίησης των ενεργειακών επιπέδων.
- **Φαινόμενα κβαντικής δόνησης:** Σε νανοϋλικά, τα ηλεκτρόνια δεν κινούνται συνεχώς, αλλά "πηδούν" μεταξύ διαφορετικών ενεργειακών επιπέδων, πράγμα που επηρεάζει τη θερμική και ηλεκτρική τους αγωγιμότητα.

Αλλαγές στις Μηχανικές Ιδιότητες

Στην νανοκλίμακα, τα υλικά συχνά παρουσιάζουν αλλαγές στις μηχανικές τους ιδιότητες σε σχέση με τα μεγαλύτερα δείγματα του ίδιου υλικού. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν [119]:

- **Αυξημένη δύναμη και σκληρότητα:** Τα νανοϋλικά όπως τα νανοσωματίδια άνθρακα ή οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι γνωστά για την εξαιρετική τους αντοχή και σκληρότητα, οι οποίες είναι κατά πολύ υψηλότερες από αυτές των συμβατικών υλικών. Αυτό τα καθιστά ιδανικά για την παραγωγή πολύ ισχυρών, ελαφρών υλικών.
- **Ευελιξία και ελαστικότητα:** Η μικρή κλίμακα αυτών των υλικών επιτρέπει την ευελιξία και την προσαρμοστικότητα τους, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για εφαρμογές στις οποίες απαιτείται ελαστικότητα, όπως στις αναπτυσσόμενες τεχνολογίες φορετών συσκευών.

Αυξημένη Χημική Σταθερότητα και Αντοχή στην Οξείδωση

Τα νανοϋλικά παρουσιάζουν συνήθως καλύτερη χημική σταθερότητα σε σχέση με τα συμβατικά υλικά, ειδικά όταν είναι επιμελημένα σε κατάλληλες μορφές. Η αυξημένη επιφάνεια και η δυνατότητα τροποποίησης των επιφανειών τους καθιστά τα νανοϋλικά ανθεκτικά σε διάφορους τύπους χημικών επιθέσεων.

- **Αντίσταση στην οξείδωση:** Τα νανοϋλικά, λόγω του μικρού μεγέθους τους και της αυξημένης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο, παρουσιάζουν ενισχυμένη αντοχή στην οξείδωση, καθιστώντας τα χρήσιμα σε εξωτερικές και εξαιρετικά απαιτητικές εφαρμογές.

Βιολογικές Ιδιότητες

Η νανοκλίμακα των υλικών τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με τα βιολογικά συστήματα με μοναδικό τρόπο [125,126]:

- **Βιοσυμβατότητα και τοξικότητα:** Τα νανοϋλικά μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα και τους ιστούς του οργανισμού, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα στην ιατρική, αλλά και ενδεχομένως επικίνδυνα σε ορισμένες περιπτώσεις. Οι νανοτεχνολογίες ενδέχεται να έχουν τοξικές επιπτώσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις, ειδικά όταν αυτά τα υλικά εισέρχονται σε ζωντανούς οργανισμούς.
- **Στοχευμένη Χορήγηση Φαρμάκων:** Οι νανοϋλικές μορφές, όπως τα νανοσωματίδια, είναι εξαιρετικά χρήσιμες για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και για την παροχή φαρμάκων ακριβώς στις περιοχές του σώματος που τα χρειάζονται, μειώνοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Οπτικές Ιδιότητες

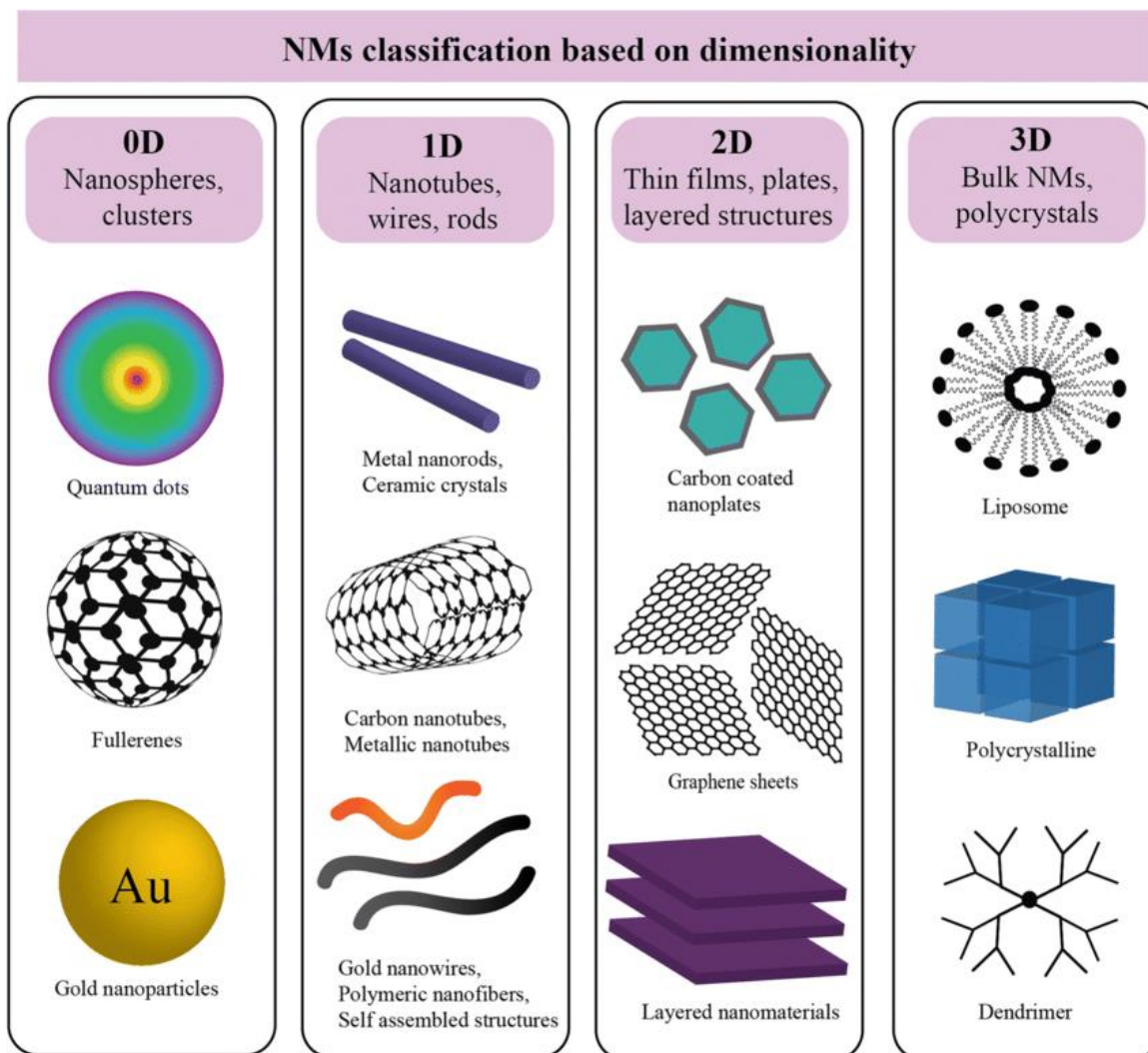
Ανάλογα με το μέγεθος και την μορφή των νανοϋλικών, μπορούν να παρατηρηθούν ενισχυμένες οπτικές ιδιότητες, όπως:

- **Αυξημένη απορρόφηση ή εκπομπή φωτός:** Τα νανοϋλικά μπορούν να απορροφούν ή να εκπέμπουν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος σε σχέση με τα συμβατικά υλικά, επιτρέποντας τη χρήση τους σε οπτικές εφαρμογές, όπως οι οθόνες, οι φωτονικές συσκευές και οι ανιχνευτές φωτός.
- **Αναζωογόνηση και φθορισμός:** Μερικά νανοϋλικά, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού ή τα νανοσωματίδια τιτανίου, μπορούν να αναζωογονήσουν τη φωτεινότητα ή να εκπέμπουν φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, δημιουργώντας έτσι χρήσιμες εφαρμογές στην ιατρική και την ανάλυση.

1.3.1 Διαχωρισμός νανοϋλικών με βάση το μέγεθος

Τα νανοϋλικά, με βάση τις διαστάσεις τους χωρίζονται σε υλικά μηδενικής διάστασης (0 d), μονοδιάστατα (1-d), δισδιάστατα (2-d) και τρισδιάστατα (3-d), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2 [127].

- Υλικά μηδενικής διάστασης θεωρούνται τα υλικά που έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στην νανοκλίμακα. Τα περισσότερα από τα υλικά αυτά έχουν σφαιρικό σχήμα, με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 1 και 50 nm. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και υλικά με κυβικό ή πολυγωνικό σχήμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα υλικών της κατηγορίας αυτής, είναι τα μεταλλικά νανοϋλικά και οι κβαντικές κουκίδες.
- Στα μονοδιάστατα υλικά, η μια από τις τρεις διαστάσεις ξεπερνάει την νανοκλίμακα. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν οι νανοϊνες, οι νανοράβδοι και οι νανοσωλήνες μετάλλων, οξειδίων και άλλων υλικών. Τα υλικά αυτά έχουν μήκος αρκετών μικρομέτρων, αλλά η διάμετρός τους είναι λίγα μόνο νανόμετρα.
- Δισδιάστατα υλικά θεωρούνται τα νανοϋλικά εκ των οποίων, δυο από τις τρεις διαστάσεις είναι εκτός νανοκλίμακας. Εδώ συγκαταλέγονται: τα νανοφίλμ, τα λεπτά φύλλα και οι πλάκες. Το εμβαδό των νανοδομών αυτών μπορεί να είναι αρκετά τετραγωνικά μικρόμετρα, αλλά το πάχος τους έχει πάντα διαστάσεις μέσα στα όρια της νανοκλίμακας.
- Στα τρισδιάστατα υλικά ανήκουν όλα τα ογκωδέστερα υλικά εκ των οποίων και οι τρεις διαστάσεις ξεπερνούν τα 100 nm. Ωστόσο, συγκαταλέγονται στα νανοϋλικά, στην περίπτωση εκείνη, όπου τα μεμονωμένα δομικά τους στοιχεία έχουν διαστάσεις έως και 100 nm.



Εικόνα 2: Κατηγορίες νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους

Πέρα από τις διαστάσεις, που αποτελούν κριτήριο κατηγοριοποίησης των νανοϋλικών, τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν και με βάση την δομική τους διαμόρφωση [2, 8]. Έτσι, διακρίνονται σε τέσσερις τύπους:

- Υλικά με βάση τον άνθρακα. Τα νανοϋλικά αυτά αποτελούνται κυρίως από άνθρακα και έχουν συνήθως ελλειψοειδή μορφή ή μορφή κοίλης σφαίρας ή τη μορφή ενός σωλήνα. Τα σφαιροειδή και τα ελλειψοειδή νανοϋλικά, αναφέρονται συνήθως και ως φουλερένια, ενώ τα κυλινδρικά ως νανοσωλήνες.
- Υλικά με βάση τα μέταλλα. Το κύριο συστατικό των υλικών της κατηγορίας αυτής είναι κάποιο μέταλλο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα νανοσωματίδια χρυσού, σιδήρου και οξειδίων, όπως το διοξείδιο του τιτανίου.

- Δενδριμερή. Τα νανοϋλικά αυτά είναι πολυμερή, πολύ μικρού μεγέθους, τα οποία αποτελούνται από διακλαδισμένες μονάδες. Στην επιφάνεια του δενδριμερούς καταλήγουν πολλές αλυσίδες, οι οποίες μπορούν να προσαρμοστούν για να εκτελούν συγκεκριμένες χημικές λειτουργίες. Επιπλέον, τα τρισδιάστατα δενδριμερή, περιέχουν εσωτερικές κοιλότητες, στις οποίες μπορούν να τοποθετηθούν άλλα μόρια.
- Σύνθετα νανοϋλικά. Τα υλικά αυτά συνδυάζουν νανοσωματίδια μεταξύ τους ή με ογκωδέστερα υλικά, για βελτίωση κυρίως των ιδιοτήτων τους. Ορίζονται ως πολυφασικά υλικά, όπου, η μια τουλάχιστον από τις φάσεις έχει μία, δύο ή τρεις διαστάσεις στην νανοκλίμακα. Παράδειγμα τέτοιων υλικών είναι τα κολλοειδή, τα τζελ κ.α.

1.3.2 Μαγνητικά νανοϋλικά

Τα μαγνητικά νανοϋλικά είναι μια ειδική κατηγορία νανοϋλικών που παρουσιάζουν μοναδικές μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες είναι εντελώς διαφορετικές από αυτές των συμβατικών υλικών λόγω της νανοδιάστασης τους. Αυτά τα υλικά περιλαμβάνουν σωματίδια, νανοσωλήνες και άλλες δομές που περιέχουν μαγνητικά μέταλλα, όπως σίδηρο (Fe), κοβάλτιο (Co), νικέλιο (Ni), ή κράματα αυτών. Τα μαγνητικά νανοϋλικά έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ιατρική, την επιστήμη των υλικών, τη βιοτεχνολογία και την περιβαλλοντική καθαριότητα. Η συμπεριφορά τους καθορίζεται από τον συνδυασμό των χαρακτηριστικών της νανοκλίμακας με τις μαγνητικές ιδιότητες των υλικών που τα συνθέτουν [119,128–131].

Ορισμός και Κατηγορίες Μαγνητικών Νανοϋλικών

Τα μαγνητικά νανοϋλικά είναι νανοσωματίδια ή άλλες νανοδομές που περιέχουν μαγνητικά υλικά και εκμεταλλεύονται τις μαγνητικές τους ιδιότητες σε νανοκλίμακα. Αυτά τα υλικά μπορεί να είναι είτε **μαγνητικά σωματίδια** είτε **νανοσωλήνες**, και οι βασικές τους κατηγορίες περιλαμβάνουν:

- **Μαλακά μαγνητικά νανοϋλικά:** Αυτά τα υλικά είναι ικανά να επηρεάζονται εύκολα από εξωτερικά μαγνητικά πεδία, αλλά ταυτόχρονα χάνουν τις μαγνητικές τους ιδιότητες όταν το εξωτερικό πεδίο αφαιρείται. Τα σωματίδια σιδήρου είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα.

- **Σκληρά μαγνητικά νανοϋλικά:** Αυτά τα υλικά διατηρούν τις μαγνητικές τους ιδιότητες για μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμα και όταν δεν υπάρχει εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Τα νανοσωματίδια κοβαλτίου ή τα κράματα σιδήρου-νικελίου ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.
- **Μαγνητικά νανοσωματίδια:** Τα νανοσωματίδια που περιέχουν σίδηρο ή άλλα μαγνητικά μέταλλα, όπως το Fe_3O_4 (μαγνητίτης) ή το Fe_2O_3 (αιματίτης), είναι τα πιο συνηθισμένα μαγνητικά νανοϋλικά. Αυτά τα σωματίδια έχουν διάμετρο της τάξεως των νανομέτρων (1-100 νανόμετρα).

Χαρακτηριστικά Μαγνητικών Νανοϋλικών

Τα μαγνητικά νανοϋλικά διαθέτουν μια σειρά από μοναδικά χαρακτηριστικά λόγω του μικρού τους μεγέθους και της κβαντικής συμπεριφοράς τους:

- **Μεταβολές στις Μαγνητικές Ιδιότητες λόγω Νανιοκλίμακας:** Σε νανοκλίμακα, τα μαγνητικά νανοϋλικά εμφανίζουν διακριτές μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες είναι πολύ πιο ευαίσθητες σε εξωτερικά πεδία από τα συμβατικά υλικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια περιέχουν μικρό αριθμό ατόμων στην επιφάνεια, τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη του μαγνητικού πεδίου.
- **Μαγνητική Αντίσταση:** Η μεταβολή στην αντίσταση λόγω της παρουσίας ή της απουσίας μαγνητικού πεδίου είναι χαρακτηριστικό των μαγνητικών νανοϋλικών και αξιοποιείται για τη δημιουργία νέων διατάξεων και τεχνολογιών, όπως στις συσκευές αποθήκευσης δεδομένων.
- **Μαγνητική Στρατοποίηση και Υποστρωματική Διαμόρφωση:** Τα μαγνητικά νανοϋλικά διαθέτουν ικανότητα στρατοποίησης των μαγνητικών τους μομεντουμ με έναν τρόπο που δεν παρατηρείται σε μεγαλύτερα υλικά. Τα νανοσωματίδια μπορούν να στρατοπεδεύουν εύκολα κατά μήκος του μαγνητικού πεδίου, επιτρέποντας έτσι μια πιο εξειδικευμένη και ακριβή χρήση τους.

Μαγνητικές Ιδιότητες

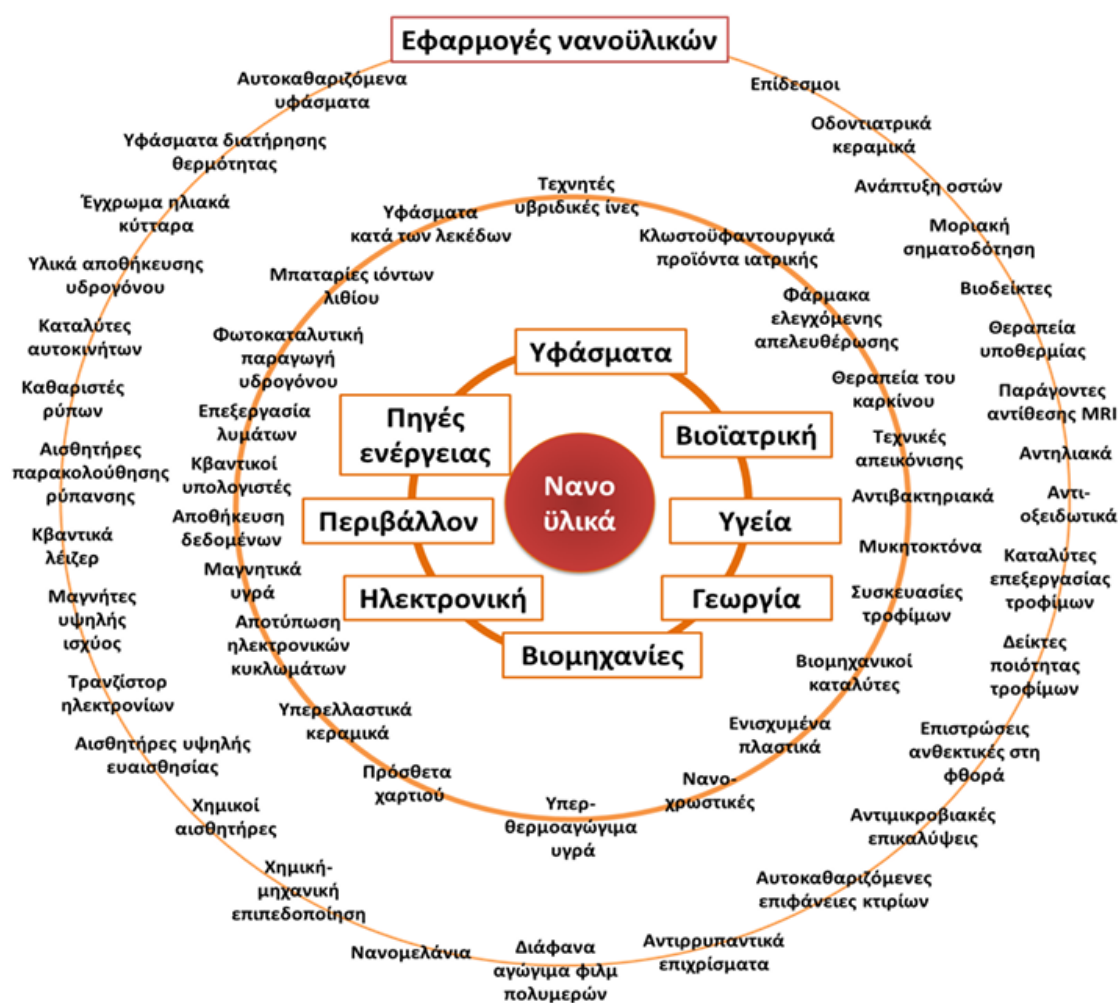
Η κυριότερη μαγνητική ιδιότητα που παρατηρείται στα μαγνητικά νανοϋλικά είναι η **συμπεριφορά του μαγνητικού momentum**. Στην κλασική φυσική, τα μαγνητικά υλικά

διατηρούν μια σταθερή μαγνητική ροπή και αντιδρούν με εξωτερικά πεδία σύμφωνα με τη μαγνητική τους ευαισθησία. Ωστόσο, στα νανοϋλικά, οι ιδιότητες αυτές ενδέχεται να διαφέρουν λόγω της διακριτής φύσης των νανοσωματίδιων:

- **Συμπεριφορά στην εξωτερική μαγνητική ώθηση:** Στα μικροσκοπικά σωματίδια, η εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου μπορεί να προκαλέσει μια σειρά αλλαγών στη μαγνητική ροπή, η οποία επανέρχεται γρήγορα στην κανονική κατάσταση όταν το πεδίο αφαιρεθεί.
- **Υπερμαγνητισμός:** Οι νανοκλίμακες, λόγω της επιφάνειας και των διακυμάνσεων των κβαντικών καταστάσεων, συχνά δείχνουν υπερμαγνητισμό, όπου τα σωματίδια καθίστανται πολύ πιο ευαίσθητα στα εξωτερικά πεδία σε σύγκριση με μεγαλύτερες κλίμακες.

1.3.3 Εφαρμογές νανοϋλικών και μαγνητικών νανοϋλικών

Η αξιοποίηση των νανοϋλικών σε ποικίλες εφαρμογές, απέδωσε αρκετά αναμενόμενα αλλά και απροσδόκητα οφέλη στην κοινωνία: έχει βελτιώσει σημαντικά και έχει φέρει την επανάσταση σε πολλούς τομείς της τεχνολογίας και της βιομηχανίας, με αναρίθμητες εφαρμογές. Οι νέοι τομείς που αξιοποιούν τις μοναδικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες ολοένα και πληθαίνουν. Οι σημαντικότερες εφαρμογές τους ως τώρα, εντοπίζονται κυρίως στους τομείς ενέργειας, περιβάλλοντος, ηλεκτρονικής, πληροφορικής, τροφίμων, γεωργίας καθώς και στον τομέα της υγείας και της βιοϊατρικής, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 [131–134].



Εικόνα 3: Τομείς εφαρμογών των νανοϋλικών

Ιατρικές Εφαρμογές

Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική για τη διάγνωση, τη θεραπεία, και την αποκατάσταση ασθενειών. Ορισμένες από τις σημαντικότερες εφαρμογές περιλαμβάνουν [135]:

- **Νανოსωματίδια για Στοχευμένη Χορήγηση Φαρμάκων:** Η χρήση νανოსωματιδίων για την παράδοση φαρμάκων στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς (π.χ., όγκους) είναι μία από τις πιο ευρέως μελετημένες εφαρμογές στην ιατρική. Τα νανοϋλικά προσφέρουν τη δυνατότητα να ενσωματώνουν φάρμακα και να τα μεταφέρουν σε περιοχές του σώματος με ακρίβεια, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών.

- **Νανοϋλικά στην Ιατρική Απεικόνιση:** Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των τεχνικών απεικόνισης, όπως η **μαγνητική τομογραφία (MRI)** και η **υπερηχογραφία**, παρέχοντας μεγαλύτερη ευαισθησία και ακριβεία στη διάγνωση των ασθενειών. Νανოსωματίδια που περιέχουν μέταλλα, όπως το **χρυσό ή το σίδηρο**, προσφέρουν ισχυρά σήματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν τις εικόνες των ιστών.
- **Βιοαισθητήρες:** Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη εξαιρετικά ευαίσθητων βιοαισθητήρων, οι οποίοι μπορούν να ανιχνεύσουν μικρές ποσότητες βιολογικών μορίων (π.χ., πρωτεΐνες, ιοί) και να παρέχουν γρήγορη και ακριβή διάγνωση ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι λοιμώξεις.
- **Γενετική Θεραπεία και Στοχευμένη Έκφραση Γονιδίων:** Τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ελεγχόμενη απελευθέρωση γονιδίων ή άλλων θεραπευτικών μορίων, ανοίγοντας το δρόμο για νέες θεραπείες που στοχεύουν σε γενετικές ασθένειες ή καρκινικές κυτταρικές διαταραχές.

Περιβαλλοντικές Εφαρμογές

Τα νανοϋλικά προσφέρουν νέες δυνατότητες για την προστασία του περιβάλλοντος και τη διαχείριση φυσικών πόρων [136]:

- **Αφαίρεση Ρύπων:** Η χρήση νανοϋλικών για την απορρόφηση και απομάκρυνση ρυπογόνων ουσιών από το περιβάλλον είναι μια από τις κύριες εφαρμογές τους. Νανοϋλικά όπως τα νανოსωματίδια άνθρακα ή τα νανοςωματίδια σιδήρου έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν βαρέα μέταλλα ή άλλες τοξικές ουσίες από το νερό ή τον αέρα.
- **Καθαρισμός Νερού:** Ορισμένα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για την απολύμανση ή την απομάκρυνση βακτηρίων και ιών από το πόσιμο νερό, βελτιώνοντας την ποιότητα του νερού και εξασφαλίζοντας την υγιεινή του.
- **Ανακύκλωση και Εξοικονόμηση Ενέργειας:** Νανοϋλικά, όπως οι νανოსωλήνες άνθρακα, είναι σε θέση να βελτιώσουν τις ιδιότητες των ανακυκλωμένων υλικών ή να συμβάλουν στην ανάπτυξη πιο αποδοτικών τεχνολογιών παραγωγής και αποθήκευσης ενέργειας.

Βιομηχανικές Εφαρμογές

- **Ενίσχυση Υλικών:** Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των μηχανικών, θερμικών και χημικών ιδιοτήτων των υλικών. Στη βιομηχανία, νανοσωματίδια όπως ο **νανοκαπνός** και οι **νανοσωλήνες άνθρακα** προστίθενται σε πολυμερή και άλλα υλικά για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας, της ελαστικότητας και της αντοχής στη φθορά.
- **Εφαρμογές Στην Ηλεκτρονική:** Η νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη πιο αποδοτικών ηλεκτρονικών συσκευών, όπως νανοτρανζίστοι και άλλες συσκευές στην **ηλεκτρονική μικροσκοπική κλίμακα**. Αυτό επιτρέπει τη δημιουργία μικρότερων, ταχύτερων και πιο ενεργειακά αποδοτικών συστημάτων.

Τα **μαγνητικά νανοϋλικά** αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία νανοϋλικών που έχουν εξαιρετική σημασία σε πολλούς επιστημονικούς και τεχνολογικούς τομείς, χάρη στις μοναδικές τους μαγνητικές ιδιότητες. Τα μαγνητικά νανοϋλικά χρησιμοποιούνται κυρίως για εφαρμογές που σχετίζονται με τη διαχείριση μαγνητικών πεδίων, την αποθήκευση δεδομένων, τη θεραπεία και τη διάγνωση.

Ιατρικές Εφαρμογές Μαγνητικών Νανοϋλικών

- **Στοχευμένη Χορήγηση Φαρμάκων:** Τα μαγνητικά νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν φάρμακα με στοχευμένο τρόπο σε περιοχές του σώματος, όπως οι όγκοι, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών και μειώνοντας τις παρενέργειες. Η εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου καθοδηγεί τα νανοσωματίδια στην επιθυμητή περιοχή.
- **Μαγνητική Υποβοήθηση Στη Διάγνωση:** Στην απεικόνιση, τα μαγνητικά νανοϋλικά (π.χ., μαγνητίτης, Fe_3O_4) χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ευαισθησίας στις διαγνωστικές τεχνικές όπως η **μαγνητική τομογραφία (MRI)**. Αυτά τα νανοϋλικά βοηθούν στην ενίσχυση των εικόνων των εσωτερικών ιστών του σώματος και στη διάγνωση των ασθενειών.
- **Μαγνητική Θερμοθεραπεία:** Η χρήση μαγνητικών νανοϋλικών για την απορρόφηση ενέργειας από εξωτερικά μαγνητικά πεδία και τη μετατροπή της

σε θερμότητα χρησιμοποιείται για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **μαγνητική θερμοθεραπεία** και εφαρμόζεται σε καρκινικούς όγκους με στόχο την εξάλειψη των παθολογικών κυττάρων.

Εφαρμογές στην Αποθήκευση Δεδομένων

- **Μαγνητική Αποθήκευση:** Τα μαγνητικά νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση των συστημάτων αποθήκευσης δεδομένων, καθώς τα μαγνητικά χαρακτηριστικά τους επιτρέπουν την αποθήκευση περισσότερων δεδομένων σε μικρότερο χώρο. Τα **μαγνητικά νανოსωματίδια** και τα νανοςωματίδια σιδήρου, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται σε δίσκους σκληρού δίσκου και άλλες συσκευές αποθήκευσης.
- **Μαγνητική Αναγνώριση Δεδομένων:** Τα νανοϋλικά με μαγνητικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται σε τεχνολογίες **μαγνητικής αναγνώρισης** για την ταυτοποίηση και παρακολούθηση πληροφοριών, όπως τα **μαγνητικά ευφυή ετικέτες**.

Περιβαλλοντικές Εφαρμογές Μαγνητικών Νανοϋλικών

- **Αφαίρεση Ρύπων:** Χρησιμοποιούνται για την απορρόφηση και απομάκρυνση ρύπων όπως βαρέα μέταλλα ή οργανικές ουσίες από το νερό και το έδαφος, λόγω της μαγνητικής τους ιδιότητας που επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση μέσω εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.
- **Μαγνητική Καθαρισμός Νερού:** Τα μαγνητικά νανοϋλικά χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του νερού από επικίνδυνες ουσίες ή βακτήρια, με την απορρόφηση των ρύπων και την εύκολη αφαίρεσή τους από το περιβάλλον.

1.3.4 Νανοςωματίδια μαγνητίτη

Τα νανοςωματίδια μαγνητίτη (Fe_3O_4) είναι ένα από τα πιο σημαντικά και μελετημένα μαγνητικά νανοϋλικά. Ο μαγνητίτης είναι ένα οξειδωτικό ορυκτό σιδήρου που έχει μαγνητικές ιδιότητες, και τα νανοςωματίδια του μαγνητίτη είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με μαγνητικά πεδία, καθιστώντας τα πολύ χρήσιμα σε ποικίλες εφαρμογές, κυρίως στον τομέα της βιοϊατρικής, της περιβαλλοντικής καθαριότητας και των τεχνολογιών αποθήκευσης [137–142].

Χαρακτηριστικά των Νανοσωματίδιων Μαγνητίτη

- **Μαγνητικές Ιδιότητες:** Ο μαγνητίτης (Fe_3O_4) είναι ένα υλικό που διαθέτει ισχυρές μαγνητικές ιδιότητες, τόσο σε νανοκλίμακα όσο και σε μικρότερες κλίμακες. Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη έχουν συνήθως υπολειμματική μαγνητιστικότητα, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για εφαρμογές στις οποίες απαιτείται μαγνητική αλληλεπίδραση χωρίς συνεχές εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Όταν εκτίθενται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, τα νανοσωματίδια μαγνητίτη κατευθύνονται και προσκολλώνται στην περιοχή ενδιαφέροντος και, στη συνέχεια, μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με χρήση μαγνητικού πεδίου.
- **Μέγεθος και Διανομή:** Το μέγεθος των νανοσωματίδιων μαγνητίτη κυμαίνεται από μερικά νανόμετρα έως μερικές δεκάδες νανόμετρα. Η διανομή του μεγέθους είναι πολύ σημαντική, καθώς τα νανοσωματίδια μικρότερου μεγέθους έχουν την τάση να έχουν μεγαλύτερη επιφανειακή ενέργεια και έτσι παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα. Αυτή η μικρή διάσταση τους επιτρέπει να εισέρχονται σε κυτταρικές δομές και να αλληλεπιδρούν σε μοριακό επίπεδο.
- **Σταθερότητα και Ενεργοποίηση:** Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη συνήθως παρουσιάζουν υψηλή χημική σταθερότητα σε διάφορες συνθήκες, όπως η παρουσία οξέων ή αλκαλίων, ενώ η μαγνητική τους δραστηριότητα μπορεί να διατηρηθεί ακόμη και σε αυξημένες θερμοκρασίες. Αυτό τα καθιστά εξαιρετικά χρήσιμα σε εφαρμογές όπου απαιτείται σταθερότητα σε διαφορετικά περιβάλλοντα.
- **Επιφανειακές Ιδιότητες και Ενεργοποίηση Επιφάνειας:** Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά των νανοσωματίδιων μαγνητίτη είναι η δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειας τους. Αυτή η τροποποίηση μπορεί να γίνει με την πρόσθεση οργανικών ή ανόργανων λειτουργικών ομάδων που επιτρέπουν την ενσωμάτωσή τους σε συγκεκριμένα βιολογικά συστήματα ή τη σύνδεσή τους με άλλες μοριακές ή βιολογικές μονάδες.

Μέθοδοι Παραγωγής Νανοσωματίδιων Μαγνητίτη

Η σύνθεση και παρασκευή νανοσωματίδιων μαγνητίτη μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, οι οποίοι επιτρέπουν τη ρύθμιση των χαρακτηριστικών τους, όπως το μέγεθος, η μορφολογία, και η επιφανειακή τους διαμόρφωση.

- **Υδροθερμική Μέθοδος:** Η υδροθερμική μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση νερού ή άλλων διαλυτών για να διαλύσουν αλάτων σιδήρου (Fe^{2+} και Fe^{3+}), τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται υπό υψηλή θερμοκρασία και πίεση για την παραγωγή νανοσωματίδιων μαγνητίτη. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο του μεγέθους και της μορφολογίας των νανοσωματίδιων.
- **Χημική Συνθετική Μέθοδος (Sol-Gel):** Στην μέθοδο Sol-Gel, χρησιμοποιούνται χημικά αντιδραστήρια για να δημιουργηθεί ένα ζελέ, το οποίο, υπό την επίδραση κατάλληλης θερμότητας, καταλήγει στη σύνθεση νανοσωματίδιων μαγνητίτη. Αυτή η μέθοδος προσφέρει υψηλή ποιότητα νανοϋλικών και ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό η μορφολογία τους.
- **Μέθοδος Υγρής Φάσης:** Εδώ, χρησιμοποιούνται διάφοροι διαλύτες ή αναγωγικά μέσα για την απόκτηση νανοσωματίδιων μαγνητίτη μέσω των αντιδράσεων αναγωγής ή οξείδωσης των αλάτων σιδήρου. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να είναι πιο ευέλικτες και οικονομικές.

Εφαρμογές Νανοσωματίδιων Μαγνητίτη

Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη έχουν πολλές εφαρμογές σε διαφορετικούς τομείς, κυρίως λόγω των μαγνητικών τους ιδιοτήτων, αλλά και λόγω της δυνατότητας τροποποίησης της επιφάνειάς τους για να συνδεθούν με άλλες ουσίες, όπως φάρμακα ή βιολογικά μόρια.

ι) Ιατρικές Εφαρμογές

- **Στοχευμένη Χορήγηση Φαρμάκων:** Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη χρησιμοποιούνται για την στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων σε συγκεκριμένα όργανα ή περιοχές του σώματος. Η εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου επιτρέπει την καθοδήγηση των νανοσωματίδιων προς την περιοχή στόχο, όπως π.χ. οι όγκοι. Αυτό επιτρέπει τη μείωση των παρενεργειών των φαρμάκων, καθώς τα φάρμακα απελευθερώνονται απευθείας στο σημείο ενδιαφέροντος.
- **Διάγνωση μέσω Μαγνητικής Τομογραφίας (MRI):** Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ποιότητας των εικόνων στην μαγνητική τομογραφία (MRI). Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη ενσωματώνονται σε βιολογικούς ιστούς και αυξάνουν την ευαισθησία της απεικόνισης, επιτρέποντας την ανίχνευση των παθολογικών καταστάσεων πιο ακριβώς.

- **Μαγνητική Θερμοθεραπεία (Hyperthermia):** Όταν τα νανοσωματίδια μαγνητίτη εκτίθενται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, μπορούν να απορροφήσουν ενέργεια και να την μετατρέψουν σε θερμότητα. Αυτή η θερμότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων, μειώνοντας τις βλάβες στους γειτονικούς ιστούς.

ii) Περιβαλλοντικές Εφαρμογές

- **Αφαίρεση Ρύπων:** Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του νερού και του εδάφους από ρύπους, όπως βαρέα μέταλλα και τοξικές οργανικές ουσίες. Χάρη στη μαγνητική τους ικανότητα, μπορούν να απορροφήσουν ρύπους και να απομακρυνθούν εύκολα με τη χρήση ενός μαγνητικού πεδίου.
- **Ανακύκλωση και Καθαρισμός Εργασιακών Υδάτων:** Στη βιομηχανία, τα νανοσωματίδια μαγνητίτη χρησιμοποιούνται για τη διάσπαση και απομάκρυνση τοξικών χημικών ουσιών από τα απόβλητα νερού, βελτιώνοντας τη διαδικασία καθαρισμού.

iii) Βιομηχανικές Εφαρμογές

- **Μαγνητική Ανίχνευση:** Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη χρησιμοποιούνται σε συσκευές ανίχνευσης, όπως μαγνητικές ετικέτες για την παρακολούθηση αντικειμένων ή προϊόντων. Η εύκολη ανίχνευση τους με μαγνητικά πεδία καθιστά δυνατή την ανάπτυξη συστημάτων για βιομηχανικές εφαρμογές

2. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στην ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και εφαρμογή μιας πρωτότυπης μεθόδου απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων (granulosa cells, GCs) από το ωοθυλακικό υγρό, βασισμένης στη χρήση λειτουργικών μαγνητικών νανοϋλικών. Η ανάγκη για μια αποδοτική, επιλεκτική και ταχεία τεχνική απομόνωσης των GCs καθίσταται επιτακτική λόγω της κεντρικής σημασίας που διαδραματίζουν τα κύτταρα αυτά στη γυναικεία γονιμότητα, στη ρύθμιση της ωοθυλακιορρηξίας και στη συνολική ποιότητα των ωαρίων. Η αλληλεπίδραση των κοκκωδών κυττάρων με τα ωοκύτταρα είναι θεμελιώδους σημασίας για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την επιτυχή ωρίμανση των ωαρίων, ενώ η ανάλυση της κατάστασής τους μπορεί να παρέχει έμμεσες αλλά πολύτιμες πληροφορίες για την αναπαραγωγική ικανότητα μιας γυναίκας.

Η απομόνωση των GCs αποτελεί κρίσιμο βήμα για τη μελέτη των μοριακών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών τους. Οι υπάρχουσες τεχνικές απομόνωσης, όπως η φυγοκέντρηση με διαβαθμισμένη πυκνότητα (Ficoll, Percoll), η χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων και η κυτταρομετρία ροής, αν και αποδοτικές σε ορισμένες περιπτώσεις, παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, όπως η χαμηλή καθαρότητα του δείγματος, η παρατεταμένη διάρκεια της διαδικασίας, η μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα και η ανάγκη για δαπανηρό εξοπλισμό. Ειδικότερα, οι τεχνικές κυτταρομετρίας ροής (FACS), αν και παρέχουν υψηλό βαθμό καθαρότητας, συνοδεύονται από υψηλό κόστος και πιθανές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων λόγω της χρήσης αντισωμάτων και ισχυρών διατμητικών δυνάμεων. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μιας μεθόδου που να συνδυάζει ταχύτητα, επιλεκτικότητα και υψηλή απόδοση ανάκτησης ζώντων κοκκωδών κυττάρων είναι αναγκαία τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για κλινικές εφαρμογές.

Η προτεινόμενη τεχνική βασίζεται στη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα οποία έχουν τροποποιηθεί επιφανειακά με υαλουρονικό οξύ (HA), το οποίο συνδέεται εκλεκτικά με τον υποδοχέα CD44 που εκφράζεται στα GCs. Η συγκεκριμένη στρατηγική παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η δυνατότητα ταχείας και μη επεμβατικής απομόνωσης των κυττάρων, η υψηλή καθαρότητα του τελικού δείγματος και η ελαχιστοποίηση των επιβλαβών επιπτώσεων στην κυτταρική δομή και λειτουργία. Η

διαδικασία διαρκεί περίπου 30 λεπτά και επιτυγχάνει ανάκτηση κυττάρων με απόδοση άνω του 96%, διατηρώντας ταυτόχρονα την κυτταρική τους βιωσιμότητα σε επίπεδα άνω του 93-95%.

Ένα ακόμη κρίσιμο σκέλος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της ποιότητας των απομονωμένων κοκκωδών κυττάρων και της αναπαραγωγικής ικανότητας των γυναικών. Δεδομένου ότι τα GCs αντανακλούν σε μεγάλο βαθμό το μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου, η ανάλυση των μεταβολικών τους δεικτών, του επιπέδου οξειδωτικού στρες και της γονιδιακής τους έκφρασης μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την ποιότητα των ωαρίων. Έτσι, η προτεινόμενη μέθοδος θα μπορούσε να συμβάλει στη βελτίωση της προγνωστικής ικανότητας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς και στην ανάπτυξη νέων βιοδεικτών γονιμότητας.

Η παρούσα μελέτη αναμένεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη βασική έρευνα της αναπαραγωγικής βιολογίας, στην κλινική πρακτική και στη βιοτεχνολογία. Οι εφαρμογές της περιλαμβάνουν τη χρήση των απομονωμένων κοκκωδών κυττάρων για την ανάπτυξη *in vitro* καλλιεργειών για μελέτες φαρμακογονιδιωματικής, αναγεννητικής ιατρικής και αξιολόγησης της δράσης ορμονικών παραγόντων. Επιπλέον, η προτεινόμενη τεχνική μπορεί να αποτελέσει ένα εργαλείο για τη διαγνωστική αξιολόγηση γυναικών με χαμηλή γονιμότητα, καθώς και για την καλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωαρίων.

Συνολικά, η προτεινόμενη τεχνολογία αναμένεται να προσφέρει μια πρωτοποριακή, αξιόπιστη και κλινικά εφαρμόσιμη λύση για την απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων, ενισχύοντας τη δυνατότητα αξιοποίησής τους στη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα της γονιμότητας και της αναπαραγωγικής βιολογίας.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (analytical grade) ή υψηλότερης, όπου απαιτούνταν, και προμηθεύτηκαν από αξιόπιστες εταιρείες χημικών προϊόντων.

- **Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων**
 - Τριχλωριούχος σίδηρος ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq 98\%$) – Sigma-Aldrich
 - Διχλωριούχος σίδηρος ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$) – Sigma-Aldrich
 - Αμμωνία (NH_4OH , 25% w/v) – Merck
 - Τετρααιθοξυσιλάνιο (TEOS, 99.9%) – Sigma-Aldrich
 - Βρωμιούχο εξαδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB, $\geq 98\%$) – Sigma-Aldrich
- **Λειτουργικοποίηση νανοσωματιδίων με υαλουρονικό οξύ**
 - Υαλουρονικό οξύ νατρίου χαμηλού μοριακού βάρους (3,000-5,000 Da) – Cymit Química
 - Δις-απεσταγμένο ύδωρ (DDW) – Εργαστηριακή παρασκευή
 - Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS, pH 7.4) – Sigma-Aldrich
- **Διαλύματα απομόνωσης και καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων**
 - Μέσο καλλιέργειας DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) – Gibco
 - Αντιβιοτικό διάλυμα (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) – Thermo Fisher
 - Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (0.25%) – Sigma-Aldrich
 - Υδατικό διάλυμα υαλουρονιδάσης (50 IU/mL) – Sigma-Aldrich
 - Διάλυμα trypan blue (0.4%) – Sigma-Aldrich
 - Ficoll-Paque PLUS
 - Anti-CD44-FITC (Φθοριοσημασμένο αντίσωμα έναντι του CD44)
 - FACS Buffer (PBS + 1% BSA + 2 mM EDTA) – Sigma-Aldrich
 - RPMI-1640 (Καλλιεργητικό μέσο) – Gibco
 - FBS (Fetal Bovine Serum, 10%) – Sigma-Aldrich
 - Trypan Blue (0.4% w/v) – Sigma-Aldrich
 - Crystal Violet (0.5% w/v) – Sigma-Aldrich

- RBC Lysis Buffer (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM) – Sigma-Aldrich
- Choriogonadotropin alfa (hCG, 250 mg) – Sigma-Aldrich
- Follicle-Stimulating Hormone (FSH, 150-300 IU) – Sigma-Aldrich

3.2 Υλικά και εξοπλισμός

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υψηλής ποιότητας εργαστηριακά υλικά και αναλώσιμα:

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 1.5 mL, 15 mL και 50 mL
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf (1.5 mL)
- Τρυβλία 24 φρεατίων
- Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο)
- Καλυπτρίδες (22 × 22 mm)
- Φίλτρα 70 μm
- Μικροπιπέτες (2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL)
- Pipette tips αποστειρωμένα
- Πυριαντήριο
- Μαγνητικός αναδευτήρας με θέρμανση – IKA C-MAG HS 7
- Υπερήχων λουτρό για διασπορά νανοσωματιδίων – Branson 2510
- Μαγνήτες νεοδυμίου (15 kg και 2.5 kg pull force) – Supermagnete
- Σωληνάρια φυγοκέντρωσης (1.5 mL, 15 mL, 50 mL) – Eppendorf
- Φυγόκεντρος υψηλής ταχύτητας – Thermo Scientific Sorvall ST 16R
- Οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 10×, 40×)
- Φασματοφωτόμετρο
- Σύστημα κυτταρομετρίας ροής
- Συσκευή περιδίνησης
- Αποστειρωμένος θάλαμος εργασίας
- Επωαστικός θάλαμος

Η επιλογή των παραπάνω αντιδραστηρίων, διαλυτών και υλικών διασφαλίζει την ακρίβεια, επαναληψιμότητα και αξιοπιστία των πειραματικών διαδικασιών που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη.

3.3 Πειραματικές πορείες

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη σύνθεση και χαρακτηρισμό μαγνητικών νανοσωματιδίων, τη λειτουργικοποίησή τους με υαλουργικό οξύ, καθώς και την απομόνωση και αξιολόγηση κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό. Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή των επιμέρους πειραματικών διαδικασιών.

3.3.1. Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων Fe_3O_4

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια Fe_3O_4 παρασκευάστηκαν μέσω της μεθόδου της συγκαταβύθισης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: Σε ποτήρι ζέσης διαλύθηκαν 2.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 1.0 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε 50 mL απεσταγμένου νερού υπό έντονη ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στους 500 rpm. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 80°C απουσία οξυγόνου με διαβίβαση αζώτου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 mL διαλύματος NH_4OH (25% w/v) υπό συνεχή ανάδευση, για ρύθμιση του pH στο 10 και τι μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά, σχηματίζοντας μαγνητικά νανοσωματίδια Fe_3O_4 . Τα νανοσωματίδια συλλέχθηκαν με μαγνήτη, πλύθηκαν 3 φορές με νερό και τρεις φορές με αιθανόλη [143].

3.3.2 Επικάλυψη μαγνητικών νανοσωματιδίων με SiO_2

Για την επικάλυψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων με SiO_2 , τα νανοσωματίδια μαγνητίτη που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη προηγούμενη μέθοδο, τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη μαζί με 45 mL αιθανόλης. Μετά από διασπορά των νανοσωματιδίων σε λουτρό υπερήχων για 1 λεπτό, το μίγμα αναδευόταν έντονα με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα στα 800 rpm. Υπο ανάδευση προστέθηκαν 3 mL πυκνής αμμωνίας (25% w/v) και στη συνέχεια προστέθηκαν σταγόνην 0,45 mL TEOS (tetraethoxysilane). Το μίγμα αφέθηκε υπο ανάδευση όλο το βράδυ. Εν συνεχεία, τα μαγνητικά νανοσωματίδια απομονώθηκαν με τη χρήση μαγνήτη, πλύθηκαν 3 φορές με νερό και τρεις φορές με αιθανόλη και τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο στους 60°C όλο το βράδυ για ξήρανση [143].

3.3.3 Λειτουργικοποίηση νανοσωματιδίων με υαλουρονικό οξύ (HA)

Η τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με υαλουρονικό οξύ πραγματοποιήθηκε για να επιτευχθεί ειδική σύνδεση με τα κοκκώδη κύτταρα. Για την λειτουργικοποίηση, 10 mg νανοσωματιδίων $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ διασπάρθηκαν σε 1 mL νερό, με χρήση λουτρού υπερήχων. Έπειτα, προστέθηκαν 4 mL διαλύματος CTAB (50 mg/4mL). Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση όλο το βράδυ. Έπειτα, τα νανοσωματίδια συλλέχθηκαν με μαγνήτη και εκπλύθηκαν 2 φορές με νερό. Έπειτα, τα νανοσωματίδια διασπάρθηκαν σε 1 mL νερό και προστέθηκε 1 mL διαλύματος υαλουρονικού οξέος (5 mg mL⁻¹. 3000-5000 MW), Το μίγμα αναδεύτηκε με χρήση συσκευής περιδίνησης για 1 λεπτό και έπειτα τα νανοσωματίδια πλύθηκαν με νερό και τοποθετήθηκαν σε πυριαντήριο στους 60°C για απομάκρυνση της υγρασίας [144].

3.3.5 Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των ερευνητικών δεδομένων, για τη διεξαγωγή της μελέτης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με όσα ορίζονται στην Υπουργική Απόφαση αριθμ. ΔΥΓ3(α) οικ. 18910/19-2-2013 (ΦΕΚ 390/τΒ/21-2-2013) έπειτα από αδειοδότηση από το Δ.Σ. του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Αριθ. 30/29-11-2018 (Θ.18)) έπειτα από εισήγηση του Επιστημονικού Συμβουλίου (αριθμ. Πρωτ. 33799/14-11-2018). Για την ανάπτυξη και την επαλήθευση της διαδικασίας απομόνωσης, συλλέχθηκαν συνολικά 66 δείγματα, κατόπιν έγγραφης ενημερωμένης συγκατάθεσης των ασθενών, από τη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Ελλάδα. Τα δείγματα αφορούσαν ωοθυλακικό υγρό, το οποίο προερχόταν από ασθενείς που υποβάλλονταν σε θεραπευτικά πρωτόκολλα και, ελλείψει ερευνητικής χρήσης, θα απορρίπτονταν. Το ωοθυλακικό υγρό συλλέχθηκε από μεμονωμένα ωοθυλάκια 30 γυναικών, οι οποίες υποβλήθηκαν είτε σε ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών (Controlled Ovarian Stimulation - COS) είτε σε φυσικό κύκλο. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν μεταξύ 20 και 40 ετών.

Η ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανταγωνιστών GnRH και είτε ανασυνδυασμένης ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle-Stimulating Hormone – FSH) είτε καθαρής FSH, σε ημερήσια δοσολογία 150-300 IU. Η τελική

ωρίμανση των ωοκυττάρων επήλθε με τη χορήγηση 250 mg χοριογοναδοτροπίνης άλφα (choriogonadotropin alfa), όταν εντοπίζονταν τουλάχιστον τρία ωοθυλάκια διαμέτρου ≥ 18 mm μέσω υπερηχογραφικού ελέγχου.

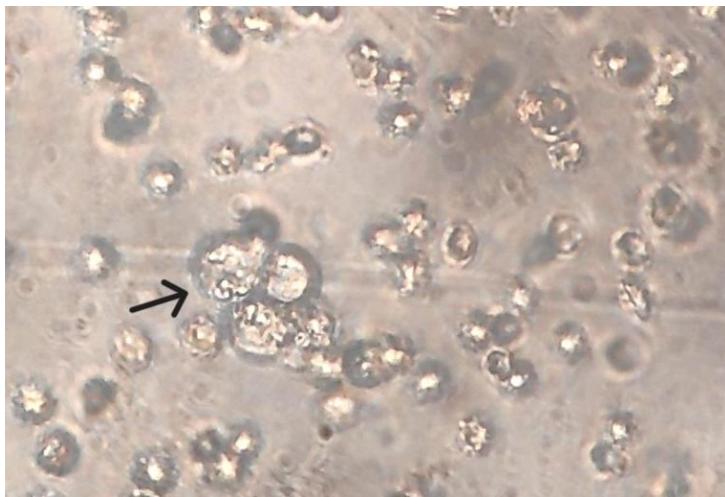
Στις ασθενείς χορηγήθηκε ανασυνδυασμένη χοριακή γοναδοτροπίνη (rec-hCG) 250 mg, παρουσία οιστραδιόλης σε συγκέντρωση ≥ 200 mg/mL και απουσία αιχμής της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Η ωοληψία πραγματοποιήθηκε διακολπικά υπό καθοδήγηση υπερήχου, 34-36 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG. Η θεραπεία εγκαταλείφθηκε σε περιπτώσεις ανεπαρκούς ανάπτυξης ωοθυλακίων, η οποία ορίστηκε ως η απουσία αύξησης της διαμέτρου των ωοθυλακίων σε δύο διαδοχικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους, σε συνδυασμό είτε με πτώση των επιπέδων οιστραδιόλης στον ορό είτε με πρόωρη αιχμή LH (οριζόμενη ως αύξηση της LH σε τιμή τριπλάσια της βασικής τιμής της κατά τη 2η ημέρα του κύκλου, με ταυτόχρονη παρουσία ωοθυλακίου μικρότερου των 17 mm).

Μετά τη γονιμοποίηση των ωοκυττάρων μέσω ενδοκυτταροπλασματικής ένεσης σπερματοζωαρίου (Intracytoplasmic Sperm Injection – ICSI), η εμβρυομεταφορά πραγματοποιήθηκε την 3η ή την 5η ημέρα με χρήση εύκαμπτου καθετήρα.

3.3.6 Διαδικασία απομόνωσης κυττάρων

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις ασθενείς υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα εκπλύθηκε με 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (phosphate-buffered saline – PBS). Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση και νέα έκπλυση με PBS. Στο τελικό κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 3 mL PBS και το διάλυμα ανακινήθηκε έντονα (vortex) για 30 δευτερόλεπτα. Σε σωληνάριο τύπου Eppendorf προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα νανοϋλικού (3 mg ανά 100.000 κύτταρα) και 0,1 mL PBS. Το μείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενής διασπορά των νανοσωματιδίων. Ακολούθως, το κυτταρικό αιώρημα και το αιώρημα των νανουλικών αναμίχθηκαν και το μίγμα επωάστηκε υπό ήπια ανάδευση για 10 λεπτά. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια, στα οποία είχαν συνδεθεί τα κοκκώδη κύτταρα, απομονώθηκαν με τη χρήση μαγνήτη, ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το υλικό εκπλύθηκε δύο φορές με PBS και τέλος προστέθηκε 1

mL PBS. Για την αποδέσμευση των κυττάρων από τα νανοσωματίδια, προστέθηκε Προστέθηκε διάλυμα υαλουρονιδάσης (50 IU/mL) για 10 λεπτά στους 37°C ώστε να αποδεσμευτούν τα κύτταρα. Τα νανοσωματίδια συλλέχθηκαν με μαγνήτη και το υπερκείμενο υγρό που περιείχε τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε περεταίρω.



Κοκκώδη κύτταρα δικό μας υλικό

3.3.7 Καταμέτρηση απομονωμένων κυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα που απομονώθηκαν μέσω της προτεινόμενης μεθόδου συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν με 500 μ L PBS, ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές κυτταρικό αιώρημα. Για την αποφυγή συσσωμάτωσης, το δείγμα υποβλήθηκε σε ήπια ανάδευση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, λήφθηκαν 10 μ L από το κυτταρικό αιώρημα για την καταμέτρηση. Η πλάκα Neubauer καθαρίστηκε με 70% αιθανόλη, αφήνοντας την επιφάνεια να στεγνώσει πλήρως πριν από τη φόρτωση του δείγματος. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα εφαρμόζοντας ήπια πίεση, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή προσκόλλησή της και ο σχηματισμός θαλάμου σταθερού πάχους (0.1 mm). Με τη χρήση μικροπιπέτας, 10 μ L από το κυτταρικό αιώρημα τοποθετήθηκαν στην εγχάρακτη περιοχή της πλάκας Neubauer. Το υγρό διανεμήθηκε ομοιόμορφα στον θάλαμο με τριχοειδή δράση, χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ακρίβεια της καταμέτρησης. Το αιμοκυτταρόμετρο τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο και εξετάστηκε με μεγέθυνση 10 $\times$ για αρχική ευθυγράμμιση και 40 $\times$ για λεπτομερή καταμέτρηση. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 5 τετράγωνα του κεντρικού πλέγματος της πλάκας Neubauer, τα οποία περιλάμβαναν 4 γωνιακά τετράγωνα και

1 κεντρικό. Για την εξασφάλιση της ακρίβειας, τα κύτταρα που άγγιζαν τις άνω και αριστερές γραμμές συμπεριλήφθηκαν στην καταμέτρηση, ενώ εκείνα που άγγιζαν τις κάτω και δεξιές γραμμές αποκλείστηκαν. Η διαδικασία καταμέτρησης επαναλήφθηκε τρεις φορές στο ίδιο δείγμα και υπολογίστηκε η μέση τιμή για τον ακριβή προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης [145].

3.3.8 Καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες. Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 1% αντιβιοτικά και 10% βόειο ορό στους 37°C με 5% CO₂. Τα κύτταρα MDA-MB καλλιεργήθηκαν σε RPMI-1640 ενώ τα κύτταρα HEK-293 καλλιεργήθηκαν σε DMEM με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και 1% γλουταμίνη. Οι ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνταν κάθε 2-3 ημέρες με την παρακάτω διαδικασία: αρχικά το θρεπτικό αφαιρείται από την φλάσκα και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS. Στη συνέχεια προστίθεται θρυψίνη (τόση ώστε να καλύψει την επιφάνεια των κυττάρων) και τα αποκολλημένα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 2000 rpm. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό και περίπου το 1/3 από αυτά προτίθεται σε νέα φλάσκα [145].

3.3.9 Βιωσιμότητα κυττάρων

Ο πληθυσμός των κυττάρων υπολογίστηκε με την μέθοδο του κρυσταλλικού κρυσταλλικού ιώδους, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη. Κατάλληλος αριθμός κυττάρων εμβολιάστηκε σε τρυβλία των 24 φρεατίων και επωάστηκαν για 24 ή 48 ώρες. Σε κάθε συνθήκη παρασκευάστηκαν τρία ίδια δείγματα. Μετά από 24 ή 48 ώρες το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και σε κάθε θέση προστέθηκαν 200 μL διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Έπειτα το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους ξεπλύθηκε βυθίζοντας τα τρυβλία σε απεσταγμένο ύδωρ. Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους αφαιρέθηκε από τα κύτταρα με μεθανόλη. Για να γίνει αυτό τα κύτταρα επωάστηκαν με 1 mL μεθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά (η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές) και μετρήθηκε η

απορρόφηση στα 570 nm. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό των κυττάρων ελέγχου, χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

Βιωσιμότητα κυττάρων (%)

$$= \frac{\text{απορρόφηση δείγματος} - \text{απορρόφηση δείγματος ελέγχου}}{\text{απορρόφηση δείγματος ελέγχου}} \times 100$$

Όπου A η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου [145].

3.3.10 Μέθοδος απομόνωσης λευκών και ερυθρών κυττάρων.

Η διαφορική φυγοκέντρωση αποτελεί μια απλή και αποδοτική μέθοδο για την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) από το ολικό αίμα. Το ολικό αίμα αναμείχθηκε απαλά με αναστροφή των σωλήνων 5 φορές, ώστε να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Σε αποστειρωμένους σωλήνες 15 mL, προστέθηκαν 10 mL αίματος και αραιώθηκαν με ισόποσο όγκο PBS (1:1). Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στους 500 g για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία RT (20-22°C). Μετά τη φυγοκέντρωση, το δείγμα διαχωρίστηκε στα εξής στρώματα:

1. Πλάσμα (κίτρινο, περιέχει πρωτεΐνες και μικρό αριθμό λευκοκυττάρων).
2. Buffy coat (λευκή στιβάδα που περιέχει τα WBCs και αιμοπετάλια).
3. Ερυθρά αιμοσφαίρια (στον πυθμένα).

Το υπερκείμενο (πλάσμα και buffy coat) συλλέχθηκε προσεκτικά χωρίς να διαταραχθεί το στρώμα των RBCs και μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 15 mL.

Το δείγμα που περιείχε το Buffy coat φυγοκεντρήθηκε ξανά στους 200 g για 10 λεπτά, ώστε να καθιζήσουν τα WBCs και να διαχωριστούν από τα αιμοπετάλια.

- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, και το ίζημα (WBCs) επανααιωρήθηκε σε 1 mL PBS για ανάλυση ή περαιτέρω επεξεργασία.
- Για την απομάκρυνση ερυθρών κυττάρων που πιθανώς περιέχονταν στο δείγμα, τα WBCs εκπλύθηκαν με 10 mL PBS και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση στους 200 g για 5 λεπτά.

Το ίζημα των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) που παρέμεινε στον πυθμένα του πρώτου σταδίου φυγοκέντρωσης εκπλύθηκε με PBS και φυγοκεντρήθηκε ξανά στους 1,500 g για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές πρωτεϊνικές ακαθαρσίες.

Για τον καθαρισμό τους από υπολειμματικά λευκοκύτταρα, τα RBCs υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με λυτικό διάλυμα ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC lysis buffer):

- 10 mL RBC lysis buffer προστέθηκαν στο δείγμα και επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αναδεύοντας απαλά κάθε 30 δευτερόλεπτα.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στους 500 g για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα RBCs εκπλύθηκε με PBS.
- Τα RBCs επανααιωρήθηκαν σε 1 mL PBS για αποθήκευση ή ανάλυση.

3.3.11 Μέθοδος απομόνωσης κυττάρων με φικόλη.

Το ωοθυλακικό υγρό που συλλέχθηκε από τις ασθενείς φυγοκεντρήθηκε στους 1,500 g για 10 λεπτά για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το κυτταρικό ίζημα επανααιωρήθηκε σε 5 mL PBS. Σε αποστειρωμένο σωλήνα 15 mL, προστέθηκαν 3 mL Ficoll-Paque στον πυθμένα. Στη συνέχεια, το ανασπαρμένο κυτταρικό δείγμα (5 mL) προστέθηκε προσεκτικά πάνω από το Ficoll, σχηματίζοντας δύο διακριτά στρώματα [146].

Ο σωλήνας φυγοκεντρήθηκε στους 400 g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς πέδηση.

Μετά τη φυγοκέντρωση, το δείγμα διαχωρίστηκε στα εξής στρώματα:

1. Υπερκείμενο πλάσμα (κυρίως πρωτεΐνες και θρεπτικά συστατικά).
2. Δακτύλιος κυττάρων (buffy coat) – περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα και λευκά αιμοσφαίρια.
3. Στρώμα Ficoll (διαχωριστικό μέσο).
4. Καταβυθισμένα κύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια και κυτταρικά υπολείμματα).

Το buffy coat συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 15 mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με PBS (10 mL ανά εκπλύση) και φυγοκεντρήσεις στους 400 g για 5 λεπτά για την απομάκρυνση του Ficoll.

Το τελικό κυτταρικό ίζημα επανααιωρήθηκε σε 1 mL DMEM/F-12 με 10% FBS, έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση ή καλλιέργεια.

3.3.12 Μέθοδος απομόνωσης κυττάρων με FACS.

Τα κοκκώδη κύτταρα συλλέχθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό και φυγοκεντρήθηκαν στους 1,500 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με PBS. Το κυτταρικό ίζημα επανααιωρήθηκε σε 100 μ L FACS Buffer και επώαστηκε με αντίσωμα anti-CD44-FITC (5 μ g/mL) στους 4°C για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά την επώαση, τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με PBS, ώστε να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Το δείγμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου 70 μ m, ώστε να αποφευχθούν συσσωματώματα που θα μπορούσαν να παρεμβαίνουν στην κυτταρομετρία. Το FACS ρυθμίστηκε ώστε να ανιχνεύει το φθορίζον σήμα του FITC (488 nm excitation, 530 nm emission), και η ταξινόμηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε βάσει της έντασης του φθορισμού. Τα CD44⁺ κύτταρα (κοκκώδη κύτταρα) συλλέχθηκαν σε σωλήνες περιέχοντες 1 mL FACS Buffer, έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση.

3.3.13 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, και κάθε πείραμα διεξήχθη τουλάχιστον 3 φορές, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τουλάχιστον 9 μετρήσεις για κάθε παράμετρο, για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Για τον έλεγχο της κανονικότητας των δεδομένων, εφαρμόστηκε το τεστ Kolmogorov–Smirnov. Σε περιπτώσεις όπου τα δεδομένα ακολούθησαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Όταν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), πραγματοποιήθηκε περαιτέρω σύγκριση μεταξύ των ομάδων με τη χρήση του post hoc ελέγχου Tukey HSD (honestly significant difference),

εφαρμόζοντας τη μέθοδο Tukey–Kramer για τη διόρθωση των πολλαπλών συγκρίσεων. Σε περιπτώσεις όπου τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές δοκιμές, όπως το τεστ Kruskal–Wallis, ακολουθούμενο από post hoc έλεγχο Dunn για πολλαπλές συγκρίσεις. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ standard deviation, SD). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 26), ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. Η ανωτέρω μεθοδολογία διασφαλίζει την αξιόπιστη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, την αντικειμενική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την απόδοση των νανοϋλικών στην απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Η επιτυχής ανάπτυξη και εφαρμογή των μαγνητικών νανοϋλικών για την απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό προϋποθέτει τον φυσικοχημικό τους χαρακτηρισμό. Στο πλαίσιο αυτό, έγινε ανάλυση της σύστασής τους για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικοποίηση με υαλουρονικό οξύ και ανάλυση μεγέθος για να διαπιστωθεί ότι τα σωματίδια είναι εντός της νανοκλίμακας.

4.1.1. Χαρακτηρισμός των νανοϋλικών μέσω FTIR

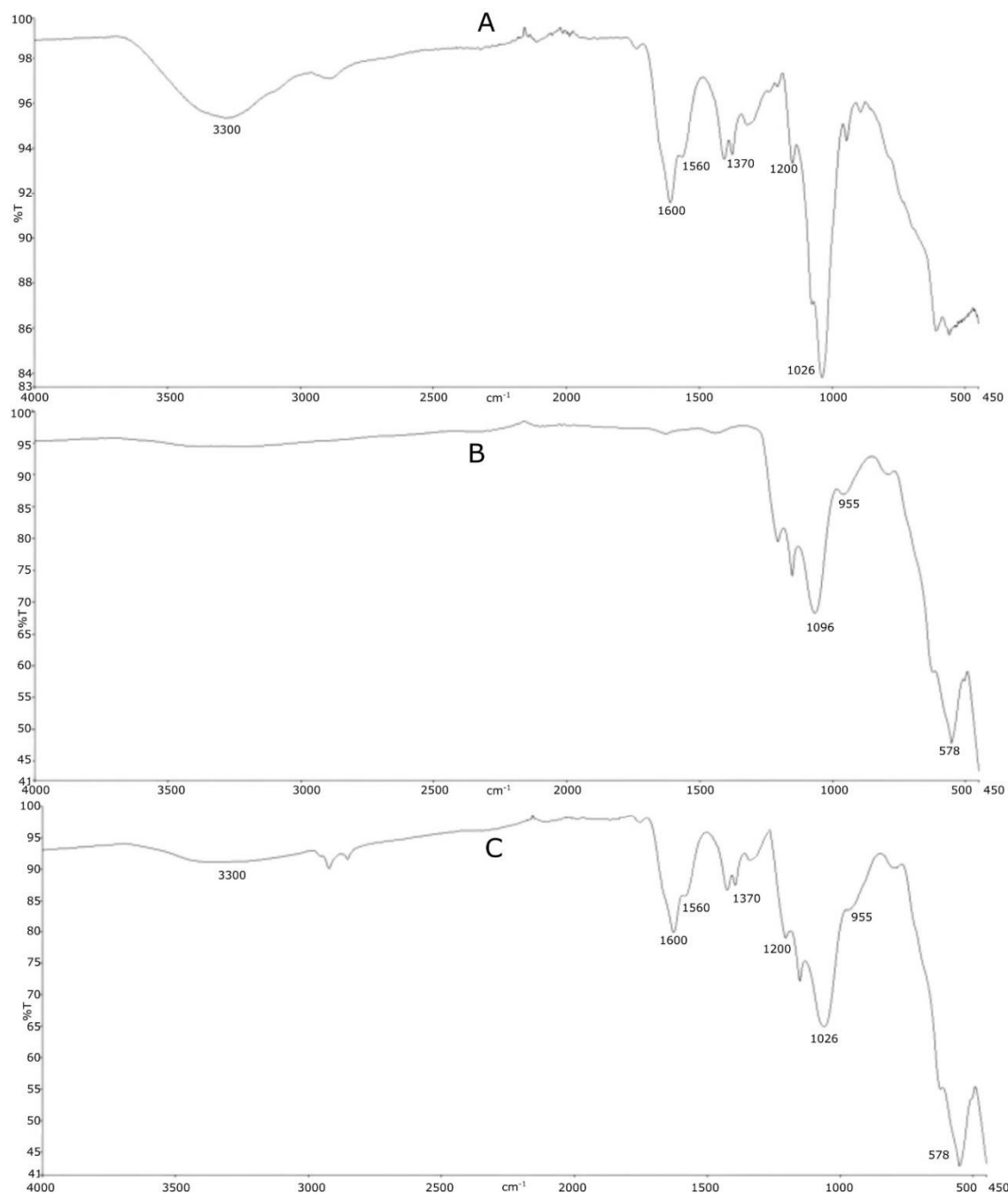
Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών δομικών ομάδων των υλικών που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4. Με την λήψη των εν λόγω φασμάτων κατέστη δυνατή η σύγκριση μεταξύ του υαλουρονικού οξέος, των νανοσωματιδίων μαγνητίτη επικαλυμμένων με διοξείδιο του πυριτίου και της τελικής δομής μετά την τροποποίηση με υαλουρονικό οξύ.

Το φάσμα του υαλουρονικού οξέος (HA) εμφανίζει έντονη κορυφή απορρόφησης περίπου στα 3300 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις τάσεις εκτάσεως των δεσμών O–H και N–H, χαρακτηριστικές των υδροξυλίων και αμινοομάδων του HA. Επιπλέον, παρατηρούνται κορυφές στα 1600 cm^{-1} και 1560 cm^{-1} , οι οποίες σχετίζονται με τις τάσεις εκτάσεως των δεσμών C=O των καρβοξυλικών ομάδων. Οι κορυφές στα 1370 cm^{-1} και 1200 cm^{-1} συνδέονται με τις C–O–C δεσμεύσεις των γλυκοζιτικών δεσμών του HA, ενώ η κορυφή στα 1026 cm^{-1} αντιστοιχεί στις τάσεις εκτάσεως των δεσμών C–O [143,147–149].

Στο φάσμα του $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ παρατηρείται σημαντική κορυφή απορρόφησης στα 1096 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις τάσεις εκτάσεως των δεσμών Si–O–Si, επιβεβαιώνοντας την παρουσία του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων μαγνητίτη. Η κορυφή στα 955 cm^{-1} μπορεί να συσχετιστεί με τις τάσεις εκτάσεως των δεσμών Si–OH, γεγονός που δηλώνει την παρουσία ελεύθερων υδροξυλίων στην επιφάνεια του SiO_2 . Επιπλέον, η χαρακτηριστική κορυφή στα 578 cm^{-1} αποδίδεται στις τάσεις εκτάσεως των δεσμών Fe–O, οι οποίες προέρχονται από τη δομή του μαγνητίτη (Fe_3O_4).

Στο φάσμα του $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$, παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές που αποδεικνύουν την επιτυχή τροποποίηση των νανοσωματιδίων με υαλουρονικό οξύ. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 3300 cm^{-1} , η οποία ήταν έντονη στο φάσμα του HA, εμφανίζεται πλέον και στο τροποποιημένο νανοϋλικό, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία των υδροξυλίων και αμινοομάδων του HA στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Παράλληλα, οι κορυφές στα 1600 cm^{-1} και 1560 cm^{-1} , που σχετίζονται με τις καρβοξυλικές ομάδες του HA, διατηρούνται και στο τελικό υλικό, επιβεβαιώνοντας τη χημική προσκόλληση του υαλουρονικού οξέος στα νανοσωματίδια. Οι κορυφές στα 1370 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} και 1026 cm^{-1} , που αποδίδονται στις γλυκοζιτικές και C–O δεσμεύσεις του HA, παραμένουν επίσης ορατές. Επιπλέον, η παρουσία των χαρακτηριστικών κορυφών του SiO_2 και του Fe_3O_4 στα 1096 cm^{-1} και 578 cm^{-1} , αντίστοιχα, υποδεικνύει ότι η βασική δομή των νανοσωματιδίων δεν αλλοιώθηκε από την επικάλυψη.

Η σύγκριση των φασμάτων FTIR μεταξύ των $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ και $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$ καταδεικνύει την επιτυχή επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωματιδίων με υαλουρονικό οξύ. Τα νέα χαρακτηριστικά σήματα που προέρχονται από το HA και εμφανίζονται στο φάσμα του $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$, σε συνδυασμό με τη διατήρηση των χαρακτηριστικών κορυφών του SiO_2 και του Fe_3O_4 , επιβεβαιώνουν την επιτυχή επικάλυψη του νανοϋλικού.



Εικόνα 4: Φάσματα FTIR του (Α) υαλουρονικού οξέος (HA), (Β) $Fe_3O_4@SiO_2$ και (C) $Fe_3O_4@SiO_2@HA$.

Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του υαλουρονικού οξέος με νανοσωματίδια μαγνητίτη (Fe_3O_4) επικαλυμμένα με πυριτία (SiO_2) βασίζεται σε διάφορες φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες καθορίζονται από την επιφανειακή χημεία των νανοσωματιδίων και τις ιδιότητες του υαλουρονικού οξέος. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι κρίσιμη για εφαρμογές στη βιοϊατρική, τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων και την κυτταρική απομόνωση [150–152].

Το υαλουρονικό οξύ είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης [153]. Διαθέτει:

- Αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλομάδες ($-\text{COO}^-$) σε φυσιολογικό pH.
- Υδροξυλομάδες ($-\text{OH}$) και αμιδικές ομάδες ($-\text{NHCOCH}_3$) που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου.
- Ικανότητα προσρόφησης σε επιφάνειες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου.

Τα νανοσωματίδια μαγνητίτη διαθέτουν:

- Μαγνητικές ιδιότητες, που επιτρέπουν τη χρήση τους σε μαγνητικά πεδία.
- Ομάδες $\text{Fe}-\text{OH}$ στην επιφάνεια, που μπορούν να αντιδράσουν με άλλες χημικές ενώσεις.
- Μετά την επικάλυψη με SiO_2 , η επιφάνεια αποκτά σιλοξανικές ($-\text{Si}-\text{OH}$) και σιλοξυλικές ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) ομάδες, οι οποίες διευκολύνουν την τροποποίηση και τη σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων.

Η αλληλεπίδραση του υαλουρονικού οξέος με τα νανοσωματίδια $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ προκύπτει μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

(α) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

- Το υαλουρονικό οξύ φέρει αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλομάδες ($-\text{COO}^-$).
- Τα νανοσωματίδια $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ φέρουν πρωτονιωμένες σιλοξανικές ομάδες ($-\text{Si}-\text{OH}_2^+$) ή ομάδες $\text{Fe}-\text{OH}_2^+$ σε όξινο ή ουδέτερο pH.
- Αυτή η αντίθεση φορτίου οδηγεί σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις, προσδίδοντας σταθερότητα στο σύστημα.

(β) Δεσμοί υδρογόνου

- Οι υδροξυλομάδες ($-\text{OH}$) του SiO_2 και οι καρβοξυλομάδες ($-\text{COOH}$) του υαλουρονικού οξέος σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου.
- Οι αμιδικές ομάδες ($-\text{NHCOCH}_3$) του HA μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις υδροξυλομάδες του SiO_2 .

- Αυτοί οι δεσμοί αυξάνουν την πρόσφυση του υαλουρονικού οξέος στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων.

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας FTIR υποδεικνύουν ότι η τροποποίηση των νανοσωματιδίων $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ με υαλουρονικό οξύ ήταν επιτυχής. Η παρουσία των χαρακτηριστικών κορυφών του υαλουρονικού οξέος στο τελικό νανοϋλικό $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$ υποδηλώνει ότι το HA έχει συνδεθεί στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, πιθανότατα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου με της υδροξυλικές ομάδες του SiO_2 .

Η χρήση του SiO_2 ως ενδιάμεσου στρώματος διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη σταθερότητα και τη βιοσυμβατότητα του νανοϋλικού. Η παρουσία των Si-OH ομάδων στο φάσμα FTIR υποδηλώνει ότι η επιφάνεια των νανοσωματιδίων παραμένει υδροφιλική, γεγονός που διευκολύνει την αλληλεπίδραση με τα μόρια του HA. Η επιτυχής επικάλυψη με HA αναμένεται να βελτιώσει τη βιοσυμβατότητα και τη στοχευμένη μεταφορά του νανοϋλικού σε βιολογικά συστήματα, λόγω της αναγνωρισιμότητας του HA από υποδοχείς CD44 που εκφράζονται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η επιφανειακή τροποποίηση των μαγνητικών νανοσωματιδίων με HA μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική για εφαρμογές στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων και βιοϊατρικών χρήσεων. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες, της η θερμοσταθερότητα και η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του νανοϋλικού με κύτταρα, είναι απαραίτητες για την πλήρη αξιολόγηση της απόδοσης του υλικού.

4.1.2. Χαρακτηρισμός του μεγέθους και του φορτίου των νανοϋλικών με DLS

Η Δυναμική Σκεδασμομετρία Φωτός (DLS) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h), του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού (ζ -potential) των νανοσωματιδίων μαγνητίτη (Fe_3O_4), μαγνητίτη επικαλυμμένου με πυριτία ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) και μαγνητίτη επικαλυμμένου με πυριτία και

λειτουργικοποιημένου με υαλουρονικό οξύ ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$). Αυτές οι μετρήσεις παρέχουν πληροφορίες για το μέγεθος, την κατανομή μεγέθους και τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε υδατικά διαλύματα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα ανάλυσης σωματιδίων με DLS

	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	Z-δυναμικό (mV)
Fe_3O_4	52 ± 3	0,3	-20
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	76 ± 4	0,2	-30
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{HA}$	130 ± 7	0,1	-40

Τα σωματίδια καθαρού μαγνητίτη έχουν μικρή υδροδυναμική διάμετρο περίπου 50 nm, η οποία μπορεί να μεταβάλλεται, ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσης και τη σταθερότητα του κολλοειδούς διαλύματος. Τιμές του PDI γύρω στα 0,2–0,3 δείχνουν σχετικά ομοιογενή σωματίδια, αν και μπορεί να υπάρχουν μικρές αποκλίσεις στη διάμετρο λόγω συσσωμάτωσης. Όσον αφορά το ζ-δυναμικό, η τιμή -20 mV υποδεικνύει μέτρια σταθερότητα στο διάλυμα λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που εμποδίζουν την ανεπιθύμητη συσσώρευση.

Με την προσθήκη του κελύφους-επικάλυψης πυριτίας, το οποίο δημιουργεί ένα λεπτό αλλά ομοιογενές στρώμα γύρω από τον πυρήνα, η μέση υδροδυναμική διάμετρος αναμένεται να αυξηθεί. Η ομοιογενής επίστρωση με πυριτία συμβάλλει στη βελτίωση της σταθερότητας των νανοσωματιδίων σε υδατικά μέσα, μειώνοντας την τάση τους για συσσωμάτωση μέσω μαγνητικών αλληλεπιδράσεων. Η επιπλέον επιφανειακή τροποποίηση με υαλουρονικό οξύ αναμένεται να αυξήσει περαιτέρω την υδροδυναμική διάμετρο, οδηγώντας σε υψηλότερες τιμές, ανάλογα με το μοριακό βάρος και τη συγκέντρωση του HA. Το υαλουρονικό οξύ δημιουργεί μια υδρόφιλη στοιβάδα που επηρεάζει τον υδροδυναμικό όγκο των νανοσωματιδίων, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αποτροπή της συσσωμάτωσης μέσω ηλεκτροστατικών και στερεοχημικών απωθήσεων.

4.2 Βελτιστοποίηση μεθόδου απομόνωσης GCs

Για την ακριβή αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της μεθόδου απομόνωσης των κοκκωδών κυττάρων (GCs), πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από πειράματα, τα οποία επικεντρώθηκαν στην αναγνώριση των βέλτιστων συνθηκών φυγοκέντρωσης, της έκπλυσης των κυττάρων, της ανάμειξης με τα νανοϋλικά και της αποδέσμευσης των κυττάρων. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν ποσοτικά, χρησιμοποιώντας στατιστική ανάλυση για να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και η εκλεκτικότητα της μεθόδου.

4.2.1 Βελτιστοποίηση φυγοκέντρωσης και εκπλύσεων

Η διαδικασία φυγοκέντρωσης και εκπλύσεων χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των κυττάρων που παρέμειναν ζωντανά και στη συνέχεια θα μπορούσαν να απομονωθούν μέσω εκλεκτικής δέσμευσης με τα νανοϋλικά. Ο σκοπός της βελτιστοποίησης αυτής της φάσης ήταν να εξασφαλιστεί η μέγιστη αποδοτικότητα στην απομόνωση των κυττάρων, διατηρώντας ταυτόχρονα την ακεραιότητα των ζωντανών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, επιλέχθηκαν διαφορετικές συνθήκες φυγοκέντρωσης και εκπλύσεων για την απομόνωση των κυττάρων. Η φυγοκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό όλων των κυττάρων από το υπερκείμενο, με σκοπό την απομόνωση των ζωντανών κυττάρων. Η έκπλυση είχε ως στόχο την αφαίρεση των ενώσεων από το ωοθυλακικό υγρό και των μη ζωντανών κυττάρων που δεν ήταν σε θέση να προσδεθούν στα νανοϋλικά.

Οι συνθήκες φυγοκέντρωσης επικεντρώθηκαν σε διαφορετικούς συνδυασμούς ταχύτητας και διάρκειας, ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη για την αποτελεσματική διαχωριστική διαδικασία.

Φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 10 και 15 λεπτά:

Αυτή η συνθήκη είχε ως στόχο την ανάλυση της αποτελεσματικότητας σε χαμηλότερες ταχύτητες και μεγαλύτερες διάρκειες. Η φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 10 λεπτά είχε ποσοστό απομόνωσης 91% στο ίζημα, ενώ στα 15 λεπτά το ποσοστό απομόνωσης κυττάρων αυξήθηκε στο 93%. Ωστόσο, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων ($p < 0.05$), επομένως δεν επιλέχθηκαν ως βέλτιστες συνθήκες.

Φυγοκέντρωση στις 3500 rpm για 5 λεπτά:

Αυτή η συνθήκη θεωρήθηκε η βέλτιστη για την καταβύθιση όλων των τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κοκκωδών κυττάρων. Η διάρκεια των 5 λεπτών εξασφαλίζει την αποτελεσματική διαχωριστική διαδικασία χωρίς την καταστροφή των κυττάρων. Προέκυψε ότι το 98,5% των κυττάρων παρέμειναν στο ίζημα, με μόλις 1,5% των κυττάρων να παραμένουν στο υπερκείμενο. Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) συγκριτικά με άλλες συνθήκες φυγοκέντρωσης.

Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 λεπτά:

Αυτή η συνθήκη σχεδιάστηκε για να ελέγξει την αποτελεσματικότητα σε υψηλότερες ταχύτητες φυγοκέντρωσης. Ο διαχωρισμός κυττάρων ήταν σχετικά καλός, με ποσοστό απομόνωσης 95% στο ίζημα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που δεν ήταν πλήρως βιώσιμα, φτάνοντας το 5%. Η αυξημένη ταχύτητα φυγοκέντρωσης είχε ως αποτέλεσμα την ενδεχόμενη υποβάθμιση των κυττάρων λόγω του υπερβολικού μηχανικού φορτίου.

Η επόμενη φάση αφορούσε την εκπλύση των κυττάρων για να αφαιρεθούν οι ενώσεις από το δείγμα και τα υπολείμματα που ενδεχομένως είχαν παραμείνει από το διάλυμα φυγοκέντρωσης ή από τα προηγούμενα στάδια συλλογής. Η έκπλυση πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), ώστε να αφαιρεθούν οι ενώσεις με σκοπό να μην επηρεαστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Το κυτταρικό ίζημα ανασυντέθηκε με 5 mL PBS και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο φορές για την εξασφάλιση της μέγιστης καθαρότητας των κυττάρων. Με την πρώτη έκπλυση, 88% των κυττάρων παρέμειναν στο ίζημα και αναλύθηκαν για την ποιότητα του κυτταρικού πληθυσμού. Μετά τη δεύτερη έκπλυση, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων αυξήθηκε στο 92% με τις υπόλοιπες ποσότητες να είναι απαλλαγμένες από ρύπους. Οι συγκρίσεις μεταξύ των πρώτων και δεύτερων εκπλύσεων δείχνουν ότι το ποσοστό καθαρότητας και ζωντανών κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένο ($p < 0.05$) με τη δεύτερη έκπλυση, κάτι που υποδηλώνει την αναγκαιότητα της δεύτερης διαδικασίας εκπλύσεων για τη βελτίωση της καθαρότητας.

Συνεπώς, Οι βέλτιστες συνθήκες φυγοκέντρωσης επιλέχθηκαν με ταχύτητα 3500 rpm για 5 λεπτά, δεδομένου ότι αυτή η συνθήκη παρέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων στο ίζημα χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητά τους. Η συνθήκη αυτή ήταν στατιστικά σημαντικά καλύτερη σε σύγκριση με τις άλλες ταχύτητες και διάρκειες ($p < 0.05$). Η εκπλύση δύο φορές με PBS ήταν επίσης η καλύτερη στρατηγική, καθώς εξασφάλισε την απαραίτητη καθαρότητα και τη μέγιστη ζωντανότητα των κυττάρων, χωρίς να επηρεάζει αρνητικά την ικανότητά τους να δεσμεύονται με τα νανοϋλικά. Αυτές οι συνθήκες φυγοκέντρωσης και εκπλύσεων παρέχουν το καλύτερο αποτέλεσμα για τη συλλογή των κοκκωδών κυττάρων που παραμένουν ζωντανά και έτοιμα για τη διαδικασία εκλεκτικής δέσμευσης με τα νανοϋλικά. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει υψηλή αποδοτικότητα στην απομόνωση των κυττάρων και ελαχιστοποιεί την απώλεια βιωσιμότητας, ενώ παράλληλα διασφαλίζει την υψηλή καθαρότητα του κυτταρικού πληθυσμού.

4.2.2 Βελτιστοποίηση μοριακού βάρους HA

Η επιτυχής απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων GCs από το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί μια κρίσιμη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η χρήση νανοϋλικών και η λειτουργικοποίησή τους με βιολογικά μόρια. Το μοριακό βάρος (MW) του HA είναι ένας από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας. Η επίδραση του MW του HA στην απομόνωση των GCs εξετάστηκε με στόχο να βρεθεί το πιο κατάλληλο μοριακό βάρος που να συνδυάζει την αποτελεσματικότητα στην απομόνωση με την ευκολία αποδέσμευσης των κυττάρων από τα νανοϋλικά [151].

Η βιβλιογραφία έχει καταδείξει τη σημασία του MW του HA για τις βιολογικές του λειτουργίες, καθώς επηρεάζει τη δέσμευση των κυττάρων, ειδικότερα μέσω του υποδοχέα CD44 [154–157]. Η αυξημένη αλληλεπίδραση του HA με τον CD44, ειδικά όταν το MW είναι υψηλό, μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία συστάδων κυττάρων και νανοϋλικών, κάτι που ενδέχεται να εμποδίσει την εύκολη αποδέσμευση των κυττάρων. Ωστόσο, το HA με μικρότερο MW θεωρείται ότι διαθέτει λιγότερους δεσμούς με τον CD44, μειώνοντας έτσι τη δημιουργία συστάδων και διευκολύνοντας την αποδέσμευση

των κυττάρων [158]. Για να εξεταστεί η επιρροή του MW του HA στην απομόνωση των GCs, συντέθηκαν μαγνητικά σωματίδια επιφανειακώς λειτουργικοποιημένα με HA με τρία διαφορετικά MW: 3,000-5,000, 30,000-50,000 και 50,000-100,000. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης των GCs από το ωοθυλακικό υγρό και η ποιότητα της αποδέσμευσης των κυττάρων από τα νανοϋλικά.

Η απομόνωση των GCs έγινε με τη χρήση νανοϋλικών που είχαν τροποποιηθεί με HA διαφορετικών MW και πραγματοποιήθηκε πλήρης αξιολόγηση της αποδοτικότητας αυτής της διαδικασίας. Οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι, σε ό,τι αφορά το ποσοστό ανάκτησης των GCs, δεν υπήρξε καμία διαφορά ανάμεσα στις διαφορετικές παραλλαγές του HA. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανάκτησης των GCs ήταν 100% σε όλες τις περιπτώσεις ανεξαρτήτως του MW του HA. Αυτό υποδηλώνει ότι, σε ποσοτικό επίπεδο, το MW του HA δεν είχε άμεση επίδραση στην αποδοτικότητα της απομόνωσης των κυττάρων. Όλα τα υλικά κατάφεραν να απομονώσουν πλήρως τα GCs από το ωοθυλακικό υγρό, γεγονός που επιβεβαιώνει τη γενική αποτελεσματικότητα της μεθόδου ανεξαρτήτως του MW του HA.

Ωστόσο, το πιο ενδιαφέρον εύρημα προέκυψε από την ποιοτική αξιολόγηση των κυττάρων και των νανοϋλικών μετά την απομόνωση. Στην περίπτωση των νανοϋλικών που είχαν λειτουργικοποιηθεί με HA υψηλότερου MW (30,000-50,000 και 50,000-100,000), παρατηρήθηκε σχηματισμός μεγάλων συστάδων, δηλαδή, συστάδες από κύτταρα και μαγνητικά σωματίδια. Ο σχηματισμός αυτών των συστάδων είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αριθμητικής διαθεσιμότητας των σημείων πρόσδεσης στον CD44, λόγω της επαναλαμβανόμενης δομής του HA υψηλού MW [28]. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη συγκόλληση περισσότερων από ενός κυττάρων σε ένα μαγνητικό σωματίδιο και, αντιστρόφως, περισσότερα μαγνητικά σωματίδια να συνδέονται με ένα μόνο κύτταρο, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία συστάδων.

Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε HA μικρού MW (3,000-5,000), δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός συστάδων. Το μικρότερο MW του HA περιέχει λιγότερους δεσμούς που αλληλεπιδρούν με τον CD44, γεγονός που εμποδίζει τον σχηματισμό μεγάλων συστάδων και διευκολύνει την αποδέσμευση των GCs. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την

παρατήρηση ότι οι GCs που απομονώθηκαν με HA μικρού MW ήταν πιο εύκολο να αποδεσμευτούν από τα νανοϋλικά, γεγονός που τους επιτρέπει να παραμείνουν ενεργά και λειτουργικά για περαιτέρω βιολογικές εφαρμογές.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το ποσοστό ανάκτησης των GCs μεταξύ των διαφορετικών MW του HA ($p = 0.79$). Ωστόσο, η ανάλυση των σχηματισμένων συστάδων κυττάρων και σωματιδίων εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των παραλλαγών του HA. Η χρήση HA υψηλού MW (30,000-50,000 και 50,000-100,000) οδήγησε σε σχηματισμό μεγάλων συστάδων, ενώ το HA μικρού MW (3,000-5,000) δεν παρουσίασε τέτοιες συστάδες.

Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι, αν και το MW του HA δεν επηρεάζει το ποσοστό ανάκτησης των GCs, επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα της απομόνωσης και την αποδέσμευση των κυττάρων από τα νανοϋλικά. Το HA μικρού MW παρέχει την καλύτερη απόδοση λόγω της απουσίας σχηματισμού συστάδων, επιτρέποντας την ευκολότερη αποδέσμευση των GCs και την αποφυγή της υπερβολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων και νανοϋλικών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για εφαρμογές που απαιτούν την απομόνωση και χρήση των κυττάρων χωρίς να επηρεάζονται οι βιολογικές τους λειτουργίες.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι το μικρότερο MW του HA είναι το καταλληλότερο για την απομόνωση κυττάρων από βιολογικά υγρά [157]. Η υψηλότερη συγκολλητικότητα που επιτυγχάνεται με HA υψηλότερου MW μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των κυττάρων που απομονώνονται, καθιστώντας τη διαδικασία πιο δύσκολη και λιγότερο αποδοτική για περαιτέρω βιολογικές χρήσεις.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι το MW του HA είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την απομόνωση των GCs. Ενώ το MW δεν επηρεάζει την ποσοτική απομόνωση των κυττάρων, το μικρότερο MW του HA (3,000-5,000) είναι το πιο κατάλληλο για την αποδέσμευση των κυττάρων χωρίς να σχηματίζονται συστάδες, διευκολύνοντας έτσι την απομόνωση και τη χρήση των GCs σε βιολογικές εφαρμογές.

4.2.3 Βελτιστοποίηση ποσότητας νανοϋλικών

Η ποσότητα των νανουλικών που προστίθεται στη διαδικασία απομόνωσης των κοκκωδών κυττάρων αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, καθώς και τη βιολογική ακεραιότητα των απομονωθέντων κυττάρων. Ο σκοπός αυτού του βήματος ήταν να προσδιοριστεί η ιδανική ποσότητα νανουλικών ανά 100,000 κύτταρα, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη απομόνωση χωρίς να επηρεαστεί η μορφολογία ή η λειτουργικότητα των κυττάρων. Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές ποσότητες νανουλικών: 1, 3, 5 και 10 mg ανά 100,000 GCs, με στόχο να αξιολογηθούν οι επιδράσεις τους στην απομόνωση και την ποιότητα των κυττάρων.

Η διαδικασία απομόνωσης περιλάμβανε τη χρήση μαγνητικών νανοϋλικών, τα οποία είχαν λειτουργικοποιηθεί με κατάλληλα βιολογικά μόρια για την πρόσδεση στους GCs. Προτού ξεκινήσει η απομόνωση, οι GCs από κάθε ωοθυλάκιο καταμετρήθηκαν ξεχωριστά για δύο βασικούς λόγους: (i) για να βελτιστοποιηθεί η αναλογία νανουλικών προς κύτταρα και (ii) για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της αναπτυγμένης μεθόδου απομόνωσης. Για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος με την κάμερα Neubauer, η οποία είναι ευρέως αποδεκτή για την ακρίβεια και την αξιοπιστία της [29], και επιτρέπει την καταμέτρηση τόσο των ελεύθερων κυττάρων όσο και αυτών που έχουν συσσωρευτεί σε συστάδες.

Αρχικά, η δοκιμή με 10 mg νανουλικών ανά 100,000 GCs οδήγησε στη δημιουργία συστάδων κυττάρων και νανοϋλικών. Η αιτία αυτής της συσσώρευσης ήταν πιθανότατα η κακή διασπορά των νανοϋλικών στον διαλύτη, κάτι που οδήγησε σε υψηλή συγκέντρωση σωματιδίων και περιορισμένη αλληλεπίδραση με τα κύτταρα. Ακολούθως, η μορφολογία των κυττάρων, μερικές ώρες μετά την εφαρμογή της διαδικασίας απομόνωσης, δεν έμοιαζε με αυτή των ελεγχόμενων κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ποσότητα των 10 mg ήταν ακατάλληλη για τη διαδικασία αυτή. Συνεπώς, το 10 mg νανοϋλικών δεν παρείχε τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς το αποτέλεσμα της απομόνωσης δεν ήταν συμβατό με την απαιτούμενη ποιότητα των κυττάρων.

Στην αντίθετη πλευρά, όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο 1 mg νανουλικών ανά 100,000 GCs, παρατηρήθηκε ότι η απομόνωση των GCs ήταν ανεπαρκής. Ορισμένα από τα GCs χάθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, με αποτέλεσμα να καταγράφεται 5-10% απώλεια των GCs. Αυτό υποδεικνύει ότι η ποσότητα των 1 mg ήταν πολύ χαμηλή για να επιτευχθεί πλήρης απομόνωση των κυττάρων, οδηγώντας σε απώλεια σημαντικού ποσοστού των κυττάρων κατά την απομόνωση.

Οι βέλτιστες ποσότητες νανουλικών βρέθηκαν να είναι 3 mg και 5 mg ανά 100,000 GCs. Και οι δύο ποσότητες προσέφεραν 100% ανάκτηση GCs, χωρίς να παρατηρηθεί απώλεια κυττάρων. Επιπλέον, η μορφολογία των απομονωθέντων κυττάρων ήταν συγκρίσιμη με αυτή των ελεγχόμενων κυττάρων, γεγονός που δείχνει ότι η ποιότητα των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από την ποσότητα των νανουλικών. Η ικανότητα να απομονωθούν πλήρως τα GCs, χωρίς σχηματισμό συστάδων ή βλάβες στα κύτταρα, υποδεικνύει ότι οι ποσότητες των 3 mg και 5 mg είναι οι καταλληλότερες για αυτή τη διαδικασία.

Για να ελαχιστοποιηθεί το κόστος της μεθόδου, επιλέχθηκε η ποσότητα των 3 mg νανουλικών ανά 100,000 GCs ως η πιο οικονομική και αποτελεσματική. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με 3 mg νανουλικών σε δείγματα από γυναίκες επιβεβαίωσαν ότι αυτή η ποσότητα ήταν επαρκής για την πλήρη απομόνωση των GCs σε όλες τις περιπτώσεις. Ούτως ή άλλως, η ποσότητα των 3 mg παρέχει επαρκή ποσότητα νανουλικών για την απομόνωση των κυττάρων χωρίς τη δημιουργία συστάδων και χωρίς να επηρεάζει τη μορφολογία των κυττάρων.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη ανάκτηση των GCs όταν συγκρίθηκαν οι διαφορετικές ποσότητες νανουλικών ($p < 0.05$). Η ποσότητα των 10 mg οδήγησε σε σχηματισμό συστάδων και κακή ποιότητα κυττάρων, ενώ οι ποσότητες των 1 mg και 3 mg είχαν σημαντική επίδραση στην απομόνωση, με τη 3 mg ποσότητα να παρέχει τα καλύτερα αποτελέσματα.

Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η ποσότητα των νανουλικών είναι ένα κρίσιμο παράμετρος στην απομόνωση των GCs. Ενώ η ποσότητα των 10 mg ήταν υπερβολική και οδήγησε σε ανεπιθύμητους σχηματισμούς συστάδων, η ποσότητα των

3 mg αποδείχθηκε ιδανική για την πλήρη απομόνωση των GCs, χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα των κυττάρων. Αυτή η ποσότητα είναι επίσης πιο οικονομική και κατάλληλη για εφαρμογές σε μεγαλύτερους πληθυσμούς κυττάρων, κάνοντάς την τη βέλτιστη επιλογή για την απομόνωση GCs σε κλινικές ή εργαστηριακές εφαρμογές.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν ότι η χρήση 3 mg νανουλικών ανά 100,000 GCs είναι η πιο αποτελεσματική και πρακτική ποσότητα για την απομόνωση των GCs, συνδυάζοντας υψηλή απόδοση και ποιότητα των κυττάρων με χαμηλότερο κόστος.

4.2.4 Βελτιστοποίηση χρόνου επώασης

Η βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την απομόνωση κοκκωδών κυττάρων (GCs), καθώς η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα νανοϋλικά κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να επηρεάσει την αποδοτικότητα της απομόνωσης και τη μορφολογία των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης: 5, 10, 15 και 20 λεπτά, προκειμένου να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος που εξασφαλίζει την υψηλότερη απόδοση απομόνωσης των GCs χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η ποιότητά τους.

Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη λειτουργικοποιημένων νανοϋλικών σε GCs, οι οποίοι καταμετρήθηκαν προηγουμένως μέσω της κλασικής μεθόδου της κάμερας Neubauer για την ακριβή εκτίμηση του αρχικού αριθμού των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα νανοϋλικά και τα κύτταρα επώαστηκαν για τους διαφορετικούς χρόνους και η αποδοτικότητα της διαδικασίας απομόνωσης αξιολογήθηκε.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή διαφοροποίηση στην απομόνωση των GCs αναλόγως του χρόνου επώασης, καθώς και στην ποιότητα των κυττάρων μετά την απομόνωση.

5 Λεπτά Επώασης: Κατά τη διάρκεια των 5 λεπτών επώασης, παρατηρήθηκε περιορισμένη απομόνωση των GCs, με σημαντική απώλεια κυττάρων που έφτανε το 15%. Η μορφολογία των κυττάρων παρουσίαζε ενδείξεις ανεπαρκούς πρόσδεσης στα νανοϋλικά, κάτι που οδήγησε σε μειωμένη απόδοση απομόνωσης. Η αλληλεπίδραση ήταν ανεπαρκής για να εξασφαλίσει πλήρη πρόσδεση των GCs στα νανοϋλικά, γεγονός

που υποδεικνύει ότι ο χρόνος των 5 λεπτών είναι ανεπαρκής για τη βέλτιστη απομόνωση των κυττάρων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα κυτταρικά δείγματα είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να σχηματίσουν αθροίσματα κυττάρων, κάτι που επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και την αξιοπιστία των απομονωθέντων κυττάρων.

10 Λεπτά Επώασης: Ο χρόνος των 10 λεπτών έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα από όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Με αυτό το χρόνο επώασης, παρατηρήθηκε 100% ανάκτηση GCs, χωρίς απώλεια κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης. Η μορφολογία των κυττάρων ήταν συγκρίσιμη με αυτή των ελεγχόμενων κυττάρων, χωρίς ενδείξεις κυτταρικού στρες ή παραμόρφωσης. Αυτό υποδεικνύει ότι ο χρόνος των 10 λεπτών είναι ο ιδανικός για να εξασφαλιστεί η μέγιστη απομόνωση χωρίς να προκαλείται καμία αρνητική επίδραση στη μορφολογία ή την επιβίωση των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση των GCs με τα νανοϋλικά ήταν επαρκής για να επιτευχθεί πλήρης απομόνωση χωρίς την εμφάνιση συστάδων ή αθροισμάτων κυττάρων.

15 Λεπτά Επώασης: Με τον χρόνο των 15 λεπτών, παρατηρήθηκε μια ελαφρά μείωση στην αποδοτικότητα της απομόνωσης, με περίπου 3-5% απώλεια GCs. Αν και τα περισσότερα κύτταρα απομονώθηκαν με επιτυχία, η μορφολογία των κυττάρων παρουσίαζε ενδείξεις στρες και ελαφρά αλλοίωση στη δομή τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αυξημένη διάρκεια επώασης προκαλεί υπερβολική έκθεση των κυττάρων στα νανοϋλικά. Η υπερβολική αλληλεπίδραση ενδέχεται να προκαλεί περιορισμούς στην κινητικότητα των κυττάρων ή να μειώνει τη δυνατότητά τους για αποδέσμευση από τα νανοϋλικά, κάτι που μπορεί να εμποδίζει τη χρήση τους σε μεταγενέστερες εφαρμογές.

20 Λεπτά Επώασης: Στον χρόνο των 20 λεπτών, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ποιότητα των κυττάρων που απομονώθηκαν, με περίπου 7-10% απώλεια GCs και ενδείξεις σοβαρού κυτταρικού στρες. Η μορφολογία των κυττάρων ήταν υπερβολικά παραμορφωμένη, με αρκετά κύτταρα να εμφανίζουν σημάδια κυτταρικής καταστροφής ή θανάτου. Οι νανοϋλικές συστάδες ήταν πιο έντονες, γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και την επακόλουθη χρησιμότητα των κυττάρων για περαιτέρω εφαρμογές.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαδικασία απομόνωσης ανάλογα με τον χρόνο επώασης ($p < 0.05$). Οι χρόνοι επώασης των 5, 15 και 20 λεπτών είχαν χαμηλότερη απόδοση σε σχέση με τα 10 λεπτά, τόσο όσον αφορά την απομόνωση όσο και τη μορφολογία των κυττάρων, υπογραμμίζοντας τη σημασία του χρόνου επώασης για τη διασφάλιση της ποιότητας των κυττάρων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, καθίσταται σαφές ότι ο χρόνος επώασης των 10 λεπτών ήταν ο βέλτιστος για την απομόνωση των GCs με την καλύτερη δυνατή αποδοτικότητα και ποιότητα. Ο χρόνος των 10 λεπτών εξασφαλίζει την επαρκή αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα νανοϋλικά, επιτρέποντας την πλήρη πρόσδεση χωρίς υπερβολική συγκέντρωση ή σχηματισμό συστάδων. Αντίθετα, οι συντομότεροι χρόνοι (5 λεπτά) δεν παρέχουν αρκετό χρόνο για αποτελεσματική πρόσδεση, με αποτέλεσμα τη μειωμένη απομόνωση, ενώ οι μεγαλύτεροι χρόνοι (15 και 20 λεπτά) προκαλούν υπερβολική αλληλεπίδραση που οδηγεί σε κυτταρικό στρες και υποβάθμιση της ποιότητας των κυττάρων. Συνεπώς, ο χρόνος των 10 λεπτών είναι ιδανικός για την επίτευξη της βέλτιστης ισορροπίας μεταξύ αποδοτικότητας απομόνωσης και διατήρησης της μορφολογίας και της επιβίωσης των GCs.

4.2.5 Βελτιστοποίηση έντασης μαγνητικού πεδίου

Η απομόνωση των νανοϋλικών-κυττάρων συζευγμάτων από το δείγμα μετά την αλληλεπίδραση μεταξύ των νανοϋλικών και των κοκκωδών κυττάρων (GCs) απαιτεί τη χρήση μαγνητικών πεδίων για την απομάκρυνση των νανοϋλικών από το υπόλοιπο δείγμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκαν δύο τύποι μαγνητών, ένας μαγνήτης νεοδυμίου (ισχύς έλξης 15 kg) και ένας τύπος φερρίτη (ισχύς έλξης 2,5 kg), προκειμένου να προσδιοριστεί η ιδανική ένταση του μαγνητικού πεδίου για τη βελτιστοποίηση της απομόνωσης, διατηρώντας παράλληλα την υψηλότερη δυνατή επιβίωση των κυττάρων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη χρήση του μαγνήτη νεοδυμίου. Με την εφαρμογή του ισχυρού μαγνητικού πεδίου του νεοδυμίου, η απομόνωση των νανοϋλικών-κυττάρων συζευγμάτων επιτεύχθηκε σε λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία ήταν εξαιρετικά γρήγορη και τα νανοϋλικά, μαζί με τα δεσμευμένα

κύτταρα, απομονώθηκαν αποτελεσματικά και συγκεντρώθηκαν στη βάση του δοχείου. Ωστόσο, η έντονη δύναμη του μαγνητικού πεδίου είχε ως αποτέλεσμα την υπερβολική συμπύκνωση των νανοϋλικών, οδηγώντας σε πυκνότερη συγκέντρωση των σωματιδίων και, συνεπώς, σε περίπου 10% απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων. Αυτό οφειλόταν στην αυξημένη πίεση που ασκούνταν στα κύτταρα λόγω της απότομης και ισχυρής επαγωγής του μαγνητικού πεδίου, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό στρες ή και θάνατο σε ορισμένες περιπτώσεις.

Αντίθετα, με τη χρήση του μαγνήτη φερρίτη, η απομόνωση των νανοϋλικών-κυττάρων συζευγμάτων επιτεύχθηκε με πιο αργό ρυθμό, περίπου 1 λεπτό μετά την τοποθέτηση του μαγνήτη κοντά στο δοχείο που περιείχε το δείγμα. Ωστόσο, αυτή η πιο αργή διαδικασία απομόνωσης επέτρεψε την πιο ομαλή και λιγότερο πυκνή συγκέντρωση των νανοϋλικών, μειώνοντας τον κίνδυνο για κυτταρικό στρες. Η διαδικασία αυτή διασφάλισε υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων, με τις τιμές βιωσιμότητας να παραμένουν υψηλές και κοντά στο 100%. Η λιγότερη πίεση και η πιο ήπια αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα νανοϋλικά φαίνεται να επιτρέπουν την καλύτερη επιβίωση των κυττάρων χωρίς να διακυβεύεται η αποδοτικότητα της απομόνωσης.

Από τα αποτελέσματα καθίσταται σαφές ότι η ένταση του μαγνητικού πεδίου έχει σημαντικό αντίκτυπο στην απομόνωση των νανοϋλικών-κυττάρων συζευγμάτων και στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η ισχυρή μαγνητική ένταση του νεοδυμίου επιτρέπει γρήγορη απομόνωση των νανοϋλικών, ωστόσο, η υπερβολική συμπύκνωση των νανοϋλικών μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό στρες, κάτι που μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η υψηλή πυκνότητα των νανοϋλικών σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται να εμποδίζει την ελευθερία των κυττάρων να αποδεσμευτούν από τα νανοϋλικά, οδηγώντας σε μια αύξηση της κυτταρικής πίεσης και, κατά συνέπεια, σε μείωση της επιβίωσης των κυττάρων.

Αντίθετα, η χρήση του φερρίτη, με χαμηλότερη μαγνητική ένταση, επιτρέπει τη συγκέντρωση των νανοϋλικών σε λιγότερο πυκνές συστάδες και παρέχει στους κυττάρους περισσότερο χρόνο για να αλληλεπιδράσουν με τα νανοϋλικά χωρίς να υποστούν υπερβολικό στρες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με την απομόνωση να επιτυγχάνεται σε λίγο πιο αργό ρυθμό, αλλά χωρίς αρνητικές συνέπειες για την ποιότητα των κυττάρων.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων επιβεβαίωσε την ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στην επιβίωση των κυττάρων μεταξύ των δύο τύπων μαγνητών, με την χρήση του φερρίτη να εξασφαλίζει υψηλότερη βιωσιμότητα ($p < 0.05$). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι, για την απομόνωση νανοϋλικών-κυττάρων με την καλύτερη δυνατή ποιότητα, ο φερρίτης είναι η καταλληλότερη επιλογή, καθώς επιτρέπει τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων ενώ εξασφαλίζει επίσης ικανοποιητική αποδοτικότητα στην απομόνωση.

Η χρήση φερρίτη ως πηγή του μαγνητικού πεδίου κατά τη διάρκεια της απομόνωσης νανοϋλικών-κυττάρων συζευγμάτων φαίνεται να είναι η βέλτιστη επιλογή, καθώς επιτρέπει την απομόνωση με ελάχιστη ζημιά στα κύτταρα και υψηλή βιωσιμότητα. Αντίθετα, ο μαγνήτης νεοδυμίου, αν και εξαιρετικά ισχυρός και γρήγορος, προκαλεί σημαντική μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων λόγω της υπερβολικής συγκέντρωσης των νανοϋλικών, κάτι που πρέπει να αποφεύγεται σε εφαρμογές που απαιτούν την ακεραιότητα των κυττάρων.

4.2.6 Βελτιστοποίηση ποσότητας και χρόνου επώασης με υαλουρονιδάση

Η διαδικασία της αποδέσμευσης των κυττάρων από τα νανοϋλικά είναι κρίσιμη για την απομόνωση και την επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων σε βιολογικές εφαρμογές. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν δύο βασικοί παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της αποδέσμευσης των κυττάρων από τα νανοϋλικά, δηλαδή η ποσότητα υαλουρονιδάσης και ο χρόνος επώασης. Η υαλουρονιδάση χρησιμοποιείται για να διασπάσει τη γλυκοζαμινογλυκάνη (HA) που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, διευκολύνοντας έτσι την αποδέσμευσή τους από τα νανοϋλικά. Τα πειράματα επικεντρώθηκαν στη βελτιστοποίηση αυτών των παραμέτρων, με στόχο την επίτευξη μέγιστης αποδέσμευσης των κυττάρων χωρίς να μειωθεί η βιωσιμότητά τους.

Βελτιστοποίηση της Ποσότητας Υαλουρονιδάσης

Αρχικά, εξετάστηκαν διάφορες ποσότητες υαλουρονιδάσης, που κυμαίνονταν από 10 IU έως 100 IU, για να προσδιοριστεί η βέλτιστη ποσότητα για την αποδέσμευση των κυττάρων. Η ποσότητα των 50 IU υαλουρονιδάσης αποδείχθηκε η πιο αποτελεσματική για την αποδέσμευση των κυττάρων, παρέχοντας την καλύτερη ισορροπία μεταξύ αποτελεσματικότητας αποδέσμευσης και κυτταρικής βιωσιμότητας. Στην περίπτωση

των 50 IU, η αποδέσμευση των κυττάρων ολοκληρώθηκε αποτελεσματικά χωρίς να παρατηρήθηκαν σημαντικές απώλειες βιωσιμότητας, με ποσοστό βιωσιμότητας να παραμένει υψηλό (~95%).

Όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες ποσότητες υαλουρονιδάσης (10 IU και 25 IU), η αποδέσμευση ήταν μεν λιγότερο αποτελεσματική, μερικές φορές οδηγώντας σε μερική ή ανεπαρκή αποδέσμευση των κυττάρων, ειδικά όταν οι συγκεντρώσεις των νανοϋλικών ήταν υψηλές. Αντιθέτως, η αύξηση της ποσότητας υαλουρονιδάσης πέραν των 50 IU (π.χ., 75 IU ή 100 IU) δεν παρείχε σημαντική βελτίωση στην αποδέσμευση, ενώ είχε αρνητικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων, προκαλώντας υψηλότερη θνησιμότητα των κυττάρων (με ποσοστά που έφταναν το 20-25%). Η υπερβολική ποσότητα υαλουρονιδάσης μπορεί να προκαλέσει υπερβολική διάσπαση των κυτταρικών δομών, με αποτέλεσμα τη μειωμένη επιβίωση των κυττάρων.

Βελτιστοποίηση του Χρόνου Επώασης

Η επώαση των κυττάρων με υαλουρονιδάση για χρονικές περιόδους 5, 10, 15 και 20 λεπτών εκτιμήθηκε επίσης ως σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αποδέσμευσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ο βέλτιστος χρόνος επώασης για τη μέγιστη αποδέσμευση των κυττάρων ήταν τα 10 λεπτά. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε πλήρης αποδέσμευση των κυττάρων χωρίς να παρατηρηθούν μεγάλες απώλειες στη βιωσιμότητα (περίπου 95%).

Σε μικρότερους χρόνους επώασης (5 λεπτά), η αποδέσμευση ήταν λιγότερο αποτελεσματική, με ποσοστό αποδέσμευσης να κυμαίνεται γύρω στο 70-80%. Αντιθέτως, όταν ο χρόνος επώασης αυξήθηκε στα 15 και 20 λεπτά, παρατηρήθηκε μια ελαφρά βελτίωση στην αποδέσμευση, ωστόσο, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά. Η επιπλέον επώαση φαίνεται να προκαλεί υπερβολική διάσπαση των κυττάρων, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της κυτταρικής δομής και την αυξημένη κυτταρική θνησιμότητα. Συγκεκριμένα, σε χρόνους επώασης 15 και 20 λεπτών, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε σε ποσοστά γύρω από 85% και 80% αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ποσότητα της υαλουρονιδάσης και ο χρόνος επώασης είναι κρίσιμοι παράγοντες για την αποδέσμευση των κυττάρων, με τη βέλτιστη

ποσότητα να είναι 50 IU και τον βέλτιστο χρόνο επώασης τα 10 λεπτά. Η ποσότητα των 50 IU υαλουρονιδάσης παρέχει επαρκή διάσπαση της HA χωρίς να προκαλεί υπερβολική βλάβη στα κύτταρα. Η χρήση μικρότερων ποσοτήτων υαλουρονιδάσης δεν προσφέρει επαρκή αποδέσμευση, ενώ η χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων οδηγεί σε αυξημένη θνησιμότητα λόγω της υπερβολικής διάσπασης των κυτταρικών δομών.

Ο χρόνος επώασης των 10 λεπτών φαίνεται να είναι ο ιδανικός, καθώς διασφαλίζει την πλήρη αποδέσμευση των κυττάρων χωρίς να προκαλεί υπερβολικό κυτταρικό στρες ή βλάβες. Σε αντίθεση, οι μικρότεροι χρόνοι επώασης (5 λεπτά) δεν προσφέρουν την απαραίτητη αποδέσμευση, ενώ οι μεγαλύτεροι χρόνοι (15 και 20 λεπτά) αυξάνουν την πιθανότητα κυτταρικής θνησιμότητας λόγω υπερβολικής έκθεσης στη δράση της υαλουρονιδάσης.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υποδεικνύει σημαντική βελτίωση στην αποδέσμευση των κυττάρων με τη χρήση 50 IU υαλουρονιδάσης και 10 λεπτών επώασης, με τα ποσοστά αποδέσμευσης να φτάνουν το 95% και τη βιωσιμότητα να παραμένει υψηλή (~95%) ($p < 0.05$).

Η βελτιστοποίηση της ποσότητας υαλουρονιδάσης και του χρόνου επώασης για την αποδέσμευση των κυττάρων δείχνει ότι η χρήση 50 IU υαλουρονιδάσης και 10 λεπτών επώασης είναι η βέλτιστη συνθήκη για την αποτελεσματική αποδέσμευση των κυττάρων με υψηλή βιωσιμότητα. Η προσέγγιση αυτή εξασφαλίζει τη μέγιστη αποδοτικότητα της διαδικασίας αποδέσμευσης, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιεί τις αρνητικές επιπτώσεις στην επιβίωση των κυττάρων, καθιστώντας την ιδανική για εφαρμογές που απαιτούν την ακεραιότητα των κυττάρων.

4.3 Μελέτη Εκλεκτικής δέσμευσης κυττάρων

Η εκλεκτική απομόνωση των granulosa cells (GCs) από το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί κρίσιμο βήμα στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη θυλακιογένεση, την ωοθυλακιόρρηξη και τη γυναικεία γονιμότητα γενικότερα. Τα GCs συνιστούν έναν ιδιαίτερο κυτταρικό πληθυσμό που παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, καθώς και στη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος που απαιτείται

για την ανάπτυξή τους. Ωστόσο, η παρουσία άλλων κυτταρικών τύπων στο ωοθυλακικό υγρό, όπως επιθηλιακά κύτταρα, αιμοποιητικά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα και την αξιοπιστία των πειραματικών δεδομένων, καθιστώντας απαραίτητη τη χρήση στρατηγικών επιλεκτικού διαχωρισμού.

Τα GCs παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη ρύθμιση του ορμονικού περιβάλλοντος των ωοθυλακίων, καθώς είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και έκκριση στεροειδών ορμονών, όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Η ενδοκρινική λειτουργία τους ρυθμίζει την επικοινωνία μεταξύ του ωαρίου και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, συμβάλλοντας καθοριστικά στην ωρίμανσή του. Επιπλέον, τα GCs εμπλέκονται σε κρίσιμες διαδικασίες, όπως η παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, οι οποίες προάγουν τη θυλακική ανάπτυξη και υποστηρίζουν τη φυσιολογική εξέλιξη του ωοθυλακίου.

Η λεπτομερής ανάλυση των GCs επιτρέπει την εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων σχετικά με τη γονιμότητα της γυναίκας, καθώς μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, την πρωτεϊνική σύνθεση και τη μεταβολική δραστηριότητά τους μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτες της ποιότητας των ωαρίων. Για τον λόγο αυτό, η απομόνωση ενός καθαρού και ομοιογενούς πληθυσμού GCs είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή αξιόπιστων βιολογικών και μοριακών αναλύσεων.

Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει διάφορους κυτταρικούς τύπους πέραν των GCs, οι οποίοι ενδέχεται να επηρεάσουν την ακρίβεια των πειραματικών δεδομένων. Συγκεκριμένα, μεταξύ των κυττάρων που ανευρίσκονται στο υγρό αυτό περιλαμβάνονται:

- **Επιθηλιακά κύτταρα** από το περίβλημα του ωοθυλακίου, τα οποία μπορεί να εισέρχονται στο υγρό λόγω της ρήξης του θυλακικού τοιχώματος κατά την ωοθυλακιορρηξία.
- **Αιμοποιητικά κύτταρα**, όπως μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, που μπορεί να βρίσκονται στο υγρό ως αποτέλεσμα φλεγμονωδών ή ανοσολογικών αντιδράσεων.
- **Ινοβλάστες και μεσεγχυματικά κύτταρα**, τα οποία προέρχονται από τον στρωματικό ιστό της ωοθήκης και μπορεί να συνεισφέρουν στην κυτταρική ετερογένεια του δείγματος.

Η παρουσία αυτών των κυττάρων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη μοριακή ανάλυση των GCs, καθώς η συνύπαρξή τους μπορεί να προκαλέσει επιμολύνσεις στο γονιδιακό ή πρωτεϊνικό προφίλ, να αλλοιώσει τα μεταβολικά δεδομένα και να οδηγήσει σε ανακριβείς επιστημονικές ερμηνείες.

Η εκλεκτική απομόνωση των GCs από το ωοθυλακικό υγρό εξασφαλίζει την καθαρότητα του δείγματος και την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα πλεονεκτήματα της στοχευμένης απομόνωσης περιλαμβάνουν:

- **Ακριβέστερη Μοριακή Ανάλυση:** Η απομόνωση ενός ομοιογενούς πληθυσμού GCs μειώνει τις παρεμβολές από άλλα κύτταρα, επιτρέποντας πιο αξιόπιστες γονιδιακές, πρωτεϊνικές και μεταβολικές αναλύσεις.
- **Βιολογική Συσχέτιση με την Ποιότητα των Ωαρίων:** Οι μεταβολές στα GCs αντανακλούν άμεσα την κατάσταση του ωαρίου, παρέχοντας σημαντικές ενδείξεις για τη γονιμότητα και την πιθανότητα επιτυχούς εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.
- **Ανάπτυξη Νέων Διαγνωστικών και Θεραπευτικών Εφαρμογών:** Η ανάλυση καθαρών GCs μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την εκτίμηση της ωοθηκικής λειτουργίας και στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών για γυναίκες με διαταραχές γονιμότητας.

Η επιλεκτική απομόνωση των granulosa cells από το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί ουσιώδη προϋπόθεση για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών της ωοθυλακιορρηξίας και της γυναικείας γονιμότητας. Η αποφυγή της συνύπαρξης ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών διασφαλίζει ότι οι παρατηρούμενες μοριακές αλλαγές αφορούν αποκλειστικά τα GCs και δεν προέρχονται από άλλους κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι ενδέχεται να αλλοιώνουν τα δεδομένα.

Η συνεχής εξέλιξη των μεθόδων εκλεκτικού διαχωρισμού, όπως η χρήση νανοϋλικών με επιφανειακές τροποποιήσεις που στοχεύουν συγκεκριμένους βιοδείκτες (π.χ. CD44), συμβάλλει στην ανάπτυξη ταχύτερων και αποδοτικότερων πρωτοκόλλων απομόνωσης. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν όχι μόνο την αύξηση της καθαρότητας των δειγμάτων αλλά

και την ταχεία και αποδοτική ανάκτηση των GCs, ενισχύοντας έτσι την εφαρμογή τους τόσο σε βασική έρευνα όσο και σε κλινικές διαγνωστικές εφαρμογές. Συμπερασματικά, η απομόνωση των GCs με υψηλή εκλεκτικότητα αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για τη βελτιστοποίηση της αναπαραγωγικής έρευνας και την ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων στη θεραπεία γυναικών με προβλήματα γονιμότητας.

Η αλληλεπίδραση του CD44 με το υαλουρονικό οξύ (HA) αποτελεί βασικό μηχανισμό στην κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση και τη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των ιστών. Στην περίπτωση των GCs, αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να αξιοποιηθεί για την εκλεκτική απομόνωσή τους από το ωοθυλακικό υγρό, επιτρέποντας την καθαρή και ταχεία συλλογή τους για πειραματικούς και κλινικούς σκοπούς.

Το CD44 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των μορίων προσκόλλησης. Εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των επιθηλιακών και ανοσολογικών κυττάρων, καθώς και σε καρκινικά κύτταρα, όπου παίζει ρόλο στη μεταστατική ικανότητα [159,160].

Η κύρια λειτουργία του CD44 είναι η δέσμευση του υαλουρονικού οξέος, αλλά επίσης αλληλεπιδρά με άλλα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη και μεταλλοπρωτεΐνάσες. Επιπλέον, το CD44 συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης, της σηματοδότησης και της απόκρισης σε φλεγμονώδη ερεθίσματα.

Η γλυκοπρωτεΐνη CD44 αποτελείται από:

- Μία εξωκυττάρια περιοχή που περιλαμβάνει το σημείο δέσμευσης για το υαλουρονικό οξύ.
- Μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή που εξασφαλίζει τη σταθερή ενσωμάτωσή της στην κυτταρική μεμβράνη.
- Ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, το οποίο εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το Rho/Rac και το ERK/MAPK, που ελέγχουν την κυτταρική κινητικότητα και πολλαπλασιασμό.

Τα GCs εκφράζουν το CD44, ιδιαίτερα μετά τη δράση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και καθώς προσεγγίζουν το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας. Το CD44 εμπλέκεται στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του ωοθυλακίου, καθώς και στη ρύθμιση της διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ των GCs και του ωοκυττάρου.

Το HA είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Αποτελεί βασικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ρυθμίζει τη διακυτταρική επικοινωνία, την κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση.

Ιδιότητες του Υαλουρονικού Οξέος

1. Ικανότητα δέσμευσης νερού: Το HA έχει έντονη υδρόφιλη φύση και συμβάλλει στη διατήρηση της ενυδάτωσης και της ιξωδοελαστικότητας των ιστών.
2. Αλληλεπίδραση με μόρια της εξωκυττάριας ουσίας: Το HA συνδέεται με πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνο και ιντεγκρίνες, επηρεάζοντας τη δομή και τη λειτουργία των ιστών.
3. Δέσμευση με CD44: Ο βασικός υποδοχέας του HA στα κύτταρα είναι το CD44, γεγονός που επιτρέπει τη στοχευμένη πρόσδεση κυττάρων με υψηλή έκφραση του υποδοχέα αυτού.

Η εκλεκτική απομόνωση των GCs από το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί μία μεγάλη πρόκληση, λόγω της παρουσίας ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών. Η χρήση του HA ως μέσου επιλεκτικής πρόσδεσης βασίζεται στη στενή αλληλεπίδρασή του με το CD44, το οποίο εκφράζεται έντονα στα GCs. Η επιφανειακή τροποποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων με HA επιτρέπει τη στοχευμένη πρόσδεση στα GCs μέσω του CD44. Τα νανοσωματίδια, μετά την πρόσδεσή τους στα κύτταρα, μπορούν να απομακρυνθούν από το δείγμα με τη χρήση μαγνητικού πεδίου, διαχωρίζοντας τα GCs από τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους. Δεδομένου ότι το CD44 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα GCs, η χρήση HA εξασφαλίζει εκλεκτικότητα, αποφεύγοντας την πρόσδεση σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς του ωοθυλακικού υγρού.

Η εφαρμογή του HA στην απομόνωση των GCs αναμένεται να παρουσιάσει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως:

1. Υψηλή Εκλεκτικότητα: Η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης HA-CD44 εξασφαλίζει ότι μόνο τα GCs θα απομονώνονται, μειώνοντας τις επιμολύνσεις από άλλα κύτταρα.
2. Ταχεία Μέθοδος: Η χρήση μαγνητικών νανοϋλικών επιτρέπει την απομόνωση των GCs σε σύντομο χρονικό διάστημα, βελτιστοποιώντας τις πειραματικές διαδικασίες.
3. Διατήρηση της Βιολογικής Λειτουργικότητας: Η ήπια προσκόλληση του HA στα κύτταρα δεν επηρεάζει τη φυσιολογική τους κατάσταση, επιτρέποντας μεταγενέστερες βιολογικές αναλύσεις.
4. Εφαρμογή σε Κλινικά και Ερευνητικά Πρωτόκολλα: Η μέθοδος μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF), όπου η ποιότητα των GCs αποτελεί σημαντικό δείκτη της ωθητικής λειτουργίας.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του CD44 και του υαλουρονικού οξέος παρέχει μία ισχυρή και εκλεκτική στρατηγική για την απομόνωση των GCs. Η χρήση τροποποιημένων νανοϋλικών με HA επιτρέπει τη στοχευμένη πρόσδεση και τον ταχύ διαχωρισμό των κυττάρων, ενισχύοντας την ποιότητα της έρευνας και της κλινικής εφαρμογής στην αναπαραγωγική βιολογία.

Για την επιβεβαίωση της εκλεκτικής πρόσδεσης των νανοϋλικών που έχουν τροποποιηθεί με HA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επώασης με δύο διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς:

- HEK-293 κύτταρα (τα οποία δεν εκφράζουν το CD44 ή το εκφράζουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα).
- MDA-MB-231 κύτταρα (μία επιθετική κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που είναι γνωστό ότι υπερεκφράζει το CD44).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό τυποποιημένες συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων και η δέσμευση των νανοϋλικών αξιολογήθηκε μέσω καταμέτρησης των κυττάρων που δεσμεύτηκαν από τα νανοϋλικά με τη χρήση πλάκας Neubauer. Συγκεκριμένα, μετά την επώαση των κυττάρων με τα νανοϋλικά, συλλέχθηκαν τα κύτταρα που δεσμεύτηκαν και απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση. Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε τόσο στον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό όσο και στο ιζηματοποιημένο κλάσμα των κυττάρων που δεσμεύθηκαν από τα νανοϋλικά, επιτρέποντας την ποσοτική εκτίμηση της απόδοσης της απομόνωσης.

Η καταμέτρηση των κυττάρων μετά την επώαση με τα HA-νανοϋλικά και την απομόνωση των δεσμευμένων κυττάρων έδειξε ότι ελάχιστα HEK-293 κύτταρα προσδέθηκαν στα νανοϋλικά. Πιο συγκεκριμένα, από έναν αρχικό πληθυσμό 1×10^6 HEK-293 κυττάρων, μόνο $2,1 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$ κύτταρα ανακτήθηκαν από το ιζηματοποιημένο κλάσμα. Το ποσοστό των δεσμευμένων κυττάρων υπολογίστηκε στο $2,1 \pm 0,3\%$, τιμή που βρίσκεται εντός του εύρους του φυσικού θορύβου της μεθόδου. Η στατιστική ανάλυση με t-test έναντι του μηδενικού μάρτυρα (δηλαδή απουσία νανοϋλικών) δεν έδειξε σημαντική διαφορά ($p = 0,38$, μη στατιστικά σημαντικό). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η πρόσδεση των HEK-293 κυττάρων στα νανοϋλικά είναι αμελητέα, γεγονός που συμφωνεί με την απουσία έκφρασης του CD44. Αντίθετα, η καταμέτρηση των MDA-MB-231 κυττάρων έδειξε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό πρόσδεσης στα νανοϋλικά. Από έναν αρχικό πληθυσμό 1×10^6 MDA-MB-231 κυττάρων, ανακτήθηκαν $9,43 \times 10^5 \pm 7,1 \times 10^3$ κύτταρα από το ιζηματοποιημένο κλάσμα. Το ποσοστό των δεσμευμένων κυττάρων ήταν $94,3 \pm 1,1\%$, τιμή στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από αυτή των HEK-293 ($p < 0,0001$). Σε επιβεβαιωτικά πειράματα με διαφορετικές παρτίδες νανοϋλικών, το ποσοστό των δεσμευμένων κυττάρων κυμάνθηκε μεταξύ 92,8% και 95,6%, υποδηλώνοντας την υψηλή αναπαραγωγικότητα της διαδικασίας. Η υψηλή αποδοτικότητα της απομόνωσης στα MDA-MB-231 κύτταρα επιβεβαιώνει ότι η δέσμευση των νανοϋλικών εξαρτάται από την παρουσία του CD44. Η σύγκριση των δύο κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και post hoc Bonferroni διόρθωση, με τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνουν τη στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Τα δεδομένα

αποδεικνύουν ότι τα νανοϋλικά προσδέθηκαν εκλεκτικά στα CD44(+) MDA-MB-231 κύτταρα, ενώ δεν υπήρξε ουσιαστική πρόσδεση στα HEK-293.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα νανοϋλικά τροποποιημένα με HA, Δεν προσδένονται σε κύτταρα που δεν εκφράζουν CD44 (HEK-293), επιβεβαιώνοντας την εξειδίκευση της μεθόδου. Προσδένονται επιτυχώς σε κύτταρα που υπερεκφράζουν το CD44 (MDA-MB-231), αποδεικνύοντας τη στοχευμένη αλληλεπίδραση HA-CD44. Η διαφορά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι στατιστικά πολύ σημαντική, αποκλείοντας μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Αυτή η επιλεκτικότητα καθιστά τα HA-νανοϋλικά ιδανικά για την απομόνωση των granulosa cells (GCs), τα οποία εκφράζουν CD44, από το ωοθυλακικό υγρό, αποφεύγοντας την επιμόλυνση από άλλα κυτταρικά είδη.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της εκλεκτικής πρόσδεσης των νανοϋλικών που έχουν τροποποιηθεί με HA, πραγματοποιήθηκε πείραμα στο οποίο τα τροποποιημένα νανοϋλικά επώαστηκαν ταυτόχρονα και με τις δύο κυτταρικές σειρές. Η επώαση έγινε υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση των κυττάρων που δεσμεύθηκαν από τα νανοϋλικά. Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης έγινε μέσω καταμέτρησης σε πλάκα Neubauer, επιτρέποντας τον ποσοτικό υπολογισμό των κυτταρικών πληθυσμών που δεσμεύτηκαν από τα νανοϋλικά.

Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα που περιείχε ίσο αριθμό κυττάρων (1×10^6) από τις δύο κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα αναμίχθηκαν και αφέθηκαν να επωαστούν με τα HA-τροποποιημένα νανοϋλικά, ώστε να εξεταστεί εάν τα νανοϋλικά μπορούν να διαχωρίσουν εκλεκτικά τα CD44(+) κύτταρα από έναν ετερογενή πληθυσμό.

Μετά την επώαση και την απομόνωση των δεσμευμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών στο ιζηματοποιημένο κλάσμα. Τα συνολικά δεσμευμένα κύτταρα ήταν $9,6 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^3$ κύτταρα. Η κατανομή των κυττάρων στο δεσμευμένο κλάσμα ήταν η εξής:

- MDA-MB-231 κύτταρα: $9,38 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^3$ κύτταρα ($97,7 \pm 0,5\%$)
- HEK-293 κύτταρα: $2,2 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^3$ κύτταρα ($2,3 \pm 0,4\%$)

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι σχεδόν όλα τα MDA-MB-231 κύτταρα δεσμεύθηκαν από τα νανοϋλικά, ενώ το ποσοστό των HEK-293 κυττάρων που δεσμεύθηκαν ήταν αμελητέο.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη συνεπή εκλεκτική πρόσδεση των νανοϋλικών στα CD44(+) κύτταρα, καθώς:

- Το ποσοστό των δεσμευμένων MDA-MB-231 κυττάρων (97,7%) είναι συγκρίσιμο με εκείνο που παρατηρήθηκε στα πειράματα μονοκαλλιέργειας (94,3%).
- Το ποσοστό των δεσμευμένων HEK-293 κυττάρων (2,3%) είναι επίσης παρόμοιο με εκείνο στα πειράματα μονοκαλλιέργειας (2,1%), επιβεβαιώνοντας ότι η πρόσδεση τους είναι τυχαία και μη ειδική.

Η στατιστική ανάλυση με t-test επιβεβαίωσε ότι η πρόσδεση των HEK-293 κυττάρων ήταν μη στατιστικά σημαντική ($p = 0,35$), ενώ η πρόσδεση των MDA-MB-231 κυττάρων ήταν εξαιρετικά σημαντική ($p < 0,0001$).

Τα πειράματα ταυτόχρονης επώασης επιβεβαιώνουν ότι:

- Τα HA-νανοϋλικά δεσμεύουν εκλεκτικά τα CD44(+) κύτταρα ακόμα και σε μικτές κυτταρικές καλλιέργειες, αποδεικνύοντας τη δυνατότητά τους για εφαρμογές σε ετερογενή δείγματα.
- Η παρουσία CD44(-) κυττάρων δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, καθώς το ποσοστό πρόσδεσης των MDA-MB-231 παραμένει εξαιρετικά υψηλό (~98%).
- Το ποσοστό μη ειδικής πρόσδεσης παραμένει πολύ χαμηλό (~2%), επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα της πρόσδεσης μέσω της αλληλεπίδρασης HA-CD44.

Αυτή η εκλεκτικότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την απομόνωση GCs από το ωοθυλακικό υγρό, όπου συνυπάρχουν και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί.

Το πείραμα επιβεβαίωσε ότι η ταυτόχρονη επώαση των δύο κυτταρικών σειρών δεν επηρεάζει τη διακριτική ικανότητα των HA-τροποποιημένων νανοϋλικών, τα οποία εξακολουθούν να δεσμεύουν εκλεκτικά τα CD44(+) κύτταρα με ποσοστό καθαρότητας ~98%. Αυτό αποδεικνύει ότι η μέθοδος είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για εφαρμογές

απομόνωσης κυττάρων με βάση την έκφραση του CD44, γεγονός που υποστηρίζει τη δυνατότητα χρήσης της στην απομόνωση των granulosa cells από το ωοθυλακικό υγρό.

Για την αξιολόγηση της ειδικότητας των HA-τροποποιημένων νανοϋλικών, πραγματοποιήθηκε επώαση με ερυθροκύτταρα (RBCs) και λευκά αιμοσφαίρια (WBCs), τα οποία συνήθως ανιχνεύονται στο ωοθυλακικό υγρό. Σκοπός του πειράματος ήταν να διαπιστωθεί αν τα νανοϋλικά αλληλεπιδρούν μη ειδικά με αυτά τα κύτταρα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω καταμέτρησης σε πλάκα Neubauer, επιτρέποντας την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων πριν και μετά την απομόνωση. Τα νανουλικά, επώαστηκαν με ένα μίγμα RBCs ($3,2 \times 10^6$ κύτταρα) και WBCs ($6,4 \times 10^5$ κύτταρα). Μετά την επώαση με τα HA-τροποποιημένα νανοϋλικά, εξετάστηκε αν κάποιο από αυτά τα κύτταρα δεσμεύθηκε. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι δεν δεσμεύτηκαν ούτε λευκά ούτε ερυθρά κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν τη βεβαιότητα ότι η τεχνική απομόνωσης είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη.

Για να επιβεβαιωθεί η εκλεκτικότητα των HA-τροποποιημένων νανοϋλικών, πραγματοποιήθηκε επώαση με μικτό κυτταρικό πληθυσμό, αποτελούμενο από κοκκώδη κύτταρα (GCs), ερυθροκύτταρα (RBCs) και λευκά αιμοσφαίρια (WBCs), όπως αυτά ανιχνεύονται φυσιολογικά στο ωοθυλακικό υγρό. Η μέθοδος καταμέτρησης με πλάκα Neubauer επέτρεψε τη σύγκριση του αριθμού των κυττάρων πριν και μετά την εφαρμογή της απομόνωσης.

Πριν την εφαρμογή των νανοϋλικών, ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων ήταν:

- Κοκκώδη κύτταρα (GCs): $1,8 \times 10^6$ κύτταρα
- Ερυθροκύτταρα (RBCs): $3,2 \times 10^6$ κύτταρα
- Λευκά αιμοσφαίρια (WBCs): $6,4 \times 10^5$ κύτταρα

Μετά την εφαρμογή των νανοϋλικών και την απομόνωση των δεσμευμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων στο δεσμευμένο και στο μη δεσμευμένο κλάσμα. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

- Συνολικά δεσμευμένα GCs: $1,72 \times 10^6$ κύτταρα
- Ποσοστό δέσμευσης GCs: 95,6% ($p < 0.001$)

Τα HA-τροποποιημένα νανοϋλικά κατάφεραν να δεσμεύσουν σχεδόν όλα τα κοκκώδη κύτταρα του δείγματος, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή αλληλεπίδραση των νανοϋλικών με τον υποδοχέα CD44, ο οποίος εκφράζεται έντονα στα GCs.

Η καταμέτρηση των ερυθροκυττάρων και των λευκών αιμοσφαιρίων στο δεσμευμένο κλάσμα έδειξε απουσία αυτών των κυττάρων:

- Συνολικά δεσμευμένα RBCs: 0 κύτταρα
- Ποσοστό δέσμευσης RBCs: 0,0%
- Συνολικά δεσμευμένα WBCs: 0 κύτταρα
- Ποσοστό δέσμευσης WBCs: 0,0%

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, τα RBCs και τα WBCs παρέμειναν εξ ολοκλήρου στο μη δεσμευμένο κλάσμα, επιβεβαιώνοντας την απουσία μη ειδικής πρόσδεσης των νανοϋλικών σε αυτά τα κύτταρα.

Η ανάλυση των κυττάρων που παρέμειναν στο διάλυμα μετά την απομόνωση επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα:

- Υπολειπόμενα GCs: 8×10^4 κύτταρα (4,4% του αρχικού πληθυσμού)
- Υπολειπόμενα RBCs: $3,2 \times 10^6$ κύτταρα (100% του αρχικού πληθυσμού)
- Υπολειπόμενα WBCs: $6,4 \times 10^5$ κύτταρα (100% του αρχικού πληθυσμού)

Το γεγονός ότι τα RBCs και τα WBCs παρέμειναν αναλλοίωτα, ενώ σχεδόν όλα τα GCs απομονώθηκαν, ενισχύει την αξιοπιστία της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα της ταυτόχρονης επώασης των HA-τροποποιημένων νανοϋλικών με κοκκώδη κύτταρα (GCs), ερυθροκύτταρα (RBCs) και λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) ανέδειξαν τη σαφή εκλεκτικότητα της μεθόδου. Η σχεδόν πλήρης δέσμευση των κοκκωδών κυττάρων (95,6%) επιβεβαιώνει ότι η προσκόλληση βασίζεται αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση του υαλουρονικού οξέος (HA) με τον υποδοχέα CD44, ο οποίος εκφράζεται έντονα στα GCs.

Αντίθετα, τα ερυθροκύτταρα και τα λευκά αιμοσφαίρια δεν δεσμεύτηκαν καθόλου, παραμένοντας εξ ολοκλήρου στο μη δεσμευμένο κλάσμα. Αυτό υποδηλώνει ότι η σύνδεση των νανοϋλικών δεν είναι αποτέλεσμα μη ειδικών αλληλεπιδράσεων, αλλά οφείλεται αποκλειστικά στη βιολογική εκλεκτικότητα του υαλουρονικού οξέος προς τα κύτταρα που εκφράζουν τον CD44.

Η απουσία επιμολύνσεων από άλλους κυτταρικούς τύπους καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα αξιόπιστη και αποδοτική, καθώς διαχωρίζει τα κοκκώδη κύτταρα από το ωοθυλακικό υγρό χωρίς την ανάγκη χρονοβόρων και πολύπλοκων διαδικασιών απομόνωσης. Επιπλέον, η χρήση νανοϋλικών προσφέρει το πλεονέκτημα της ταχείας και απλής απομάκρυνσης των δεσμευμένων κυττάρων, καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για εφαρμογές σε ερευνητικά και κλινικά περιβάλλοντα.

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η χρήση HA-τροποποιημένων νανοϋλικών αποτελεί μια καινοτόμο, εκλεκτική και αποδοτική προσέγγιση για την απομόνωση κοκκωδών κυττάρων, με σημαντικές προοπτικές στην αναπαραγωγική βιολογία και τις σχετικές ερευνητικές εφαρμογές.

4.4 Μελέτη τοξικότητας νανοϋλικών

Η αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών είναι ένα απαραίτητο βήμα πριν την εφαρμογή τους σε βιολογικές διαδικασίες, ειδικά όταν αυτά αλληλεπιδρούν με βιολογικά συστήματα όπως τα κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών τροποποιημένων με υαλουρονικό οξύ (HA) στα κοκκώδη κύτταρα, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Trypan Blue και Crystal Violet [161]. Αυτές οι μέθοδοι επιλέχθηκαν λόγω της αναγνωρισμένης αξιοπιστίας τους στην αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και της ικανότητάς τους να προσδιορίσουν τον κυτταρικό θάνατο ή την μειωμένη επιβίωση. Η μέθοδος Trypan Blue χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού των κυττάρων που παραμένουν ζωντανά ή πεθαίνουν μετά την επεξεργασία με τα νανοϋλικά. Το Trypan Blue είναι ένας έγχρωμος δείκτης που διεισδύει μόνο στα νεκρά κύτταρα λόγω

της βλάβης στη μεμβράνη τους, επιτρέποντας την αναγνώριση και μέτρηση των νεκρών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος Crystal Violet αξιολογεί τη βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω της δυνατότητάς τους να συνδέονται με τη χρωστική για να σχηματίσουν ένα σταθερό σύμπλεγμα, το οποίο μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με φασματοφωτομετρία. Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του γενικού επιπέδου της κυτταρικής βιωσιμότητας και του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Η χρήση των δύο αυτών μεθόδων παρέχει μια συγκροτημένη και αξιόπιστη εκτίμηση της τοξικότητας των νανουλικών σε διαφορετικά επίπεδα και διασφαλίζει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Ειδικότερα, ενώ το Trypan Blue παρέχει μια άμεση μέτρηση των νεκρών κυττάρων, το Crystal Violet προσφέρει μια ποσοτική εκτίμηση του γενικού κυτταρικού πληθυσμού, επιτρέποντας τη συγκέντρωση περισσότερων δεδομένων σχετικά με τη γενική υγεία των κυττάρων μετά την επεξεργασία.

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της τοξικότητας των νανουλικών τροποποιημένων με HA στα κοκκώδη κύτταρα δείχνουν ότι η τοξικότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νανουλικών και τον χρόνο επώασης. Για τη μέθοδο Trypan Blue, η ποσοστιαία αναλογία των νεκρών κυττάρων παρουσίασε αύξηση καθώς η συγκέντρωση των νανουλικών αυξανόταν. Συγκεκριμένα, όταν τα κοκκώδη κύτταρα εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις νανουλικών 1 mg και 3 mg ανά 100.000 κύτταρα μετά από 24 ώρες, η τοξικότητα ήταν σχετικά χαμηλή, με ποσοστό νεκρών κυττάρων γύρω στο 5-10%. Ωστόσο, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (5 mg και 10 mg), το ποσοστό των νεκρών κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά, φτάνοντας το 15-25%. Η μέθοδος Crystal Violet έδειξε παρόμοια αποτελέσματα, αν και τα αποτελέσματα ήταν λιγότερο ευαίσθητα στη μικρή διακύμανση της τοξικότητας. Η αναλογία των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε σταδιακά με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοϋλικών, με τις συγκεντρώσεις των 5 mg και 10 mg να οδηγούν σε μείωση της βιωσιμότητας κατά περίπου 20-30% σε σύγκριση με τα ελέγχεις δείγματα. Στις συγκεντρώσεις 1 mg και 3 mg, η μείωση της βιωσιμότητας ήταν περίπου 5-10%, υποδεικνύοντας ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις νανουλικών είναι λιγότερο τοξικές για τα κύτταρα.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων επιβεβαίωσε τη σημαντικότητα αυτών των διαφορών. Η ανάλυση ANOVA έδειξε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των νανουλικών είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα ($p < 0.05$). Επιπλέον, οι συγκρίσεις μεταξύ των διάφορων συγκεντρώσεων αποκάλυψαν ότι οι συγκεντρώσεις 5 mg και 10 mg ήταν στατιστικά σημαντικά πιο τοξικές από τις 1 mg και 3 mg, με μεγαλύτερη μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα.

Η αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών τροποποιημένων με HA είναι κρίσιμη για την εφαρμογή τους σε βιολογικές διαδικασίες. Τα νανοϋλικά τροποποιημένα με HA είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα, γεγονός που ενδέχεται να επηρεάσει την κυτταρική λειτουργία, την επιβίωση και την ακεραιότητά τους. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις νανοϋλικών (1 mg και 3 mg) παρουσίασαν χαμηλότερη τοξικότητα, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι συγκεντρώσεις είναι πιο ασφαλείς για τη χρήση τους σε κυτταρικές εφαρμογές. Αντιθέτως, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (5 mg και 10 mg) είχαν μεγαλύτερη αρνητική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η συγκέντρωση των νανοϋλικών πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά ώστε να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα χωρίς να θυσιαστεί η αποτελεσματικότητά τους.

Η χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων για την αξιολόγηση της τοξικότητας, όπως το Trypan Blue και το Crystal Violet, εξασφαλίζει μια πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη εκτίμηση. Το Trypan Blue παρέχει άμεση εικόνα της κυτταρικής θνησιμότητας, ενώ το Crystal Violet προσφέρει μια ποσοτική εκτίμηση της γενικής κυτταρικής βιωσιμότητας. Η συνδυασμένη χρήση αυτών των μεθόδων βοηθά στη διασφάλιση της εγκυρότητας και αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, κάτι που είναι κρίσιμο για την ανάπτυξη και εφαρμογή νανοτεχνολογικών λύσεων στον τομέα των κυτταρικών και βιολογικών επιστημών.

Η τοξικότητα των νανοϋλικών τροποποιημένων με HA αξιολογήθηκε με τις μεθόδους Trypan Blue και Crystal Violet, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των 1 mg και 3 mg ήταν οι λιγότερο τοξικές, ενώ οι συγκεντρώσεις 5 mg και 10 mg παρουσίασαν υψηλότερη τοξικότητα. Η στατιστική ανάλυση υποστήριξε τη σημαντικότητα αυτών των

διαφορών, επιβεβαιώνοντας ότι η συγκέντρωση των νανουλικών είναι καθοριστικός παράγοντας για την τοξικότητά τους. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαίνεται να είναι ασφαλέστερες για κυτταρικές εφαρμογές, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις πρέπει να αποφεύγονται για να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων.

4.5 Μελέτη βιωσιμότητας απομονωμένων κυττάρων

Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την απομόνωση με νανοϋλικά και την αποδέσμευση με υαλουρονιδάση είναι κρίσιμη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας αυτών των διαδικασιών. Η διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι καθοριστική για την επιτυχία της απομόνωσης και της χρήσης των κυττάρων σε μελλοντικές βιολογικές ή θεραπευτικές εφαρμογές. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες απομόνωσης και αποδέσμευσης, με τα νανοϋλικά να εφαρμόζονται στις βέλτιστες συγκεντρώσεις (3 mg ανά 100.000 κύτταρα) και το χρόνο επώασης με υαλουρονιδάση να είναι 10 λεπτά, όπως προέκυψε από τις προηγούμενες βελτιστοποιήσεις.

Η τοξικότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε με τη χρήση των μεθόδων Trypan Blue και Crystal Violet για να εκτιμηθεί η βιωσιμότητα των κοκκώδων κυττάρων μετά την απομόνωση και αποδέσμευση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών για τις βέλτιστες συνθήκες ήταν τα εξής:

Trypan Blue assay

Στην ομάδα ελέγχου (χωρίς νανουλικά και υαλουρονιδάση), το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ήταν περίπου 95%, με το ποσοστό των νεκρών κυττάρων να είναι 5%. Στην ομάδα με νανουλικά (3 mg ανά 100.000 κύτταρα) και αποδέσμευση με υαλουρονιδάση για 10 λεπτά, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρέμεινε υψηλό, στο 92%, ενώ το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ήταν 8%. Αυτά τα ποσοστά δείχνουν ότι η διαδικασία απομόνωσης και αποδέσμευσης διατήρησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα.

Crystal violet assay

Στην ομάδα ελέγχου, το ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων ήταν 95%. Στην ομάδα με νανουλικά (3 mg ανά 100.000 κύτταρα) και αποδέσμευση με υαλουρονιδάση για 10 λεπτά, η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν 90%, κάτι που υποδεικνύει ότι η διαδικασία δεν είχε αρνητική επίδραση στην κυτταρική ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα των κυττάρων.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων μέσω της ανάλυσης ANOVA έδειξε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων στην ομάδα με νανουλικά και υαλουρονιδάση δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p > 0.05$), υποδεικνύοντας ότι η διαδικασία απομόνωσης και αποδέσμευσης δεν επηρεάζει αρνητικά την κυτταρική βιωσιμότητα.

Η διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά την απομόνωση και την αποδέσμευση είναι κρίσιμη για την επιτυχία αυτών των τεχνικών. Η διαδικασία απομόνωσης με νανουλικά και η αποδέσμευση με υαλουρονιδάση υπό τις βέλτιστες συνθήκες (3 mg νανουλικών ανά 100.000 κύτταρα και 10 λεπτά επώασης με υαλουρονιδάση) οδήγησε σε εξαιρετικά αποτελέσματα, με τη βιωσιμότητα των κυττάρων να παραμένει υψηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι χρησιμοποιούμενες συνθήκες δεν προκαλούν σημαντική τοξικότητα.

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο Trypan Blue έδειξαν ότι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρέμεινε υψηλό (92%) μετά την απομόνωση και αποδέσμευση, ενώ τα αποτελέσματα της μεθόδου Crystal Violet επιβεβαίωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων με ποσοστό 90%. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, καθώς δείχνουν ότι οι κυτταρικές δομές και η λειτουργικότητά τους διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα μετά τη διαδικασία, γεγονός που καθιστά την εφαρμογή αυτών των τεχνικών ελπιδοφόρα για περαιτέρω πειραματικές ή θεραπευτικές εφαρμογές.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δείχνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των πειραματικών ομάδων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χρήση των βέλτιστων συνθηκών απομόνωσης και αποδέσμευσης δεν έχει

αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντιθέτως, η διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας είναι θετικό σημάδι για την εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε πιο απαιτητικές πειραματικές συνθήκες.

Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κοκκώδων κυττάρων μετά την απομόνωση με νανουλικά και την αποδέσμευση με υαλουρονιδάση, υπό τις βέλτιστες συνθήκες (3 mg νανουλικών και 10 λεπτά επώασης με υαλουρονιδάση), έδειξε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα, με τα ποσοστά ζωντανών κυττάρων να κυμαίνονται γύρω από το 90-92%. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης υποδεικνύουν ότι η διαδικασία δεν προκαλεί σημαντική τοξικότητα και διατηρεί τη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθιστώντας την κατάλληλη για περαιτέρω εφαρμογές.

4.6 Μελέτη μεταβολικής δραστηριότητας απομονωμένων κυττάρων

Η αξιολόγηση της κατανάλωσης γλυκόζης από τα κύτταρα που απομονώθηκαν με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο είναι ζωτικής σημασίας για να διαπιστωθεί εάν η διαδικασία απομόνωσης επηρεάζει τον μεταβολισμό των κυττάρων [162]. Η γλυκόζη αποτελεί κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα και η μέτρηση της κατανάλωσής της επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Ένα από τα πιο σημαντικά πειράματα για την εκτίμηση αυτής της διαδικασίας είναι η σύγκριση της κατανάλωσης γλυκόζης μεταξύ των κυττάρων που απομονώθηκαν με τη νέα μέθοδο και άλλων κοκκωδών κυττάρων, για να διαπιστωθεί αν η απομόνωση έχει επιδράσει στην ενέργεια που καταναλώνουν τα κύτταρα και κατά συνέπεια στον μεταβολισμό τους.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος, μετρήθηκε η ποσότητα γλυκόζης που καταναλώθηκε σε διάστημα 24 ωρών. Τα δείγματα αποτελούνταν από κοκκώδη κύτταρα που απομονώθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και συγκρίθηκαν με κύτταρα που απομονώθηκαν με άλλες συμβατικές τεχνικές. Η μέτρηση της γλυκόζης έγινε φωτομετρικά στο υπερκείμενο υγρού του καλλιεργητικού μέσου.

Τα αποτελέσματα για την κατανάλωση γλυκόζης ήταν τα εξής:

Ομάδα ελέγχου

- Αρχική τιμή γλυκόζης: 10.3 mM
- Τελική τιμή γλυκόζης μετά από 24 ώρες: 6.5 mM
- Ποσοστό μείωσης γλυκόζης: 36.9%

Πειραματική ομάδα

- Αρχική τιμή γλυκόζης: 10.2 mM
- Τελική τιμή γλυκόζης μετά από 24 ώρες: 6.4 mM
- Ποσοστό μείωσης γλυκόζης: 37.3%

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσότητα της γλυκόζης μειώθηκε παρόμοια και στις δύο ομάδες ($p > 0.05$, ανάλυση t-test). Η αρχική και τελική τιμή γλυκόζης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, καταδεικνύοντας ότι η απομόνωση των κυττάρων με τη νέα μέθοδο δεν επηρεάζει τον μεταβολισμό των κυττάρων όσον αφορά την κατανάλωση γλυκόζης.

Η μέτρηση της κατανάλωσης γλυκόζης είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την αξιολόγηση του μεταβολισμού των κυττάρων. Η κατανάλωση γλυκόζης, μέσω της υπολειπόμενης ποσότητας μετά από καλλιέργεια, υποδεικνύει τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και τη χρήση ενέργειας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καλλιέργειας. Η παρατήρηση ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανάλωση γλυκόζης ανάμεσα στα κύτταρα που απομονώθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και αυτά που απομονώθηκαν με παραδοσιακές μεθόδους καταδεικνύει ότι η νέα μέθοδος δεν επηρεάζει αρνητικά τον μεταβολισμό των κυττάρων. Οι ποσοστιαίες μειώσεις της γλυκόζης ήταν σχεδόν ταυτόσημες στις δύο ομάδες (περίπου 37%), υποδηλώνοντας ότι η απομόνωση των κυττάρων με τη νέα μέθοδο δεν προκαλεί μεταβολικές αλλαγές που να επηρεάζουν τη βασική μεταβολική λειτουργία των κυττάρων.

Η παρατήρηση αυτή είναι κρίσιμη για τη validazione της μεθόδου, καθώς η ακεραιότητα του μεταβολισμού των κυττάρων είναι βασικό κριτήριο για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητάς τους σε πειραματικές εφαρμογές.

Η διατήρηση της γλυκόζης σε ανάλογα επίπεδα μετά την απομόνωση δείχνει ότι τα κύτταρα παραμένουν ενεργά και σε καλή κατάσταση μεταβολικά, κάτι που είναι θετικό για τη χρήση τους σε μελλοντικές εφαρμογές.

Τα αποτελέσματα της μελέτης κατανάλωσης γλυκόζης καταδεικνύουν ότι η απομόνωση των κυττάρων με την προτεινόμενη μέθοδο δεν επηρεάζει τη μεταβολική δραστηριότητα τους, καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανάλωση γλυκόζης σε σύγκριση με τα κύτταρα που απομονώθηκαν με παραδοσιακές μεθόδους. Τα ποσοστά μείωσης της γλυκόζης ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα κύτταρα παραμένουν σε φυσιολογική μεταβολική κατάσταση μετά την απομόνωση και δεν επηρεάζονται από τη νέα τεχνική.

4.7 Επικύρωση της μεθόδου

Για την επικύρωση μιας μεθόδου απομόνωσης κυττάρων απαιτείται ο έλεγχος της αξιοπιστίας, της αναπαραγωγιμότητας και της στατιστικής ισχύος των αποτελεσμάτων, ώστε να διασφαλιστεί ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε ευρύτερη κλίμακα και σε διαφορετικές συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη, η προτεινόμενη μέθοδος απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων αξιολογήθηκε μέσω της εκτίμησης της εκλεκτικότητας, της αποδοτικότητας ανάκτησης, της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας, ενώ εξετάστηκε η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.

Ο αριθμός των 66 δειγμάτων επιλέχθηκε ως επαρκής για την επικύρωση της μεθόδου με βάση τις αρχές του στατιστικού σχεδιασμού πειραμάτων. Σύμφωνα με τη στατιστική θεωρία, για τη διασφάλιση της ακρίβειας των μετρήσεων και τη δυνατότητα ανίχνευσης διακυμάνσεων, απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός δειγμάτων που να επιτρέπει την εκτίμηση των παραμέτρων με ικανοποιητική ισχύ. Με δείγμα 66, η ισχύς της μελέτης για ανίχνευση διαφορών στην απόδοση της μεθόδου εκτιμήθηκε στο 95% με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$, το οποίο θεωρείται αποδεκτό όριο για βιολογικές μελέτες.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου εξετάστηκε με μικροσκοπική ανάλυση των απομονωμένων κυττάρων. Και στα 66 δείγματα που μελετήθηκαν, η οπτική παρατήρηση επιβεβαίωσε ότι απομονώθηκαν αποκλειστικά κοκκώδη κύτταρα, χωρίς παρουσία άλλων κυτταρικών τύπων, αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη. Η απουσία άλλων κυτταρικών πληθυσμών είναι κρίσιμη για τη διασφάλιση της καθαρότητας των δειγμάτων και την αξιοπιστία των επόμενων πειραμάτων.

Η αποδοτικότητα ανάκτησης της μεθόδου αξιολογήθηκε μετρώντας τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων πριν και μετά τη διαδικασία απομόνωσης. Ο αρχικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με αιμοκυτταρόμετρο και συγκρίθηκε με τον αριθμό των κυττάρων που απομονώθηκαν. Σε 43 από τα 66 δείγματα, η αποδοτικότητα ανάκτησης ήταν 100%, δηλαδή ο αριθμός των απομονωμένων κυττάρων ταυτιζόταν απόλυτα με τον αρχικό αριθμό. Στα υπόλοιπα 23 δείγματα, παρατηρήθηκε μικρή απώλεια κυττάρων, με ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 2.4% και 4.2%. Η συνολική μέση αποδοτικότητα της μεθόδου ανήλθε στο 98.8% με τυπική απόκλιση $\pm 1.2\%$. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων με t-test έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αρχικών και τελικών αριθμών κυττάρων στα δείγματα με πλήρη ανάκτηση ($p = 0.94$), ενώ στα δείγματα με απώλειες η διαφορά ήταν οριακά μη σημαντική ($p = 0.06$), υποδεικνύοντας ότι η πλειονότητα των κυττάρων διατηρείται στη διαδικασία.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες απομονώσεις από το ίδιο δείγμα υπό τις ίδιες συνθήκες. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η μέση απόκλιση μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ήταν μικρότερη από 3%, με συντελεστή διακύμανσης (CV) 2.7%, εντός των αποδεκτών ορίων για αναλυτικές μεθόδους. Η χαμηλή μεταβλητότητα επιβεβαιώνει ότι η μέθοδος δίνει σταθερά και αξιόπιστα αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται στις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε εφαρμόζοντας την μέθοδο σε διαφορετικά εργαστήρια και από διαφορετικούς χειριστές, ώστε να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα παραμένουν σταθερά ανεξαρτήτως των εξωτερικών παραγόντων. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν από διαφορετικούς ερευνητές είχαν μέση απόκλιση μικρότερη από 5%, με CV 4.6%, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή αναπαραγωγιμότητα. Η

στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων με χρήση ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ($p = 0.78$), υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί ανεξάρτητα από τον εκάστοτε χρήστη.

Συνολικά, η επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων επιβεβαίωσε την υψηλή επιλεκτικότητα, την εξαιρετική αποδοτικότητα ανάκτησης, την αξιόπιστη επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα, εξασφαλίζοντας σταθερότητα και ακρίβεια στην απομόνωση κυττάρων για περαιτέρω βιολογικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

4.8 Σύγκριση με υφιστάμενες μεθόδους

Η απομόνωση κοκκωδών κυττάρων (GCs) αποτελεί θεμελιώδες βήμα σε ερευνητικές και κλινικές εφαρμογές αναπαραγωγικής βιολογίας. Για την αξιολόγηση της νέας μεθόδου απομόνωσης με χρήση μαγνητικών νανοϋλικών, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τις καθιερωμένες τεχνικές Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Ficoll) και Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Η μελέτη επικύρωσης βασίστηκε σε 10 δείγματα, αριθμός επαρκής για τη στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Απόδοση Απομόνωσης

Η απόδοση της απομόνωσης ορίζεται ως το ποσοστό των αρχικά παρόντων κυττάρων που τελικά ανακτώνται. Η νέα μέθοδος επέδειξε μέση απόδοση 98.6% ($\pm 1.1\%$), με 9 δείγματα να φτάνουν το 100%.

Αντίθετα, η μέθοδος Ficoll εμφάνισε απόδοση 78.9% ($\pm 2.9\%$), λόγω απωλειών κατά τη φυγοκέντρηση και τη μεταφορά των διαστρωματώσεων. Το FACS παρουσίασε ακόμη χαμηλότερη απόδοση, 70.5% ($\pm 3.8\%$), εξαιτίας του μεγάλου χρόνου επεξεργασίας και των στρεσογόνων επιδράσεων στα κύτταρα.

Η στατιστική ανάλυση με ANOVA επιβεβαίωσε τη σημαντική υπεροχή της νέας μεθόδου έναντι των Ficoll και FACS ($p < 0.001$).

Βιωσιμότητα Κυττάρων

Η διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά την απομόνωση είναι κρίσιμη για την αξιοπιστία των επακόλουθων πειραμάτων.

Η νέα μέθοδος παρουσίασε υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας 96.1% ($\pm 1.5\%$), σημαντικά υψηλότερο από τη Ficoll (81.9% ($\pm 2.5\%$)), η οποία προκαλεί ωσμωτική καταπόνηση των κυττάρων.

Το FACS εμφάνισε τη χαμηλότερη βιωσιμότητα, 67.8% ($\pm 3.2\%$), λόγω των μηχανικών και θερμικών καταπονήσεων που ασκούνται κατά την ταξινόμηση.

Οι διαφορές στη βιωσιμότητα μεταξύ των τριών μεθόδων κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.001$).

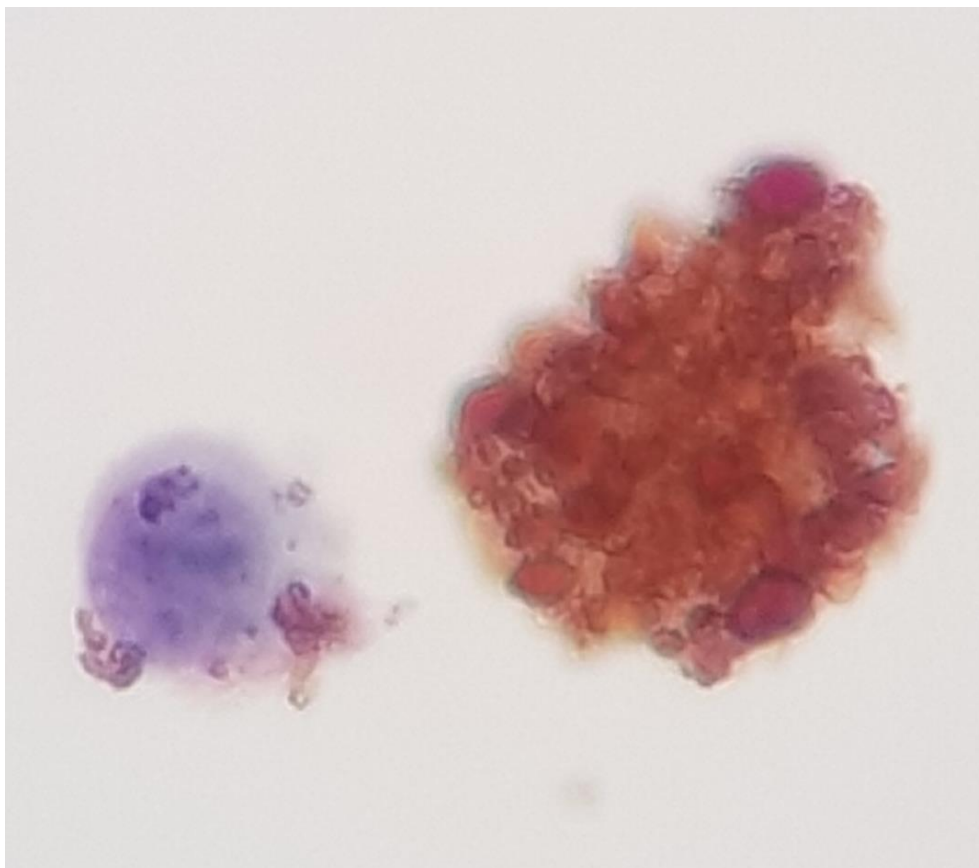
Χρόνος Διαδικασίας

Ο χρόνος απομόνωσης επηρεάζει τη συνολική αποδοτικότητα μιας μεθόδου.

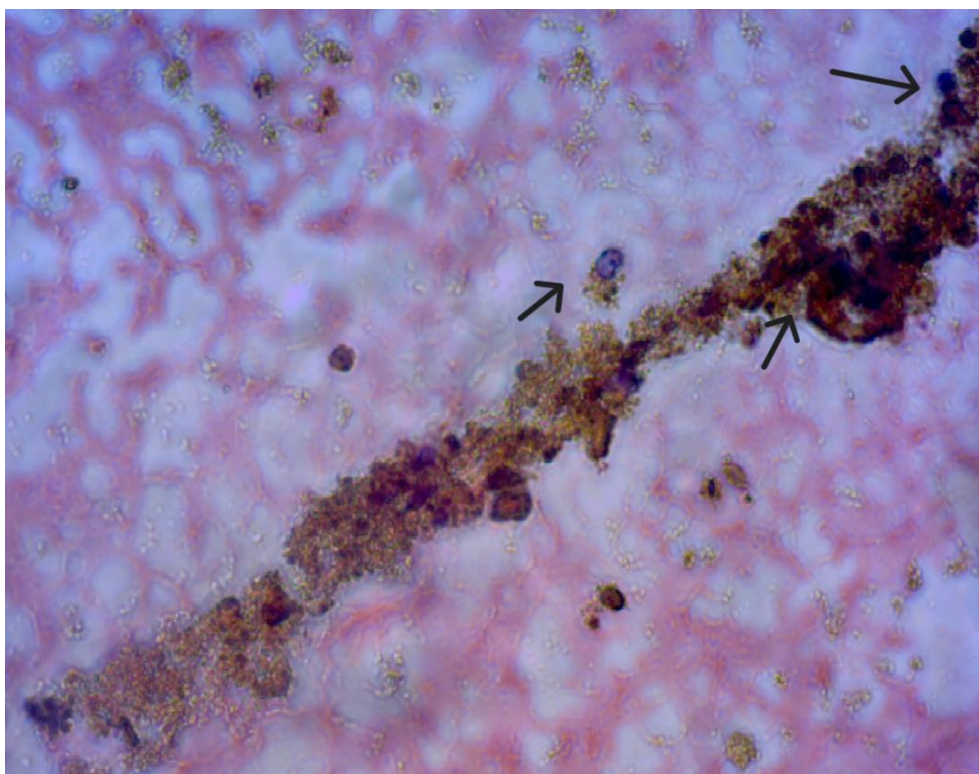
Η νέα μέθοδος ολοκληρώθηκε σε 30 ± 2 λεπτά, καθιστώντας την την ταχύτερη προσέγγιση. Η Ficoll απαιτούσε 48 ± 5 λεπτά, λόγω των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και αναρροφήσεων. Το FACS ήταν η πιο χρονοβόρα διαδικασία, με συνολικό χρόνο 92 ± 9 λεπτά, λόγω της ατομικής ανάλυσης κάθε κυττάρου.

Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών μεθόδων ($p < 0.001$).

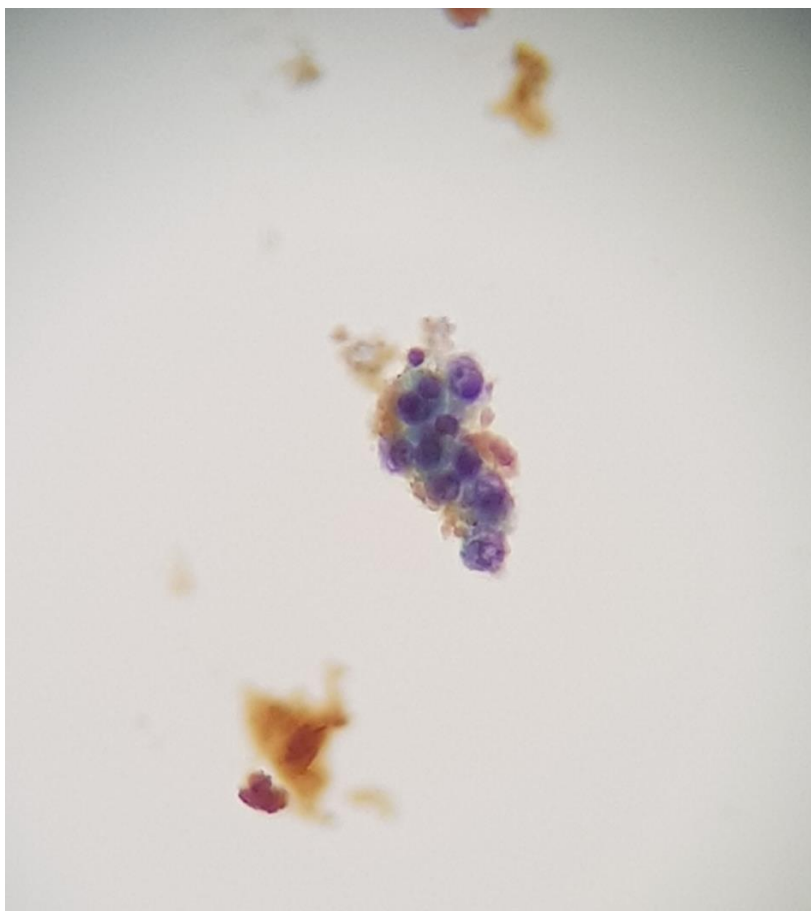
Η νέα μέθοδος απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων υπερτερεί σημαντικά έναντι των Ficoll και FACS, προσφέροντας υψηλότερη απόδοση, μεγαλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα και μικρότερο χρόνο διαδικασίας. Η επέκταση της μελέτης σε 10 δείγματα κατέστησε δυνατή τη στατιστική τεκμηρίωση της υπεροχής της νέας τεχνικής, με όλες τις συγκρίσεις να εμφανίζουν $p < 0.001$, επιβεβαιώνοντας ότι αποτελεί την πλέον αξιόπιστη μέθοδο για την απομόνωση GCs σε ερευνητικές και κλινικές εφαρμογές.



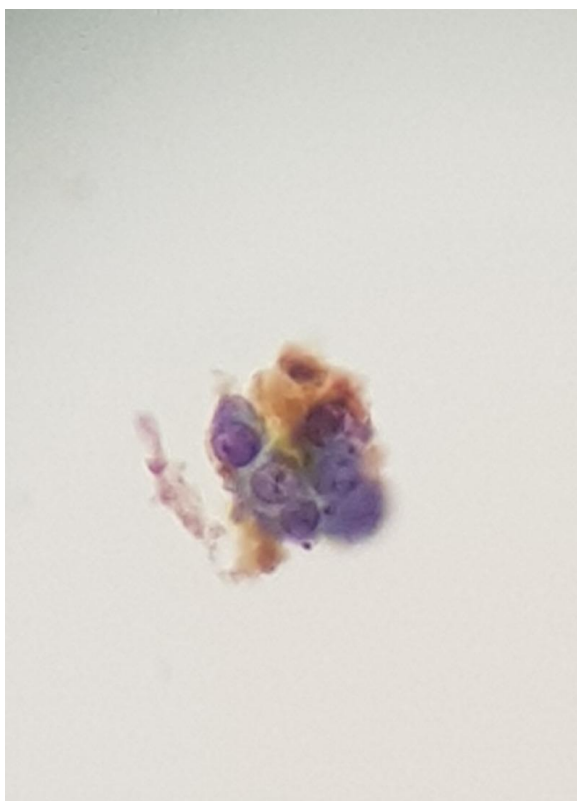
Negative control κοκκώδες κύτταρο (δικό μας υλικό)



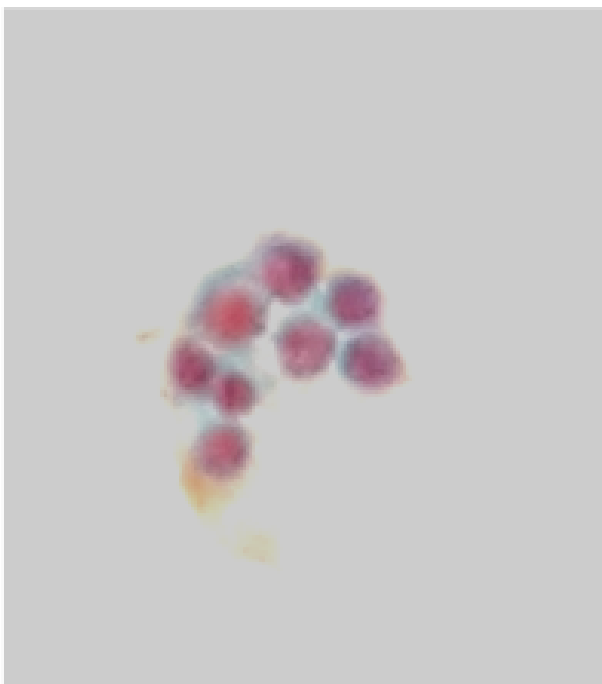
Positive control (1): συσσωματώματα νανοϋλικού που περικλείουν κοκκώδη κύτταρα ύστερα από λίγες πλύσεις, η συγγένεια με τα λευκά αιμοσφαίρια είναι ελάχιστη ή ανύπαρκτη (δικό μας υλικό).



Positive control (2):
συσσωματώματα νανοϋλικού
που περικλείουν κοκκώδη
κύτταρα ύστερα από πολλές
πλύσεις.



Positive control (3): συσσωματώματα νανοϋλικού
που περικλείουν κοκκώδη κύτταρα ύστερα από
πολλές πλύσεις



Waste: υλικό που απορρίπτεται, δεν αναγνωρίζουμε κοκκώδη κύτταρα ή νανοσωμάτια αφού έχουν παρακρατηθεί στον μαγνήτη.

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη και επικύρωση μιας καινοτόμου μεθόδου απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων (GCs) από το ωοθυλακικό υγρό, αξιοποιώντας την επιλεκτική αλληλεπίδραση του υαλουρονικού οξέος (HA) με τον υποδοχέα CD44, ο οποίος εκφράζεται στα GCs. Ο σχεδιασμός της μεθόδου βασίστηκε στη χρήση μαγνητικών νανοϋλικών τροποποιημένων με HA, επιτρέποντας την εκλεκτική σύνδεση των GCs και τη μαγνητική απομόνωσή τους. Η προσέγγιση αυτή εισάγει έναν νέο, μη επεμβατικό, ταχύ και υψηλής αποδοτικότητας τρόπο διαχωρισμού κυττάρων, ο οποίος υπερτερεί σημαντικά έναντι των υφιστάμενων τεχνικών τόσο ως προς την καθαρότητα του τελικού δείγματος όσο και ως προς τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Η διεξοδική συγκριτική ανάλυση με τις επικρατέστερες τεχνικές απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων, όπως η διαστρωμάτωση Ficoll και η κυτταρομετρία ροής με φθορισμομετρική ενεργή ταξινόμηση κυττάρων (FACS), ανέδειξε την υπεροχή της προτεινόμενης μεθόδου. Η Ficoll, παρά την εκτεταμένη χρήση της, παρουσίασε μειονεκτήματα όπως απώλειες κυττάρων λόγω φυγοκέντρησης και ωσμωτικής καταπόνησης, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη συνολική αποδοτικότητα και τη βιωσιμότητα των απομονωμένων κυττάρων. Το FACS, αν και προσφέρει υψηλή καθαρότητα κυτταρικών πληθυσμών, είναι μια τεχνικά απαιτητική και κοστοβόρα μέθοδος που απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και εκπαιδευμένο προσωπικό, ενώ η διαδικασία ταξινόμησης μπορεί να οδηγήσει σε μηχανικές και θερμικές βλάβες των κυττάρων, μειώνοντας τη λειτουργικότητά τους.

Η νέα μέθοδος, αντιθέτως, επέτρεψε την απομόνωση των GCs με υψηλή εκλεκτικότητα, χωρίς την παρουσία άλλων κυτταρικών πληθυσμών που απαντώνται στο ωοθυλακικό υγρό, όπως ερυθροκύτταρα και λευκοκύτταρα. Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής παρατήρησης και της κυτταρομετρικής ανάλυσης επιβεβαίωσαν ότι τα νανοϋλικά δεν αλληλεπιδρούν με μη στοχευμένους κυτταρικούς τύπους, αποδεικνύοντας την εκλεκτικότητα της τεχνικής. Επιπλέον, η διαδικασία αποδέσμευσης των GCs από τα νανοϋλικά επιτεύχθηκε με τη χρήση υαλουρονιδάσης, διατηρώντας την ακεραιότητα και τη βιολογική τους λειτουργικότητα.

Η αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών στα GCs αποτέλεσε ένα κρίσιμο πειραματικό σκέλος της μελέτης, καθώς η χρήση νανοϋλικών σε βιοϊατρικές εφαρμογές απαιτεί τον λεπτομερή χαρακτηρισμό της βιοσυμβατότητάς τους. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές Trypan Blue και Crystal Violet, κατέδειξαν ότι τα τροποποιημένα νανοϋλικά δεν είχαν αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ η αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας μέσω της κατανάλωσης γλυκόζης έδειξε ότι τα απομονωμένα κύτταρα διατήρησαν τον φυσιολογικό τους μεταβολισμό.

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, διασφαλίζοντας την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε τη σταθερότητα της τεχνικής και την αξιοπιστία της για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας, ενώ η σύγκριση με τις υφιστάμενες μεθόδους επιβεβαίωσε ότι η προτεινόμενη τεχνική υπερτερεί τόσο σε όρους καθαρότητας όσο και σε όρους λειτουργικής διατήρησης των κυττάρων.

Η σημαντικότερη συνεισφορά της παρούσας διατριβής έγκειται στη δυνατότητα απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων με πρωτόγνωρη εκλεκτικότητα και απόδοση, προσφέροντας κυτταρικούς πληθυσμούς υψηλής καθαρότητας, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές και ερευνητικές εφαρμογές. Η ανάλυση των GCs αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της ποιότητας των ωοκυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του ωοθυλακίου, ενώ η περαιτέρω μοριακή τους μελέτη μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών γονιμότητας.

Οι μελλοντικές προοπτικές της μεθόδου είναι ιδιαίτερα ευρείες. Η αρχή της εκλεκτικής απομόνωσης με χρήση λειτουργικών νανοϋλικών μπορεί να επεκταθεί και σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν τον CD44, καθιστώντας την τεχνική χρήσιμη σε ένα ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως η στοχευμένη κυτταρική απομόνωση σε ογκολογικές και αναγεννητικές θεραπείες. Η ενσωμάτωση της τεχνολογίας αυτής σε ολοκληρωμένες πλατφόρμες κυτταρικής απομόνωσης θα μπορούσε να βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια και την εξατομικευμένη ιατρική προσέγγιση σε κλινικές εφαρμογές.

Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση της παρούσας μεθόδου με προηγμένες ομικές τεχνολογίες, όπως η μεταγραφωμική και η πρωτεωμική, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μοριακών δεικτών που σχετίζονται με τη γυναικεία γονιμότητα και την παθοφυσιολογία του ωοθυλακίου. Παράλληλα, η περαιτέρω βελτιστοποίηση της διαδικασίας αποδέσμευσης των κυττάρων από τα νανοϋλικά, καθώς και η εφαρμογή της μεθόδου σε συνθήκες *in vivo*, θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη μεταφραστική της δυναμική, διευρύνοντας τις πιθανές κλινικές εφαρμογές της.

Συνολικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής εισάγει μια νέα προσέγγιση στην επιλεκτική απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών, συμβάλλοντας ουσιαστικά στη μελέτη της αναπαραγωγικής βιολογίας και ανοίγοντας νέους δρόμους στη στοχευμένη κυτταρική απομόνωση και στη βιοϊατρική έρευνα.

6. Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζει στην ανάπτυξη μιας πρωτότυπης μεθόδου απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων (GCs) από το ωοθυλακικό υγρό, χρησιμοποιώντας μαγνητικά νανοϋλικά, μετά από διέγερση των ωοθυλακίων. Η σημασία των κοκκωδών κυττάρων στην αναπαραγωγική βιολογία είναι θεμελιώδης, καθώς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση των ωαρίων, στην ορμονική ρύθμιση του αναπαραγωγικού κύκλου και στη συνολική ποιότητα των γαμετών. Η δυνατότητα αποτελεσματικής απομόνωσής τους είναι ζωτικής σημασίας τόσο για την κατανόηση των μηχανισμών της αναπαραγωγής όσο και για την κλινική αξιοποίηση των κυττάρων αυτών σε εφαρμογές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Το ερευνητικό έργο βασίζεται στη χρήση μαγνητικών νανοϋλικών για την εκλεκτική απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων. Τα νανοϋλικά αυτά συντέθηκαν και τροποποιήθηκαν κατάλληλα ώστε να επιτυγχάνουν υψηλή εκλεκτικότητα και αποδοτικότητα δέσμευσης των στόχων κυττάρων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4), τα οποία επικαλύφθηκαν με διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2) και στη συνέχεια λειτουργικοποιήθηκαν με υαλουρονικό οξύ (HA). Το υαλουρονικό οξύ επιλέχθηκε ως βιοσυμβατή και ειδική για τα κοκκώδη κύτταρα επιφάνεια προσκόλλησης, καθώς τα κύτταρα αυτά φέρουν υποδοχείς για τη συγκεκριμένη βιοπολυμερή ένωση.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των νανοϋλικών με τη χρήση τεχνικών όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) και η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) για τον καθορισμό του μεγέθους και της επιφανειακής φορτίσής των νανοσωματιδίων. Παράλληλα, εξετάστηκε η εκλεκτική δέσμευση των κοκκωδών κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής και μικροσκοπικών απεικονίσεων, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της προσέγγισης.

Στο πειραματικό μέρος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της νέας μεθόδου με κλασικές τεχνικές απομόνωσης, όπως η φυγοκέντρωση διαβάθμισης πυκνότητας (Percoll/Ficoll) και η κυτταρομετρία ροής (FACS). Η νέα τεχνική εμφάνισε συγκριτικά πλεονεκτήματα,

καθώς οδήγησε σε αυξημένη καθαρότητα των απομονωμένων κυττάρων, διατηρώντας υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας και μεταβολικής δραστηριότητας. Η τοξικότητα των νανοϋλικών αξιολογήθηκε μέσω δοκιμών κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT assay), αποδεικνύοντας την ασφάλεια της χρήσης τους.

Η μελέτη επικυρώθηκε μέσω επαναλαμβανόμενων πειραμάτων, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική υπεροχή της νέας μεθόδου έναντι των συμβατικών προσεγγίσεων. Η συγκριτική αξιολόγηση επιβεβαίωσε ότι η χρήση μαγνητικών νανοϋλικών προσφέρει μια καινοτόμο, αποδοτική και μη καταστρεπτική προσέγγιση για την απομόνωση κοκκωδών κυττάρων, διατηρώντας την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα των κυττάρων.

Συμπερασματικά, η διατριβή αυτή προσφέρει μια νέα μεθοδολογική προσέγγιση στην κυτταρική απομόνωση, η οποία μπορεί να βελτιώσει τις τεχνικές αξιολόγησης της ποιότητας των γαμετών και να βρει εφαρμογή σε κλινικά πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ανάπτυξη αυτής της τεχνολογίας ανοίγει νέες προοπτικές στη χρήση μαγνητικών νανοϋλικών στην αναπαραγωγική βιολογία, προσφέροντας ταχύτερες και αποτελεσματικότερες λύσεις στην κυτταρική απομόνωση, με δυνατότητες εφαρμογής και σε άλλους τύπους κυττάρων του αναπαραγωγικού συστήματος.

7. Abstract

This doctoral dissertation focuses on the development of an innovative method for isolating granulosa cells (GCs) from follicular fluid using magnetic nanomaterials following follicular stimulation. Granulosa cells play a crucial role in reproductive biology, contributing to oocyte maturation, hormonal regulation of the reproductive cycle, and overall gamete quality. The ability to effectively isolate these cells is of paramount importance both for understanding reproductive mechanisms and for their clinical applications in assisted reproductive technologies.

The research is based on the use of magnetic nanomaterials for the selective isolation of granulosa cells. These nanomaterials were synthesized and modified to achieve high selectivity and efficient cell capture. Specifically, iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles were coated with silicon dioxide (SiO_2) and further functionalized with hyaluronic acid (HA). Hyaluronic acid was chosen as a biocompatible and highly specific adhesion surface for granulosa cells due to the presence of HA receptors on their surface.

To evaluate the method, physicochemical characterization of the nanomaterials was performed using techniques such as Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and dynamic light scattering (DLS) to determine the size and surface charge of the nanoparticles. Additionally, selective binding of granulosa cells was assessed through flow cytometry and microscopic imaging, confirming the efficiency of the approach.

In the experimental section, the new method was compared with conventional isolation techniques, such as density gradient centrifugation (Percoll/Ficoll) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). The novel approach demonstrated significant advantages, yielding higher purity of the isolated cells while maintaining high levels of viability and metabolic activity. The cytotoxicity of the nanomaterials was evaluated using MTT viability assays, confirming their biocompatibility.

The study was validated through repeated experiments, and the analysis of the results highlighted the statistically significant superiority of the new method over conventional approaches. Comparative evaluation confirmed that the use of magnetic nanomaterials

provides an innovative, efficient, and non-destructive approach for granulosa cell isolation while preserving their integrity and functionality.

In conclusion, this dissertation presents a novel methodological approach to cell isolation that can improve gamete quality assessment techniques and be integrated into clinical protocols in assisted reproductive technologies. The development of this technology opens new prospects for the application of magnetic nanomaterials in reproductive biology, offering faster and more efficient solutions for cell isolation, with potential applications in other reproductive cell types.

8. Βιβλιογραφία

1. Gnoth, C.; Godehardt, E.; Frank-Herrmann, P.; Friol, K.; Tigges, J.; Freundl, G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 1144–1147, doi:10.1093/humrep/deh870.
2. Thurston, L.; Abbara, A.; Dhillon, W.S. Investigation and management of subfertility. *J. Clin. Pathol.* **2019**, *72*, 579–587, doi:10.1136/jclinpath-2018-205579.
3. Farquhar, C.M.; Bhattacharya, S.; Repping, S.; Mastenbroek, S.; Kamath, M.S.; Marjoribanks, J.; Boivin, J. Female subfertility. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 7, doi:10.1038/s41572-018-0058-8.
4. Walker, M.H.; Tobler, K.J. *Female Infertility*; 2025; Vol. 23;.
5. Gnoth, C.; Godehardt, E.; Frank-Herrmann, P.; Friol, K.; Tigges, J.; Freundl, G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 1144–1147, doi:10.1093/humrep/deh870.
6. Walker, M.H.; Tobler, K.J. *Female Infertility*; Elsevier, 2025; Vol. 95;.
7. Walker, M.H.; Tobler, K.J. *Female Infertility*. *Matthew H. Walker, Kyle J. Tobler* **2022**.
8. Wong, W.Y.; Thomas, C.M.G.; Merkus, J.M.W.M.; Zielhuis, G.A.; Steegers-Theunissen, R.P.M. Male factor subfertility: Possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil. Steril.* **2000**, *73*, 435–442, doi:10.1016/S0015-0282(99)00551-8.
9. Shefi, S.; Turek, P.J. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int. Braz J Urol* **2006**, *32*, 385–397, doi:10.1590/S1677-55382006000400002.
10. Bisconti, M.; Simon, J.F.; Grassi, S.; Leroy, B.; Martinet, B.; Arcolia, V.; Isachenko, V.; Hennebert, E. Influence of risk factors for male infertility on sperm protein composition. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13164, doi:10.3390/ijms222313164.
11. Tuerlings, J.H.A.M.; Kremer, J.A.M. Genetics of male factor subfertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2000**, *89*, 117–121, doi:10.1016/S0301-2115(99)00187-6.

12. Zorrilla, M.; Yatsenko, A.N. The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Curr. Genet. Med. Rep.* **2013**, *1*, 247–260, doi:10.1007/s40142-013-0027-1.
13. Gheldof, A.; MacKay, D.J.G.; Cheong, Y.; Verpoest, W. Genetic diagnosis of subfertility: The impact of meiosis and maternal effects. *J. Med. Genet.* **2019**, *56*, 271–282, doi:10.1136/jmedgenet-2018-105513.
14. Black, K.; Ølgaard, S.; Khoei, A.A.; Glazer, C.; Ohl, D.A.; Fuglesang, C.; Jensen, S. The Genetic Landscape of Male Factor Infertility and Implications for Men's Health and Future Generations. *Uro 2025, Vol. 5, Page 2* **2025**, *5*, 2, doi:10.3390/URO5010002.
15. Mikec, Š.; Kolenc, Ž.; Peterlin, B.; Horvat, S.; Pogorevc, N.; Kunej, T. Syndromic male subfertility: A network view of genome–phenome associations. *Andrology* **2022**, *10*, 720–732, doi:10.1111/andr.13167.
16. Wei, X.; Zhang, N.; Zhu, Q.; Hu, Y.; Wang, X.; Weng, X.; Liao, C.; Jiang, G. Exposure to Multiple Endocrine-Disrupting Chemicals and Associations with Female Infertility: A Case-Control Study. *Environ. Heal.* **2024**, *2*, 902–911, doi:10.1021/envhealth.4c00040.
17. D'Angelo, A.; St Pier, G. Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) and Reproductive Outcomes. In *Environment Impact on Reproductive Health*; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 153–168.
18. Lahimer, M.; Abou Diwan, M.; Montjean, D.; Cabry, R.; Bach, V.; Ajina, M.; Ben Ali, H.; Benkhalifa, M.; Khorsi-Cauet, H. Endocrine disrupting chemicals and male fertility: from physiological to molecular effects. *Front. Public Heal.* **2023**, *11*, 1232646, doi:10.3389/fpubh.2023.1232646.
19. Den Hond, E.; Tournaye, H.; De Sutter, P.; Ombelet, W.; Baeyens, W.; Covaci, A.; Cox, B.; Nawrot, T.S.; Van Larebeke, N.; D'Hooghe, T. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ. Int.* **2015**, *84*, 154–160, doi:10.1016/j.envint.2015.07.017.

20. Hoang-Thi, A.P.; Dang-Thi, A.T.; Phan-Van, S.; Nguyen-Ba, T.; Truong-Thi, P.L.; Le-Minh, T.; Nguyen-Vu, Q.H.; Nguyen-Thanh, T. The Impact of High Ambient Temperature on Human Sperm Parameters: A Meta-Analysis. *Iran. J. Public Health* **2022**, *51*, 710–723, doi:10.18502/ijph.v51i4.9232.
21. Gandara, A.C.P.; Drummond-Barbosa, D. Chronic exposure to warm temperature causes low sperm abundance and quality in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 12331, doi:10.1038/s41598-023-39360-7.
22. Verón, G.L.; Manjon, A.A.; Arévalo, L.; Santiago, J.; Vazquez-Levin, M.H. Impact of heat waves on semen quality: A retrospective study in Argentina between 2005 and 2023. *Sci. Total Environ.* **2024**, *943*, 173813, doi:10.1016/j.scitotenv.2024.173813.
23. Fronczak, C.M.; Kim, E.D.; Barqawi, A.B. The insults of illicit drug use on male fertility. *J. Androl.* **2012**, *33*, 515–528, doi:10.2164/jandrol.110.011874.
24. Khaw, S.C.; Martins da Silva, S. From Bench to Babies – Drug Development for Male Subfertility. *Reprod. Fertil.* **2024**, *5*, doi:10.1530/raf-24-0022.
25. McLernon, D.J.; Lee, A.J.; Maheshwari, A.; Van Eekelen, R.; Van Geloven, N.; Putter, H.; Eijkemans, M.J.; Van Der Steeg, J.W.; Van Der Veen, F.; Steyerberg, E.W.; et al. Predicting the chances of having a baby with or without treatment at different time points in couples with unexplained subfertility. *Hum. Reprod.* **2019**, *34*, 1126–1138, doi:10.1093/humrep/dez049.
26. Wang, R.; Danhof, N.A.; Tjon-Kon-Fat, R.I.; Eijkemans, M.J.C.; Bossuyt, P.M.M.; Mochtar, M.H.; van der Veen, F.; Bhattacharya, S.; Mol, B.W.J.; van Wely, M. Interventions for unexplained infertility: A systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, *2019*, CD012692, doi:10.1002/14651858.CD012692.pub2.
27. Jones, A.; Sood, A.; Ahmed, M.; Modgil, V. The examination and investigation of the subfertile couple. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* **2022**, *32*, 77–82, doi:10.1016/j.ogrm.2022.03.001.

28. Garolla, A.; Pizzol, D.; Carosso, A.R.; Borini, A.; Ubaldi, F.M.; Calogero, A.E.; Ferlin, A.; Lanzone, A.; Tomei, F.; Engl, B.; et al. Practical Clinical and Diagnostic Pathway for the Investigation of the Infertile Couple. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *11*, 591837, doi:10.3389/fendo.2020.591837.
29. La Vignera, S.; Calogero, A.E.; Condorelli, R.A.; Vicari, L.O.; Catanuso, M.; D'Agata, R.; Vicari, E. Ultrasonographic evaluation of patients with male accessory gland infection. *Andrologia* **2012**, *44*, 26–31, doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01132.x.
30. Jarow, J.P. Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil. Steril.* **1993**, *60*, 1035–1039, doi:10.1016/S0015-0282(16)56406-1.
31. Foresta, C.; Varotto, A.; Scandellari, C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil. Steril.* **1992**, *57*, 858–865, doi:10.1016/S0015-0282(16)54971-1.
32. Chinta, P.; Rebekah, G.; T Kunjummen, A.; S. Kamath, M. Revisiting the role of serum progesterone as a test of ovulation in eumenorrheic subfertile women: a prospective diagnostic accuracy study. *Fertil. Steril.* **2020**, *114*, 1315–1321, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.06.030.
33. Hunter, W.M.; Edmond, P.; Watson, G.S.; McLean, N. Plasma LH and FSH levels in subfertile men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1974**, *39*, 740–749, doi:10.1210/jcem-39-4-740.
34. Armstrong, S.C.; Showell, M.; Stewart, E.A.; Rebar, R.W.; Vanderpoel, S.; Farquhar, C.M. Baseline anatomical assessment of the uterus and ovaries in infertile women: A systematic review of the evidence on which assessment methods are the safest and most effective in terms of improving fertility outcomes. *Hum. Reprod. Update* **2017**, *23*, 534–547, doi:10.1093/humupd/dmx019.
35. Arab, W. Diagnostic laparoscopy for unexplained subfertility: a comprehensive review. *J. Bras. Reprod. Assist.* **2022**, *26*, 145–152, doi:10.5935/1518-0557.20210084.
36. Scropo, F.I.; Mercuriali, A.; Kopa, Z.; Longhi, E.V. Male Infertility. In *Managing Psychosexual Consequences in Chronic Diseases*; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 209–225 ISBN 9783031313073.

37. Assidi, M. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* **2022**, *11*, 1711.
38. Carson, S.A.; Kallen, A.N. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2021**, *326*, 65–76, doi:10.1001/jama.2021.4788.
39. Huijben, M.; Huijsmans, R.L.N.; Lock, M.T.W.T.; de Kemp, V.F.; de Kort, L.M.O.; van Breda, J.H.M.K. Clomiphene citrate for male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* **2023**, *11*, 987–996, doi:10.1111/andr.13388.
40. Esteves, S.C.; Achermann, A.P.P.; Simoni, M.; Santi, D.; Casarini, L. Male infertility and gonadotropin treatment: What can we learn from real-world data? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2023**, *86*, 102310, doi:10.1016/j.bpobgyn.2022.102310.
41. Nestler, J.E. Metformin in the treatment of infertility in polycystic ovarian syndrome: an alternative perspective. *Fertil. Steril.* **2008**, *90*, 14–16, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.04.073.
42. Tulandi, T. The Evolution of Surgery for Infertility. *J. Obstet. Gynaecol. Canada* **2019**, *41*, S327–S329, doi:10.1016/j.jogc.2019.08.019.
43. Kasbe, M.N.; More, A.; Gajabe, G.; Jadhav, R.; Bachate, P.; Mehakar, S.; Tyagi, P. Fertility Challenges: The Complexities of Retrograde Ejaculation and Cornual Block in Reproductive Health. *Cureus* **2024**, *16*, e55523, doi:10.7759/cureus.55523.
44. Macer, M.L.; Taylor, H.S. Endometriosis and Infertility. A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **2012**, *39*, 535–549, doi:10.1016/j.ogc.2012.10.002.
45. Guo, X.C.; Segars, J.H. The Impact and Management of Fibroids for Fertility. An Evidence-Based Approach. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **2012**, *39*, 521–533, doi:10.1016/j.ogc.2012.09.005.
46. Halpern, J.A.; Brannigan, R.E.; Schlegel, P.N. Fertility-enhancing male reproductive surgery: glimpses into the past and thoughts for the future. *Fertil. Steril.* **2019**, *112*, 426–437, doi:10.1016/j.fertnstert.2019.06.022.

47. Kol, S. Assisted Reproductive Technology (ART). In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2014.
48. Huang, J.Y.J.; Rosenwaks, Z. In vitro fertilisation treatment and factors affecting success. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2012**, *26*, 777–788, doi:10.1016/j.bpobgyn.2012.08.017.
49. Cutting, E.; Horta, F.; Dang, V.; van Rumste, M.M.E.; Mol, B.W.J. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilisation in couples with males presenting with normal total sperm count and motility. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2023**, 2023, doi:10.1002/14651858.CD001301.pub2.
50. Aramesh, S.; Azizi Kutenae, M.; Najafi, F.; Ghaffari, P.; Taghavi, S.A. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) did not affect the fertility outcomes in women with unexplained infertility after intrauterine insemination: a randomised clinical trial. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. **2022**, *42*, 2480–2485, doi:10.1080/01443615.2022.2080534.
51. Edelstam, G.; Fredens, K.; Venge, P. Role of eosinophilic granulocytes in women with infertility and pelvic adhesions. *Inflammation* **1994**, *18*, 361–371, doi:10.1007/BF01534434.
52. Michailov, Y.; Abumadighem, A.; Lunenfeld, E.; Kapelushnik, J.; Huleihel, M. Granulocyte colony-stimulating factor restored impaired spermatogenesis and fertility in an aml-chemotherapy mice model. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11157, doi:10.3390/ijms222011157.
53. Asl, Z.A. The efficacy of systemic administration of granulocyte colony stimulating factor (GCSF) on the in vitro fertilization (IVF) success in women with repeated implantation failure. *Fertil. Steril.* **2015**, *104*, e61, doi:10.1016/j.fertnstert.2015.07.185.
54. Shibata, T.; Makinoda, S.; Waseda, T.; Tomizawa, H.; Fujii, R.; Utsunomiya, T. Granulocyte colony-stimulating factor as a potential inducer of ovulation in infertile women with luteinized unruptured follicle syndrome. *Transl. Res.* **2016**, *171*, 63–70, doi:10.1016/j.trsl.2015.10.003.

55. Fu, L. lu; Xu, Y.; Yan, J.; Zhang, X. ying; Li, D. dan; Zheng, L. wen Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor for infertility undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2023**, *21*, doi:10.1186/s12958-023-01063-z.
56. Kuru Pekcan, M.; Tokmak, A.; Ulubasoglu, H.; Kement, M.; Özakşit, G. The importance of infertility duration and follicle size according to pregnancy success in women undergoing ovulation induction with gonadotropins and intrauterine insemination. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore).* **2023**, *43*, doi:10.1080/01443615.2023.2173058.
57. Homer, H.A. The Role of Oocyte Quality in Explaining Unexplained Infertility. *Semin. Reprod. Med.* **2020**, *38*, 21–28, doi:10.1055/s-0040-1721377.
58. Orazov, M.R.; Radzinsky, V.Y.; Ivanov, I.I.; Khamoshina, M.B.; Shustova, V.B. Oocyte quality in women with infertility associated endometriosis. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**, *35*, 24–26, doi:10.1080/09513590.2019.1632088.
59. Egbert, J.R.; Fahey, P.G.; Reimer, J.; Owen, C.M.; Evsikov, A. V.; Nikolaev, V.O.; Griesbeck, O.; Ray, R.S.; Talias, A.S.; Jaffe, L.A. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone increase Ca²⁺ in the granulosa cells of mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **2019**, *101*, 433–444, doi:10.1093/biolre/ioz085.
60. Owen, C.M.; Jaffe, L.A. Luteinizing hormone stimulates ingression of mural granulosa cells within the mouse preovulatory follicle. *Biol. Reprod.* **2024**, *110*, 288–299, doi:10.1093/biolre/ioad142.
61. Harlow, C.R.; Bradshaw, A.C.; Rae, M.T.; Shearer, K.D.; Hillier, S.G. Oestrogen formation and connective tissue growth factor expression in rat granulosa cells. *J. Endocrinol.* **2007**, *192*, 41–52, doi:10.1677/joe.1.06689.
62. Zhang, X.; Zhang, W.; Wang, Z.; Zheng, N.; Yuan, F.; Li, B.; Li, X.; Deng, L.; Lin, M.; Chen, X.; et al. Enhanced glycolysis in granulosa cells promotes the activation of primordial follicles through mTOR signaling. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, doi:10.1038/s41419-022-04541-1.

63. Burnik Papler, T.; Vrtacnik Bokal, E.; Lovrecic, L.; Kopitar, A.N.; Maver, A. No Specific Gene Expression Signature in Human Granulosa and Cumulus Cells for Prediction of Oocyte Fertilisation and Embryo Implantation. *PLoS One* **2015**, *10*, e0115865, doi:10.1371/journal.pone.0115865.
64. Tremblay, P.G.; Sirard, M.A. Gene analysis of major signaling pathways regulated by gonadotropins in human ovarian granulosa tumor cells (KGN). *Biol. Reprod.* **2020**, *103*, 583–598, doi:10.1093/biolre/ioaa079.
65. Fuller, P.J.; Chu, S. Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, *15*, 122–128, doi:10.1016/j.tem.2004.02.005.
66. Li, L.; Shi, X.; Shi, Y.; Wang, Z. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 730196, doi:10.3389/fphys.2021.730196.
67. Fukuda, K.; Muraoka, M.; Kato, Y.; Saga, Y. Decoding the transcriptome of pre-granulosa cells during the formation of primordial follicles in the mouse. *Biol. Reprod.* **2021**, *105*, 179–191, doi:10.1093/biolre/ioab065.
68. TUPPER, C. Granulosa cell tumor. *N. S. Med. Bull.* **1947**, *26*, 212, doi:10.59779/jiomnepal.351.
69. Carabatsos, M.J.; Sellitto, C.; Goodenough, D.A.; Albertini, D.F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* **2000**, *226*, 167–179, doi:10.1006/dbio.2000.9863.
70. Alam, M.H.; Miyano, T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod. Med. Biol.* **2020**, *19*, 13–23.
71. Jozkowiak, M.; Hutchings, G.; Jankowski, M.; Kulcenty, K.; Mozdziak, P.; Kempisty, B.; Spaczynski, R.Z.; Piotrowska-Kempisty, H. The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs—A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. *Cells* **2020**, *9*, 1418, doi:10.3390/cells9061418.

72. Alberico, H.C.; Woods, D.C. Role of Granulosa Cells in the Aging Ovarian Landscape: A Focus on Mitochondrial and Metabolic Function. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 800739, doi:10.3389/fphys.2021.800739.
73. Eppig, J.J. Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R354–R356, doi:10.1016/j.cub.2018.03.005.
74. Schütz, L.F.; Batalha, I.M. Granulosa Cells: Central Regulators of Female Fertility. *Endocrines* **2024**, *5*, 547–565, doi:10.3390/endocrines5040040.
75. Cavalcanti, G.S.; Carvalho, K.C.; da Silva Ferreira, C.; Alvarez, P.A.C.; Monteleone, P.A.A.; Baracat, E.C.; Júnior, J.M.S. Granulosa cells and follicular development: a brief review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2023**, *69*, e20230175, doi:10.1590/1806-9282.20230175.
76. Gao, Y.; Zou, Y.; Wu, G.; Zheng, L. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of granulosa cells in polycystic ovarian syndrome. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1193749, doi:10.3389/fmed.2023.1193749.
77. Brązert, M.; Kranc, W.; Chermuła, B.; Kowalska, K.; Jankowski, M.; Celichowski, P.; Jeseta, M.; Piotrowska-Kempisty, H.; Pawelczyk, L.; Zabel, M.; et al. Human ovarian granulosa cells isolated during an ivf procedure exhibit differential expression of genes regulating cell division and mitotic spindle formation. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 2026, doi:10.3390/jcm8122026.
78. Zırh, S.; Erol, S.; Zırh, E.B.; Sokmensuer, L.K.; Bozdog, G.; Muftuoglu, S.F. A new isolation and culture method for granulosa cells. *Cell Tissue Bank.* **2021**, *22*, 719–726, doi:10.1007/s10561-021-09929-5.
79. Teh, A.P.P.; Izzati, U.Z.; Mori, K.; Fuke, N.; Hirai, T.; Kitahara, G.; Yamaguchi, R. Histological and immunohistochemical evaluation of granulosa cells during different stages of folliculogenesis in bovine ovaries. *Reprod. Domest. Anim.* **2018**, *53*, 569–581, doi:10.1111/rda.13132.
80. Elsherif, S.; Bourne, M.; Soule, E.; Lall, C.; Bhosale, P. Multimodality imaging and genomics of granulosa cell tumors. *Abdom. Radiol.* **2020**, *45*, 812–827, doi:10.1007/s00261-019-02172-3.

81. Khan, D.R.; Fournier, É.; Dufort, I.; Richard, F.J.; Singh, J.; Sirard, M.A. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis. *Reproduction* 2016, *151*, R103–R110.
82. Lan, C.-W.; Chen, M.-J.; Tai, K.-Y.; Yu, D.C.; Yang, Y.-C.; Jan, P.-S.; Yang, Y.-S.; Chen, H.-F.; Ho, H.-N. Functional microarray analysis of differentially expressed genes in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome related to MAPK/ERK signaling. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14994, doi:10.1038/srep14994.
83. Karligiotou, E.; Kollia, P.; Kallitsaris, A.; Messinis, I.E. Expression of human serum albumin (HSA) mRNA in human granulosa cells: Potential correlation of the 95 amino acid long carboxyl terminal of HSA to gonadotrophin surge-attenuating factor. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 645–650, doi:10.1093/humrep/dei374.
84. Shen, H.; Liang, Z.; Zheng, S.; Li, X. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies and RT-PCR validation in polycystic ovary syndrome. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 1385–1396, doi:10.3892/ijmm.2017.3146.
85. Olsen, K.W.; Castillo-Fernandez, J.; Chan, A.C.; la Cour Freiesleben, N.; Zedeler, A.; Bungum, M.; Cardona, A.; Perry, J.R.B.; Skouby, S.O.; Hoffmann, E.R.; et al. Identification of a unique epigenetic profile in women with diminished ovarian reserve. *Fertil. Steril.* **2021**, *115*, 732–741, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.09.009.
86. Olsen, K.W.; Castillo-Fernandez, J.; Zedeler, A.; Freiesleben, N.C.; Bungum, M.; Chan, A.C.; Cardona, A.; Perry, J.R.B.; Skouby, S.O.; Borup, R.; et al. A distinctive epigenetic ageing profile in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* **2020**, *35*, 1332–1345, doi:10.1093/humrep/deaa071.
87. Xu, M.; Li, F.; Xu, X.; Hu, N.; Miao, J.; Zhao, Y.; Ji, S.; Wang, Y.; Wang, L. Proteomic analysis reveals that cigarette smoke exposure diminishes ovarian reserve in mice by disrupting the CREB1-mediated ovarian granulosa cell proliferation-apoptosis balance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2024**, *271*, 115989, doi:10.1016/j.ecoenv.2024.115989.
88. Insenser, M.; Escobar-Morreale, H.F. Application of proteomics to the study of polycystic ovary syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* 2011, *34*, 869–875.

89. Yang, X.; Liu, P.; He, H.; Qi, D.; Yan, L. Comprehensive analysis of ovarian granulosa cell proteomics and phosphoproteomics in PCOS patients without insulin resistance. *Mol. Hum. Reprod.* **2024**, *30*, doi:10.1093/molehr/gaae005.
90. Zhang, Q.; Li, X.; Zhou, X.; Li, Y.; Zhang, J.; Zhang, X.; Liu, Y.; Chen, Y.; Wu, X.; Ma, L.; et al. Study of differential proteomics in granulosa cells of premature ovarian insufficiency (POI) and the roles and mechanism of RAC1 in granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2022**, *555*, 111719, doi:10.1016/j.mce.2022.111719.
91. Samanta, L.; Parida, R.; Dias, T.R.; Agarwal, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 41, doi:10.1186/s12958-018-0358-6.
92. Baştu, E.; Keskin, G.Ş.; Serdaroğlu, H. In vitro fertilizasyon’da güncel yaklaşımlar: Proteomikler, sekretomikler, metabolomikler ve in viro maturasyon. *Türk Jinekoloji ve Obstet. Dern. Derg.* **2013**, *10*, 1–8, doi:10.5505/tjod.2013.64497.
93. Jodar, M.; Soler-Ventura, A.; Oliva, R. Semen proteomics and male infertility. *J. Proteomics* **2017**, *162*, 125–134.
94. Gutiérrez, C.G.; Campbell, B.K.; Webb, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle- stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 608–616, doi:10.1095/biolreprod56.3.608.
95. Lin, Y.H.; Hwang, J.L.; Seow, K.M.; Huang, L.W.; Chen, H.J.; Tzeng, C.R. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **2009**, *19*, 165–170, doi:10.1016/S1472-6483(10)60068-5.
96. Cutting, E.; Horta, F.; Dang, V.; van Rumste, M.M.; Mol, B.W.J. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilisation in couples with males presenting with normal total sperm count and motility. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2023**, *2023*, doi:10.1002/14651858.CD001301.pub2.
97. Fu, D.; Lv, X.; Hua, G.; He, C.; Dong, J.; Lele, S.M.; Li, D.W.C.; Zhai, Q.; Davis, J.S.; Wang, C. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2014**, *21*, 297–310, doi:10.1530/ERC-13-0339.

98. Wang, C.; Lv, X.; Jiang, C.; Cordes, C.M.; Fu, L.; Lele, S.M.; Davis, J.S. Transforming Growth Factor Alpha (TGF α) Regulates Granulosa Cell Tumor (GCT) Cell Proliferation and Migration through Activation of Multiple Pathways. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0048299.
99. Hung, W.T.; Navakanitworakul, R.; Khan, T.; Zhang, P.; Davis, J.S.; McGinnis, L.K.; Christenson, L.K. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. *Biol. Reprod.* **2017**, *97*, 644–655, doi:10.1093/biolre/iox106.
100. BI, Y. lin; YANG, S. yan; WANG, H. yan; CHANG, G. bin; CHEN, G. hong Follicle-stimulating hormone is expressed in ovarian follicles of chickens and promotes ovarian granulosa cell proliferation. *J. Integr. Agric.* **2021**, *20*, 2749–2757, doi:10.1016/S2095-3119(21)63606-7.
101. Basini, G.; Grasselli, F.; Quintavalla, F.; Bussolati, S.; Andreoli, V.; Carrillo Heredero, A.M.; Bertini, S. Redox Status, Estrogen and Progesterone Production by Swine Granulosa Cells Are Impaired by Triclosan. *Animals* **2022**, *12*, 3559, doi:10.3390/ani12243559.
102. Greisen, S.; Ledet, T.; Ovesen, P. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 2061–2065, doi:10.1093/humrep/16.10.2061.
103. Hong, S.H.; Lee, J.E.; An, S.M.; Shin, Y.Y.; Hwang, D.Y.; Yang, S.Y.; Cho, S.K.; An, B.S. Effect of vitamin d3 on biosynthesis of estrogen in porcine granulosa cells via modulation of steroidogenic enzymes. *Toxicol. Res.* **2017**, *33*, 49–54, doi:10.5487/TR.2017.33.1.049.
104. Perlman, S.; Bouquin, T.; van den Hazel, B.; Jensen, T.H.; Schambye, H.T.; Knudsen, S.; Okkels, J.S. Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes. *Mol. Hum. Reprod.* **2006**, *12*, 135–144, doi:10.1093/molehr/gah247.

105. Sperduti, S.; Paradiso, E.; Anzivino, C.; Lazzaretti, C.; Limoncella, S.; D'Alessandro, S.; Roy, N.; Reggianini, F.; Ferrari, T.; Melli, B.; et al. LH increases the response to FSH in granulosa-lutein cells from sub/poor-responder patients in vitro. *Hum. Reprod.* **2023**, *38*, 103–112, doi:10.1093/humrep/deac246.
106. Sun, P.; Zhang, Y.; Sun, L.; Sun, N.; Wang, J.; Ma, H. Kisspeptin regulates the proliferation and apoptosis of ovary granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/AKT/ERK signalling pathway. *BMC Womens. Health* **2023**, *23*, doi:10.1186/s12905-022-02154-6.
107. Shen, M.; Li, T.; Feng, Y.; Wu, P.; Serrano, B.R.; Barcenas, A.R.; Qu, L.; Zhao, W. Effects of quercetin on granulosa cells from prehierarchical follicles by modulating MAPK signaling pathway in chicken. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, doi:10.1016/j.psj.2023.102736.
108. Cheng, J.C.; Fang, L.; Yan, Y.; He, J.; Guo, Y.; Jia, Q.; Gao, Y.; Han, X.; Sun, Y.P. TGF- β 1 stimulates aromatase expression and estradiol production through SMAD2 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa-lutein cells. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 6619–6629, doi:10.1002/jcp.30305.
109. Knight, P.G.; Glister, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* **2001**, *121*, 503–512.
110. Ferrero, H.; Delgado-Rosas, F.; Garcia-Pascual, C.M.; Monterde, M.; Zimmermann, R.C.; Simn, C.; Pellicer, A.; Gmez, R. Efficiency and purity provided by the existing Methods for the isolation of luteinized granulosa cells: A comparative study. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 1781–1789, doi:10.1093/humrep/des096.
111. Babayev, E.; Xu, M.; Shea, L.D.; Woodruff, T.K.; Duncan, F.E. Follicle isolation methods reveal plasticity of granulosa cell steroidogenic capacity during mouse in vitro follicle growth. *Mol. Hum. Reprod.* **2022**, *28*, doi:10.1093/molehr/gaac033.
112. Han, Y.; Gao, G.; Li, S.; Xiao, N.; Zhang, Y.; Luo, H. Development of an optimal protocol for isolation and purification of human granulosa cells in patients with different ovarian reserves. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, doi:10.3892/etm.2021.10370.

113. Chilvers, R.A.; Bodenbunrg, Y.H.; Denner, L.A.; Urban, R.J. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2012**, *29*, 547–556, doi:10.1007/s10815-012-9739-5.
114. Raad, G.; Bazzi, M.; Tanios, J.; Mourad, Y.; Azouri, J.; Azouri, J.; Fakih, C. Optimization of the cell aggregates method for isolation and purification of human granulosa cells from follicular fluid. *Int. J. Fertil. Steril.* **2020**, *13*, 339–345, doi:10.22074/ijfs.2020.5790.
115. Aghadavod, E.; Zarghami, N.; Farzadi, L.; Zare, M.; Barzegari, A.; Movassaghpour, A.; Nouri, M. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Adv. Biomed. Res.* **2015**, *4*, 250, doi:10.4103/2277-9175.170675.
116. Vanacker, J.; Camboni, A.; Dath, C.; Van Langendonck, A.; Dolmans, M.M.; Donnez, J.; Amorim, C.A. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: Protocol for application in a clinical setting. *Fertil. Steril.* **2011**, *96*, doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.075.
117. Newton, H.; Picton, H.; Gosden, R.G. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J. Reprod. Fertil.* **1999**, *115*, 141–150, doi:10.1530/jrf.0.1150141.
118. Pietrowski, D.; Mladek, R.; Frank, M.; Erber, J.; Marschalek, J.; Schneeberger, C. Analyses of human granulosa cell vitality by fluorescence activated cell sorting after rapid cooling. *Hum. Fertil.* **2022**, *25*, 478–486, doi:10.1080/14647273.2020.1817578.
119. Baig, N.; Kammakakam, I.; Falath, W.; Kammakakam, I. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater. Adv.* **2021**, *2*, 1821–1871.
120. Pirzada, M.; Altintas, Z. Nanomaterials for healthcare biosensing applications. *Sensors (Switzerland)* **2019**, *19*.
121. Paramasivam, G.; Palem, V.V.; Sundaram, T.; Sundaram, V.; Kishore, S.C.; Bellucci, S. Nanomaterials: Synthesis and applications in theranostics. *Nanomaterials* **2021**, *11*.

122. Mekuye, B.; Abera, B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Sel.* **2023**, *4*, 486–501, doi:10.1002/nano.202300038.
123. Yılmaz, G.E.; Göktürk, I.; Ovezova, M.; Yılmaz, F.; Kılıç, S.; Denizli, A. Antimicrobial Nanomaterials: A Review. *Hygiene* **2023**, *3*, 269–290, doi:10.3390/hygiene3030020.
124. Čitaković, N. Physical properties of nanomaterials. *Vojnoteh. Glas.* **2019**, *67*, 159–171, doi:10.5937/vojtehg67-18251.
125. Paliy, A.P.; Kovalenko, L. V.; Romanko, M.Y.; Stegnyy, M.Y.; Kolchyk, O. V.; Zavgorodniy, A.I.; Kornieikov, O.M. Biological properties of nanomaterials (literature review). *J. Vet. Med. Biotechnol. Biosaf.* **2023**, *9*, 20–30, doi:10.36016/jvmbbs-2023-9-1-2-4.
126. Albanese, A.; Tang, P.S.; Chan, W.C.W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1–16.
127. Sajid, M. Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2022**, *25*, 100319, doi:10.1016/j.coesh.2021.100319.
128. Gul, S.; Khan, S.B.; Rehman, I.U.; Khan, M.A.; Khan, M.I. A Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics. *Front. Mater.* **2019**, *6*, doi:10.3389/fmats.2019.00179.
129. Ahmadi, M.; Ghoorchian, A.; Dashtian, K.; Kamalabadi, M.; Madrakian, T.; Afkhami, A. Application of magnetic nanomaterials in electroanalytical methods: A review. *Talanta* **2021**, *225*, 121974, doi:10.1016/j.talanta.2020.121974.
130. Mukherjee, S.; Liang, L.; Veisheh, O. Recent Advancements of Magnetic Nanomaterials in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 147, doi:10.3390/pharmaceutics12020147.
131. Materón, E.M.; Miyazaki, C.M.; Carr, O.; Joshi, N.; Picciani, P.H.S.; Dalmaschio, C.J.; Davis, F.; Shimizu, F.M. Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **2021**, *6*, 100163, doi:10.1016/j.apsadv.2021.100163.

132. Tartaj, P.; Morales, M. a del P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carretero, T.; Serna, C.J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *36*, R182–R197, doi:10.1088/0022-3727/36/13/202.
133. Coene, A.; Leliaert, J. Magnetic nanoparticles in theranostic applications. *J. Appl. Phys.* **2022**, *131*, doi:10.1063/5.0085202.
134. Ansari, K.; Ahmad, R.; Tanweer, M.S.; Azam, I. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles as a Tool for the Advancement of Biomedical and Environmental Application: A Review. *Biomed. Mater. Devices* **2024**, *2*, 139–157.
135. Flores-Rojas, G.G.; López-Saucedo, F.; Vera-Graziano, R.; Mendizabal, E.; Bucio, E. Magnetic Nanoparticles for Medical Applications: Updated Review. *Macromol* **2022**, *2*, 374–390.
136. Tang, S.C.N.; Lo, I.M.C. Magnetic nanoparticles: Essential factors for sustainable environmental applications. *Water Res.* **2013**, *47*, 2613–2632.
137. Nadoll, P.; Angerer, T.; Mauk, J.L.; French, D.; Walshe, J. The chemistry of hydrothermal magnetite: A review. *Ore Geol. Rev.* **2014**, *61*, 1–32.
138. Niculescu, A.-G.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M. Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods* **2022**, *199*, 16–27, doi:10.1016/j.ymeth.2021.04.018.
139. Koo, K.N.; Ismail, A.F.; Othman, M.H.D.; Rahman, M.A.; Sheng, T.Z. Preparation and characterization of superparamagnetic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles: A short review. *Malaysian J. Fundam. Appl. Sci.* **2019**, *15*, 23–31, doi:10.11113/mjfas.v15n2019.1224.
140. Tukan, D.N.; Rosmainar, L.; Kustomo, K.; Rasidah, R. A Review: Optimum Conditions for Magnetite Synthesis (Fe₃O₄). *J. Berk. Ilm. Sains dan Terap. Kim.* **2023**, *17*, 15, doi:10.20527/jstk.v17i2.15134.
141. Ganapathe, L.S.; Mohamed, M.A.; Yunus, R.M.; Berhanuddin, D.D. Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in biomedical application: From synthesis to surface functionalisation. *Magnetochemistry* **2020**, *6*, 1–35.

142. Wallyn, J.; Anton, N.; Vandamme, T.F. Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications—A Review. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 601, doi:10.3390/pharmaceutics11110601.
143. Karatapanis, A.E.; Fiamegos, Y.; Stalikas, C.D. Silica-modified magnetic nanoparticles functionalized with cetylpyridinium bromide for the preconcentration of metals after complexation with 8-hydroxyquinoline. *Talanta* **2011**, *84*, 834–839, doi:10.1016/j.talanta.2011.02.013.
144. Lee, Y.; Lee, H.; Kim, Y.B.; Kim, J.; Hyeon, T.; Park, H.; Messersmith, P.B.; Park, T.G. Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4154–4157, doi:10.1002/adma.200800756.
145. Kasouni, A.I.; Chatzimitakos, T.G.; Stalikas, C.D.; Trangas, T.; Papoudou-Bai, A.; Troganis, A.N. The Unexplored Wound Healing Activity of *Urtica dioica* L. Extract: An In Vitro and In Vivo Study. *Molecules* **2021**, *26*, 6248, doi:10.3390/molecules26206248.
146. BØYUM, A. Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scand. J. Immunol.* **1976**, *5*, 9–15, doi:10.1111/j.1365-3083.1976.tb03851.x.
147. Stoia, M.; Istrate, R.; Păcurariu, C. Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2016**, *125*, 1185–1198, doi:10.1007/s10973-016-5393-y.
148. Manju, S.; Sreenivasan, K. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *359*, 318–325, doi:10.1016/j.jcis.2011.03.071.
149. Vasi, A.M.; Popa, M.I.; Butnaru, M.; Dodi, G.; Verestiuc, L. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *38*, doi:10.1016/j.msec.2014.01.052.

150. Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Benkirane-Jessel, N.; Raehm, L.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Hyaluronic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy of cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2012**, *9*, 256–260, doi:10.1016/j.pdpdt.2011.12.010.
151. Nairi, V.; Magnolia, S.; Piludu, M.; Nieddu, M.; Caria, C.A.; Sogos, V.; Vallet-Regì, M.; Monduzzi, M.; Salis, A. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with hyaluronic acid. Effect of the biopolymer chain length on cell internalization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *168*, 50–59, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.02.019.
152. Ma, M.; Chen, H.; Chen, Y.; Zhang, K.; Wang, X.; Cui, X.; Shi, J. Hyaluronic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles: Excellent colloidal dispersity in physiological fluids and targeting efficacy. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 5615–5621, doi:10.1039/c2jm15489g.
153. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)*. **2008**, *53*, 397–411, doi:10.17221/1930-VETMED.
154. Tavianatou, A.G.; Caon, I.; Franchi, M.; Piperigkou, Z.; Galesso, D.; Karamanos, N.K. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J.* 2019, *286*.
155. Zhong, L.; Liu, Y.; Xu, L.; Li, Q.; Zhao, D.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, H.; Kan, Q.; Sun, J.; et al. Exploring the relationship of hyaluronic acid molecular weight and active targeting efficiency for designing hyaluronic acid-modified nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* **2019**, *14*, 521–530, doi:10.1016/j.ajps.2018.11.002.
156. Chiesa, E.; Greco, A.; Riva, F.; Dorati, R.; Conti, B.; Modena, T.; Genta, I. CD44-Targeted Carriers: The Role of Molecular Weight of Hyaluronic Acid in the Uptake of Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 103, doi:10.3390/ph15010103.
157. Mazzucco, A. Hyaluronic Acid: Evaluation of Efficacy with Different Molecular Weights. *Int. J. Chem. Res.* **2019**, *1*, 13–18, doi:10.18689/ijcr-1000103.

158. Cyphert, J.M.; Trempus, C.S.; Garantziotis, S. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 2015.
159. Jordan, A.R.; Racine, R.R.; Hennig, M.J.P.; Lokeshwar, V.B. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00182.
160. Kaneko, T.; Saito, H.; Toya, M.; Satio, T.; Nakahara, K.; Hiroi, M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2000**, *17*, 162–167, doi:10.1023/A:1009470206468.
161. Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 1213–1221, doi:10.2174/1389201017666160808160513.
162. Sinclair, L. V.; Barthelemy, C.; Cantrell, D.A. Single Cell Glucose Uptake Assays: A Cautionary Tale. *Immunometabolism* **2020**, *2*, doi:10.20900/immunometab20200029.

