ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ & ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΉ ΙΑΤΡΙΚΉ»

Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη της έκφρασης των ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης Bcl-2, Bax σε κοκκώδη κύτταρα υπογόνιμων γυναικών: Συσχέτιση του λόγου Bcl-2/Bax με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης».

ΜΑΤΖΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρική Σχολή Αθηνών

Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Γ.Ν.Α «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ & ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διπλωματική Εργασία με θέμα:

«Μελέτη της έκφρασης των ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης Bcl-2, Bax σε κοκκώδη κύτταρα υπογόνιμων γυναικών: Συσχέτιση του λόγου Bcl-2/Bax με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης».

Επιβλέπων καθηγητής:

κ. Δρακάκης Πέτρος

Ματζάκου Ιωάννα

Αθήνα, Νοέμβριος 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας στο Εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με θέμα «Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική» .

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Διευθυντή της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Δημήτριο Λουτράδη και τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Πέτρο Δρακάκη που επιλέγοντάς με στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα μου έδωσαν την ευκαιρία να εμπλουτίσω τόσο το γνωστικό, όσο και το εργαστηριακό μου υπόβαθρο και να εξελιχθώ σαν άνθρωπος και σαν επιστήμονας. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα αποτελούν πολύτιμο εφόδιο στην μελλοντική επιστημονική μου διαδρομή.

Ευχαριστώ θερμά την Κλινική Εμβρυολόγο και Μοριακή Βιολόγο, κ. Δέσποινα Μαυρογιάννη για την επιστημονική καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της, καθώς και την συνεχή ενθάρρυνση και εμπιστοσύνη της προς εμένα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας, αλλά και της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την μεταλαμπάδευση της εργαστηριακής της εμπειρίας, για το συνεχές ενδιαφέρον και για την άμεση ανταπόκρισή της σε κάθε εργαστηριακό μου προβληματισμό.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Ράμι Ραουάσντε για το αμείωτο ενδιαφέρον, την εποικοδομητική κριτική και την συνεχή βοήθειά του σε όποια δυσκολία αντιμετώπισα στο πειραματικό και στο συγγραφικό μέρος. Τον ευχαριστώ θερμά για την άριστη συνεργασία, την άψογη συνεννόηση και για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε για την εργασία από την αρχή έως και την ολοκλήρωσή της.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον Κλινικό Εμβρυολόγο και Διευθυντή του Εμβρυολογικού Εργαστηρίου της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής ΜΗΤΕΡΑ κ. Τριαντάφυλλο Τριανταφύλλου, που μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω για πρώτη φορά σε επαφή με το εμβρυολογικό εργαστήριο και πίστεψε σε εμένα από την πρώτη στιγμή. Με την επιστημονική του καθοδήγηση, την ανιδιοτελή μετάδοση των γνώσεων και της εμπειρίας του, αλλά και το ειλικρινές ενδιαφέρον του για το έργο που επιτελεί με ενέπνευσε και με εμπνέει καθημερινά να προσπαθώ για το καλύτερο.

Τέλος, οφείλω τις θερμότερες ευχαριστίες στους γονείς μου και στην αδερφή μου για την αμέριστη ψυχολογική υποστήριξη που ανέκαθεν μου προσφέρουν. Η ουσιαστική τους παρουσία στη ζωή μου και η πραγματική τους πίστη στις ικανότητές μου αποτελούν τη βασικότερη πηγή αισιοδοξίας και δύναμης για την επίτευξη κάθε δύσκολου στόχου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

2.1. ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

2.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΪΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

2.2. ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΓΟΝΑΔΩΝ

2.3. ΩΟΓΕΝΕΣΗ

2.4. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

2.5. ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ ΚΑΙ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

3. ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

3.1. ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗ – ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΦΑΣΗ

3.2. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ – ΩΟΡΡΗΚΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

3.3. ΩΧΡΙΝΙΚΗ – ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

4. ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

4.1.ΡΟΛΟΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

4.2. ΡΟΛΟΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

4.3. ΡΟΛΟΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ -ΥΠΟΘΕΣΗ «ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΔΥΟ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ»

4.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΚΗΣ

4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

4.6. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΧΗ ΤΟΥ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

4.7. ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

5. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

5.1. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ - ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

5.2. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ - ΑΠΟΠΤΩΣΗ

6. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

6.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

6.2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BCL-2

6.3. ΔΟΜΗ BCL-2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

6.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ BCL2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

6.5. ΓΟΝΙΔΙΟ BCL-2 (B-CELL LYMPHOMA GENE NUMBER 2)

6.6. ΓΟΝΙΔΙΟ BAX (BCL2-ASSOCIATED X)

6.7. ΈΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BCL2 ΚΑΙ BAX ΣΤΟ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΜΒΡΥΟ

6.8. BCL2, BAX ΚΑΙ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ – ΈΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

6.9. ΝΕΟΤΕΡΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ BCL-2

6.10. BCL-2 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

3. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)

5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γονιμότητα αποτελούσε ανέκαθεν θέμα ιδιαίτερης σημασίας για το άτομο και την ομάδα στην οποία αυτό εντάσσεται. Σήμερα, η ανθρώπινη αναπαραγωγή μελετάται ευρύτατα, καθώς ολοένα και περισσότερα ζευγάρια αντιμετωπίζουν κάποιας μορφής δυσχέρεια στην προσπάθεια απόκτησης απογόνων. Η υπογονιμότητα και η ακούσια ατεκνία αποτελούν μια σύγχρονη και ιδιαιτέρως συχνή διαταραχή της υγείας, η οποία χρήζει αντιμετώπισης και καταπολεμείται αποτελεσματικά μέσω της διαρκώς εξελισσόμενης υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Στην παρούσα μελέτη, η διερεύνηση της ανθρώπινης υπογονιμότητας εστιάζεται στη γυναίκα. Βασική αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης είναι το ωοθυλάκιο, το οποίο ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται απαρτίζεται από διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, ο θηλυκός γαμέτης, το ωοκύτταρο, περιβάλλεται από τα κοκκώδη κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη δομή, φέρουν ορμονικούς υποδοχείς και επηρεάζουν καθοριστικά την ωρίμανση του ωοκυττάρου και την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Τα κοκκώδη κύτταρα που άπτονται του ωοκυττάρου, καθώς και τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παραμένουν προσκολλημένα στο ωοκύτταρο ακόμη και μετά την ωοθυλακιορρηξία. Η αμφίδρομη επικοινωνία που αναπτύσσεται μεταξύ κοκκωδών και ωοκυττάρου επηρεάζει σημαντικά την τύχη του θηλυκού γαμέτη.

Πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στην γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων, με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και συσχετίζονται με το αναπτυξιακό δυναμικό και τη γονιμοποιητική ικανότητα των ωοκυττάρων.

Τα γονίδια Bcl-2 και Bax ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 και εμπλέκονται στην ρύθμιση της απόπτωσης, συμμετέχοντας στο εσωτερικό/μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Ο λόγος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης BCL-2 προς τα επίπεδα έκφρασης της BAX (BCL-2/BAX) είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς η αύξησή του εκφράζει την ροπή του κυττάρου προς τη ζωή, ενώ η μείωσή του τη ροπή του κυττάρου προς το θάνατο.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων Bcl-2 και Bax σε κοκκώδη κύτταρα γυναικών που προσπαθούν να επιτύχουν εγκυμοσύνη μέσω υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η αρχική πειραματική υπόθεση συνοψίζεται στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του λόγου BCL-2/BAX και της ηλικίας της γυναίκας, του ποσοστού γονιμοποίησης και του ποσοστού των εμβρύων που προχώρησαν στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Η μελέτη των ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία δεν οδήγησε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που προχώρησαν στο στάδιο βλαστοκύστης. Ασφαλέστερα συμπεράσματα θα μπορούσαν πιθανόν να εξαχθούν εάν το δείγμα των γυναικών που συμμετείχαν στην έρευνα ήταν μεγαλύτερο. Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης και άλλων πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας θα βοηθούσε στην καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών και της τελικής επιρροής τους στο σήμα του αποπτωτικού

θανάτου. Η διασφάλιση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας BCL-2 στα κοκκώδη κύτταρα και των ποσοστών γονιμοποίησης, ποιότητας των εμβρύων και εμφύτευσης θα καθιστούσε τα γονίδια αυτά μοριακούς δείκτες με υψηλή προγνωστική σημασία, ικανούς να συμβάλλουν στην πιο αποτελεσματική και εξατομικευμένη αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.

ABSTRACT

Fertility has always been a matter of exceptional significance for the individuals and the wider group they belong to. Nowadays, human reproduction has been widely studied, as more and more couples that intend a pregnancy deal with some form of difficulty in having a child. Subfertility generally describes any form of reduced fertility with prolonged time of unwanted non-conception and is without doubt a disease of reproductive system that should be treated medically. Assisted reproductive technology is a constantly developing field and the most effective treatment of subfertility.

In the present study the research on human reproduction focuses on the female reproductive system. The basic reproductive unit of the ovary is the follicle, which contains an oocyte surrounded by granulosa and theca cells. Granulosa cells are actively differentiating with several distinct populations during folliculogenesis. The oocyte in the Graafian follicle is surrounded by tightly packed layers of cumulus cells, forming the cumulus-oocyte complex. The communication between cumulus cells and oocyte is bi-directional and controls oocyte maturation and follicle development.

Numerous research studies focus on the predictive role of gene expression in cumulus cells. Their main goal is to identify gene-markers that may be added to the morphological evaluation of an individual oocyte to improve the efficiency of predicting its developmental competence. Such prognostic value would increase the chance of a pregnancy.

BCL-2 and BAX proteins are members of the BCL-2 family of proteins. The primary role of BCL-2 family members is the regulation of apoptosis by taking part in the intrinsic/mitochondrial pathway. The Bcl-2 to Bax interaction represents one endogenous regulator of death, as the ratio of BCL-2 to BAX determines survival or death, following an apoptotic stimulus.

In the present study we investigate the association between the ratio BCL-2/BAX in cumulus cells of women undergoing IVF/ICSI and the age of women, fertilization rates and blastulation rate. The initial hypothesis was that there is a statistically significant association among these parameters. However, the results do not support our hypothesis.

Undoubtedly, further investigation should be done in order to conclude to results of greater significance. An increase in the number of the patients that participate in the research could lead to a more evaluable result. Apart from that, a better understanding of the way other BCL-2 family members express could clarify the way in which the protein-members interact and how this interaction regulates apoptosis. Securing the existence of an evaluable correlation between BCL-2/BAX ratio and fertilization/blastulation rates, could establish Bcl-2 and Bax genes as non-invasive biomarkers, predictive of the IVF outcome. Thus, subfertility could be treated in a more personalized, efficient and cost-effective way.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

1 . ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η γονιμότητα αποτελούσε, ανέκαθεν, ένα θέμα ιδιαίτερης σημασίας. Υπό το πρίσμα της Φυσικής Επιλογής, αποτελεί το μέσο επιβίωσης του ισχυρότερου. Γονιμότητα, αναπαραγωγή και δημιουργία απογόνων συνεπάγονται επιβίωση των καλύτερα προσαρμοσμένων ατόμων, των ατόμων με τα πιο ευνοϊκά για τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες γονίδια. Οι λιγότερο προσαρμοσμένοι οργανισμοί, δεν αναπαράγονται ή αναπαράγονται με βραδύτερους ρυθμούς, με αποτέλεσμα τα «ισχυρά γονίδια» εν τέλει να επικρατούν. Παρότι, η θεωρία της Φυσικής Επιλογής διατυπώθηκε επίσημα από τον Κάρολο Δαρβίνο το 1858, οι πρώτες ανθρώπινες αναφορές στην γονιμότητα φαίνεται να χρονολογούνται στην περίοδο 24.000-22.000 π.Χ. Συγκεκριμένα, η πρώτη αναφορά στην ανθρώπινη γονιμότητα είναι η "Αφροδίτη του Willendorf", το αρχαιότερο γνωστό αγαλματίδιο της Παλαιολιθικής Εποχής που αναπαριστά μια έγκυο γυναίκα. Βρέθηκε στο χωριό Willendorf της Αυστρίας το 1908 και πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν πως απεικονίζει κάποια θεότητα της γονιμότητας. Αδιαμφισβήτητα, λοιπόν, η γονιμότητα είχε ανέκαθεν σημασία για το ίδιο το άτομο και για την κοινωνία στην οποία αυτό εντάσσεται.

***Εικόνα 1**. Αγαλματίδιο της Αφροδίτης του Willendorf.*

Στις μέρες μας, η ανθρώπινη αναπαραγωγή αποτελεί έναν κλάδο ιδιαίτερα μελετημένο και ραγδαία εξελισσόμενο. Η έρευνα στο πεδίο της αναπαραγωγικής υγείας τόσο της γυναίκας, όσο και του άντρα περιλαμβάνει την μελέτη όλων εκείνων των διαταραχών και των παραγόντων που επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος των ατόμων.

Ο Karl Menninger, περίφημος Αμερικάνος ψυχίατρος, είχε δώσει από την σκοπιά του τον πιο αποφθεγματικό ορισμό της υγείας: «**Υγεία** είναι η ικανότητα προσαρμογής των ανθρώπων στον κόσμο και στην κοινωνία, επιτυγχάνοντας το μέγιστο της λειτουργικότητας και της χαράς». Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO: World Health Organization) **η υγεία** είναι μια κατάσταση πλήρους σωματικής, ψυχικής και κοινωνικής ευεξίας και όχι απλώς η απουσία νόσου ή αναπηρίας: «*Health is a state of complete physical,*

mental and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity». Υπό αυτήν την έννοια, η ακούσια ατεκνία εντάσσεται στον ορισμό, αποτελεί διαταραχή της υγείας και χρήζει αντιμετώπισης.

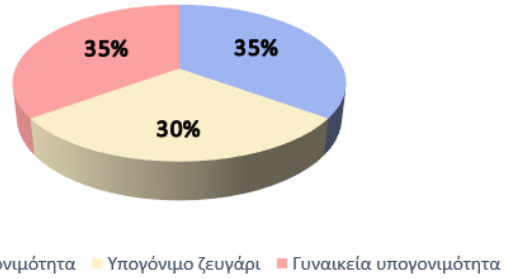
Ως **υπογονιμότητα** ορίζεται, βάσει του WHO, «η πάθηση του αναπαραγωγικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από την αδυναμία επίτευξης κλινικής κύησης έπειτα από τουλάχιστον 12 μήνες τακτικών σεξουαλικών επαφών, χωρίς αντισυλληπτική προστασία». Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να συγχέεται με την «στειρότητα», που αποτελεί την απόλυτη βιολογική αδυναμία τεκνοποίησης. Υπολογίζεται ότι το 15% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει κάποιας μορφής δυσχέρεια στην προσπάθειά του να αποκτήσει απογόνους. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του 2010, πάνω από 48 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως αδυνατούν να φέρουν εις πέρας μια φυσιολογική εγκυμοσύνη. Αδιαμφισβήτητα, λοιπόν, η υπογονιμότητα είναι ένα πρόβλημα της εποχής μας, το οποίο ακολουθεί εκθετική τάση αύξησης.

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως **πρωτοπαθής**, όταν το ζευγάρι δεν έχει επιτύχει ποτέ εγκυμοσύνη στο παρελθόν και ως **δευτεροπαθής,** όταν ένα τουλάχιστον μέλος του ζευγαριού έχει ήδη επιτύχει εγκυμοσύνη στο παρελθόν

Ένας εύκολος τρόπος αξιολόγησης του επιπέδου γονιμότητας του πληθυσμού βασίζεται στον δείκτη TFR (Total Fertility Rate). Στην Ελλάδα υπολογίζεται με βάση τον δείκτη αυτό, ότι το ολικό ποσοστό γονιμότητας είναι 1,43 παιδιά ανά γυναίκα. Ο αριθμός αυτός μεταφράζεται σε τάση γήρανσης του πληθυσμού και μείωσης του μεγέθους του και συμφωνεί με την σύγχρονο πρόβλημα της υπογεννητικότητας και γήρανσης του πληθυσμού που χαρακτηρίζουν τις τελευταίες δεκαετίες.

Αίτια υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα ενός ζευγαριού μπορεί να οφείλεται στη σύντροφο (περίπου κατά 35%), στον σύντροφο (περίπου κατά 35%), ή και στους δύο (μικτή αιτιολογία). Παρότι, λοιπόν, στο παρελθόν η ευθύνη βάραινε κατά βάσιν τη γυναίκα, σήμερα ο ανδρικός παράγοντας θεωρείται εξίσου σημαντικός.



Ο ακριβής επιδημιολογικός προσδιορισμός των αιτίων υπογονιμότητας ποικίλλει ανά πληθυσμό, χώρα και βιοτικό επίπεδο. Ωστόσο, συνήθη αίτια υπογονιμότητας αποτελούν:

- **Διαταραχές σπέρματος**: Άτυπος αριθμός, κινητικότητα ή μορφολογία σπερματοζωαρίων περιγράφονται με έναν από τους επόμενους όρους:
  - <u>ασπερμία</u> (απουσία υλικού μετά την εκσπερμάτιση)
  - <u>αζωοσπερμία</u> (απουσία σπερματοζωαρίων στο δείγμα)

- κρυπτοζωοσπερμία (παρουσία ελάχιστων σπερματοζωαρίων στο δείγμα)
- υποσπερμία (χαμηλός όγκος σπέρματος)
- ολιγοσπερμία (αριθμός σπερματοζωαρίων μικρότερος από 39 εκατομμύρια)
- ασθενοσπερμία (χαμηλό ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων)
- τερατοσπερμία (υψηλό ποσοστό μορφολογικά ανώμαλων σπερματοζωαρίων)

Πρόβλημα μπορεί να δημιουργήσει και η παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων, ο κατακερματισμός του DNA (DNA fragmentation), η παρουσία λοιμώξεων, φλεγμονών ή γενετικών παθήσεων (κυστική ίνωση, σύνδρομο Klinefelter, μικροελλείμματα του Y χρωμοσώματος), αλλά και οι διαταραχές κατά την εκσπερμάτιση.

- **Παθήσεις των σαλπίγγων**: απόφραξη, υδροσάλπιγγα, συμφύσεις, χλαμυδιακές και άλλες λοιμώξεις, φλεγμονές κ.λπ.

- **Παθήσεις του τραχήλου** και μη επιτρεπτική ανοσολογική λειτουργία της τραχηλικής βλέννας (παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων).

- **Παθήσεις της μήτρας**: συγγενείς δυσπλασίες, ενδομητρικές συμφύσεις, πολύποδες, ινομυώματα, φλεγμονές, λοιμώξεις κ.λπ και **παθήσεις του ενδομητρίου**: ενδομητρίτιδα, εκτεταμένες ανατομικές βλάβες από προηγούμενες επεμβάσεις, π.χ. αμβλώσεις.

- **Ενδομητρίωση.**

- Αυ**ξημένη ηλικία της γυναίκας**.

- **Πρόωρη εμμηνόπαυση.**

- **Πτωχή απάντηση στις γοναδοτροπίνες.**

- **Τρόπος ζωής:** κάπνισμα, αλκοολισμός, χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών, έκθεση σε τοξικό εργασιακό περιβάλλον.

- **Σπάνια γενετικά αίτια.**

- **Ανεξήγητη αιτιολογία:** (ιδιοπαθής υπογονιμότητα), σε σημαντικό ποσοστό (25-30%) των περιπτώσεων.

Η διερεύνηση και η διάγνωση της υπογονιμότητας περιλαμβάνει τη λήψη λεπτομερούς ιστορικού, την κλινική εξέταση αμφότερων των μελών του ζευγαριού και τη διενέργεια μιας σειράς διαγνωστικών εξετάσεων, προκειμένου να προσδιοριστεί με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια το αίτιο υπογονιμότητας. Η ορθή διάγνωση επηρεάζει, όπως είναι σαφές, και την αποτελεσματικότητα της εξατομικευμένης αντιμετώπισης που θα προταθεί στο ζευγάρι από τον θεράποντα ιατρό.

2.1. ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART: Assisted Reproduction Technology) αποτελεί την πιο αποτελεσματική θεραπεία της υπογονιμότητας και έναν κλάδο που στις μέρες μας ανθίζει και εξελίσσεται διαρκώς. Περιλαμβάνει ένα σύνολο τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση, τη διάγνωση και την καταπολέμηση της υπογονιμότητας.

Το 1978 ανακοινώθηκε από την ομάδα των Patrick Steptoe και Robert G. Edwards η γέννηση του πρώτου παιδιού από εξωσωματική γονιμοποίηση. Η Louise Brown, το πρώτο «παιδί του σωλήνα» γεννήθηκε στην Αγγλία και η είδηση της γέννησής της αποτέλεσε την σημαντικότερη ως τότε εξέλιξη στο τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

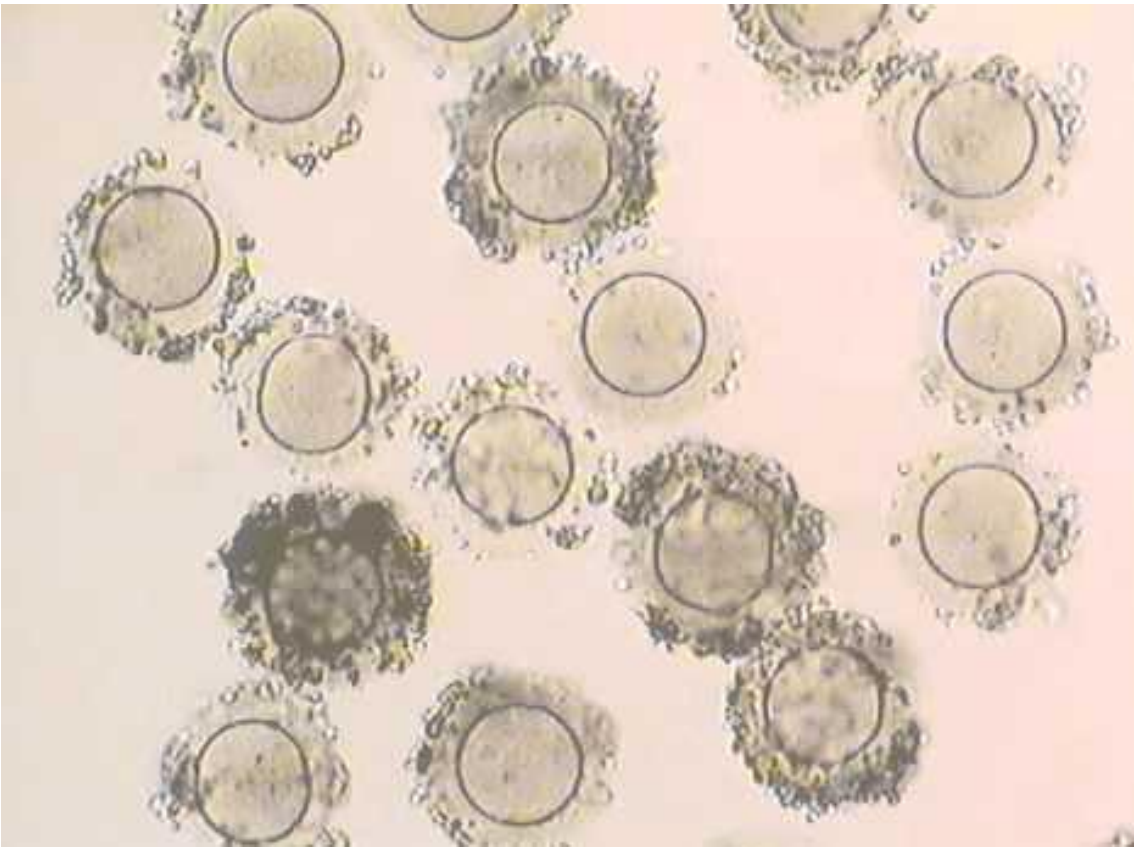
Εικόνα 2. *Πρωτοσέλιδα εφημερίδων για την γέννηση της Louise Brown.*

Έκτοτε, οι εξελίξεις ήταν ραγδαίες και τα επιτεύγματα πολλαπλά. Η εμβρυολογία, σε συνδυασμό με την σύγχρονη γενετική και αναπτυξιακή βιολογία, βρίσκεται στις μέρες μας σε ιστορική καμπή. Σήμερα, διαθέτουμε πανοπλία μεθόδων για την κλινική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, ενώ παράλληλα η βασική έρευνα στην εμβρυολογία και στην αναγεννητική ιατρική αναμένεται να φέρει νέα επανάσταση στην ιατρική του 21^{ου} αιώνα.

Η ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή περιλαμβάνει απλές παρεμβάσεις, όπως είναι η φαρμακευτική αγωγή για τη ρύθμιση των ορμονικών ισορροπιών, χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάσταση βλαβών του αναπαραγωγικού συστήματος και τις κύριες μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Οι κύριες τεχνικές που εφαρμόζονται σε ένα σύγχρονο εμβρυολογικό εργαστήριο είναι:

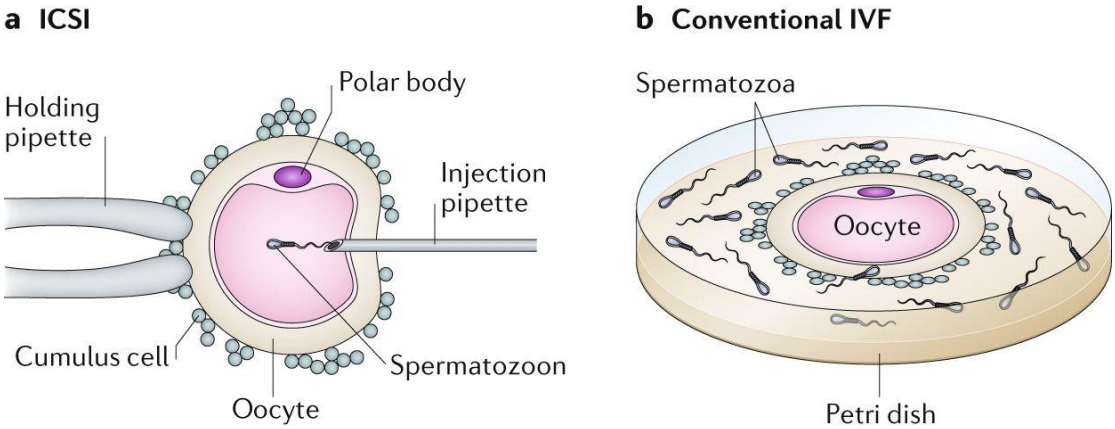
- Ανάλυση και επεξεργασία σπέρματος (Απλό και πλήρες σπερμοδιάγραμμα).
- Κρυοσυντήρηση σπέρματος.
- DNA fragmentation test.
- Ενδομήτριος σπερματέγχυση (IUI, intra-uterine insemination).
- Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας – Διέγερση ωοθηκών.
- Συλλογή ωοκυττάρων – Ωοληψία (Oocyte collection)
- Απομόνωση και καθαρισμός ωαρίων (Egg denuding)



Εικόνα 3. *Ωοκύτταρα μετά την απογύμνωση.*

- Κλασσική εξωσωματική γονιμοποίηση (Conventional in vitro fertilization, Conventional IVF).
- Μικρογονιμοποίηση ή ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection).

Εικόνα 4*. Τεχνική ICSI. Δεξιά η πιπέτα ICSI περιέχει το σπερματοζωάριο και αριστερά η πιπέτα holding ακινητοποιεί το ωοκύτταρο.*

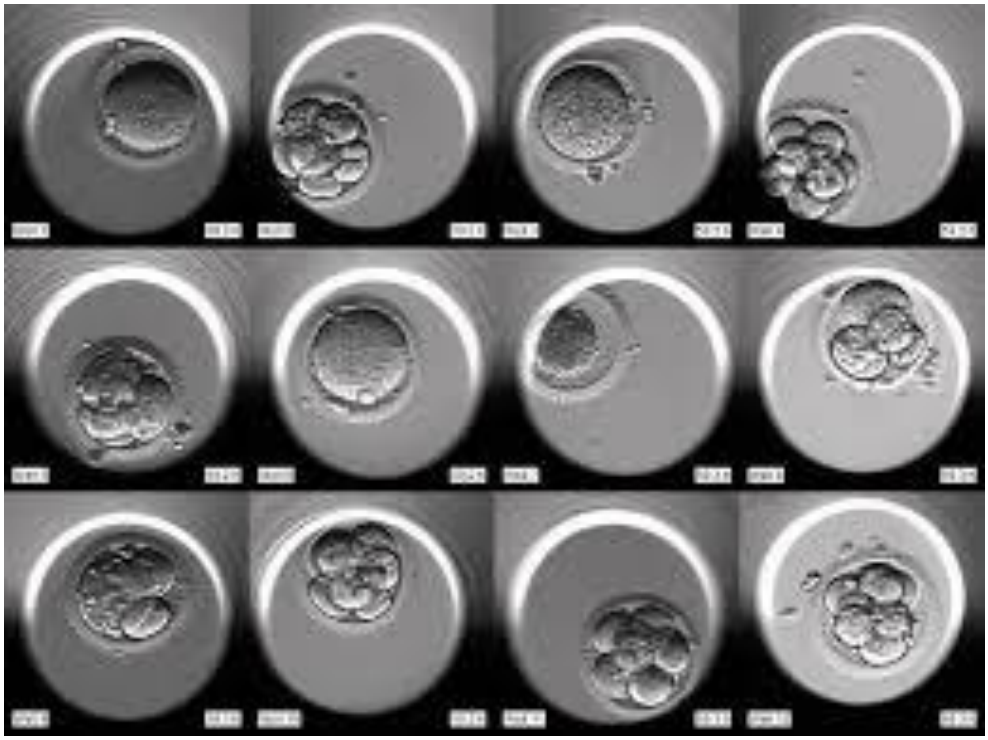


Εικόνα 5*. Τεχνητή γονιμοποίηση με a.ICSI και b.Κλασσική ivf.*

- Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση μορφολογικά επιλεγμένου σπερματοζωαρίου (IMSI, intracytoplasmic morphologically selected sperm injection).
- Καλλιέργεια εμβρύων μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης.
- Εμβρυομεταφορά.
- Διάνοιξη διαφανούς ζώνης εμβρύου (Assisted hatching).
- Κρυοσυντήρηση ωαρίων – εμβρύων με την τεχνική της υαλοποίησης (vitrification).
- Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού.
- Βιοψία εμβρύου (πολικού σωμάτιου, βλαστομεριδίου ή τροφοεκτοδέρματος) με σκοπό την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGT-M) ή τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο (preimplantation genetic screening, PGT-A).

***Εικόνα 6**. Βιοψία τροφοεκτοδέρματος βλαστοκύστης. Το τριχοειδές μικροσιφώνιο βιοψίας δεξιά (πιπέτα βιοψίας) χρησιμεύει για την αναρρόφηση μικρού αριθμού κυττάρων.*

- Βιοψία όρχεως (TESE, testicular sperm extraction)
- Αναρρόφηση όρχεως (TESA, testicular sperm aspiration)
- Παρακολούθηση εμβρύων με απεικόνιση χρονοδιολίσθησης (Time lapse imaging)



***Εικόνα 7.** Εικόνα από εμβρυοσκόπιο. Παρατηρείται η ανάπτυξη διαφορετικών εμβρύων σε πραγματικό χρόνο.*

- Δωρεά ωαρίων- σπέρματος
- Παρένθετη μητρότητα

Παρά την εξέλιξη των μεθόδων, την διαρκή βελτιστοποίησή τους, αλλά και την συνεχή εκπαίδευση και επιμόρφωση των εμβρυολόγων που τις εκτελούν, το αποτέλεσμα μιας προσπάθειας τεκνοποίησης με εξωσωματική γονιμοποίηση ενδέχεται να μην είναι το επιθυμητό. Το πρόβλημα μπορεί να ξεκινά από αποτυχία γονιμοποίησης των γαμετών, που συνοδεύεται από απουσία εμβρύων για εμβρυομεταφορά. Ακόμη, όμως, και μια καθ' όλα επιτυχημένη εμβρυομεταφορά, δεν συνεπάγεται σίγουρη επιτυχία και επίτευξη εγκυμοσύνης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφύτευση των εμβρύων, την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, την ομαλή εξέλιξη της εγκυμοσύνης και τελικά στην γέννηση υγιούς βρέφους είναι ιδιαιτέρως πολύπλοκοι.

Στην παρούσα εργασία, θα αναλυθούν, αρχικά, τα γενικά στοιχεία εμβρυολογίας και ωοθυλακιογένεσης, που είναι απαραίτητα για την κατανόηση μέρους των εμπλεκόμενων στην επίτευξη εγκυμοσύνης μηχανισμών. Η γένεση ενός ολόκληρου οργανισμού από ένα μοναδικό κύτταρο, η ανάπτυξη και η ωρίμανση των ωαρίων και των ωοθυλακίων, η απαραίτητη ορμονική ισορροπία και ρύθμιση όλων των γεγονότων σε έναν έμμηνο κύκλο και η ιδιαίτερη έμφαση στα κοκκώδη κύτταρα που αποτελούν και το βασικό υλικό μελέτης της παρούσας εργασίας, θα είναι τα κύρια σημεία ανάλυσης. Στα κοκκώδη κύτταρα συγκεκριμένα, θα ερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή τους στην απόπτωση, μέσω της μελέτης της έκφρασης δυο γονιδίων της οικογένειας BCL-2. Η μελέτη της έκφρασης ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης στα κοκκώδη κύτταρα και η συσχέτιση της έκφρασης αυτής με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο προγνωστικής σημασίας στις προσπάθειες τεκνοποίησης με εξωσωματική γονιμοποίηση.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

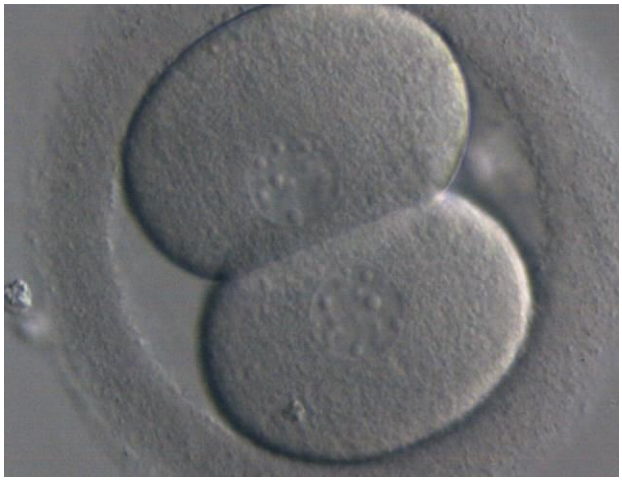
2.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Κάθε, πολυκύτταρος οργανισμός προκύπτει από ένα ολοδύναμο κύτταρο μοναδικής γενετικής σύστασης που καλείται ζυγώτης και σχηματίζεται κατά την ένωση δυο υψηλά εξειδικευμένων απλοειδών κυττάρων -του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου- κατά την γονιμοποίηση. Ως γονιμοποίηση ορίζεται η αλληλουχία των μοριακών και κυτταρικών αντιδράσεων που αρχίζει όταν ένα σπερματοζωάριο έρχεται σε επαφή με ένα δευτερογενές ωοκύτταρο και ολοκληρώνεται με την ανάμειξη των πατρικών και των μητρικών χρωμοσωμάτων στην μετάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του ζυγώτη. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στο μέσο διεσταλμένο τμήμα του ωαγωγού που ονομάζεται λύκηθος και διαρκεί περίπου 24 ώρες. Το σπερματοζωάριο, αφού διαπεράσει τα κοκκώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (corona radiata) και τη διαφανή ζώνη (zona pellucida, ακυτταρικό, γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα), που περιβάλλουν το ωοκύτταρο, προσκολλάται στην επιφάνεια του ωοκυττάρου και έπειτα εισέρχεται στο εσωτερικό του. Ακολουθεί μια σειρά πολλαπλών και πολύπλοκων σταδίων που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ωοκυττάρου, τον σχηματισμό του θηλυκού και του αρσενικού προπυρήνα (PNs), τη συνένωσή τους στο κέντρο του ωοκυττάρου, την απώλεια των πυρηνικών τους μεμβρανών και τέλος την ανάμειξη των χρωμοσωμάτων μητρικής και πατρικής προέλευσης. Το γονιμοποιημένο, πλέον, ωοκύτταρο ονομάζεται ζυγωτό και είναι ένα διπλοειδές κύτταρο, μοναδικής γενετικής σύστασης. Είναι ολοδύναμο και ως εκ τούτου ικανό να οδηγήσει στη δημιουργία ενός βιώσιμου πολυκύτταρου οργανισμού. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ζυγώτη αποτελούν μια εγγενή ένδειξη της ποιότητας των

Εικόνα *8. Ζυγώτης 18 ώρες μετά την κλασσική γονιμοποίηση (ivf) σε εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης. Διακρίνονται δυο ξεκάθαροι προπυρήνες κεντρικά τοποθετημένοι με ευδιάκριτους πυρηνίσκους στο εσωτερικό τους.*

γαμετών, του εμβρύου που πρόκειται να αναπτυχθεί, αλλά και της πιθανότητάς του να εμφυτευθεί. Πολλές μελέτες υπογραμμίζουν την προγνωστική αξία που έχει η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών αυτών για την χρωμοσωμική σύσταση του ζυγώτη. (Gianaroli et al. 2003)

Η χρονική περίοδος από τον σχηματισμό του ζυγωτού μέχρι και πριν την εμφύτευσή του στο ενδομήτριο χαρακτηρίζεται ως προεμφυτευτική και αποτελεί μέρος της πρώιμης εμβρυικής περιόδου. Καθώς το ζυγωτό μεταφέρεται παθητικά μέσα στον ωαγωγό, αρχίζει να διαιρείται μιτωτικά. Το στάδιο αυτό της πρώιμης εμβρυικής ανάπτυξης καλείται **αυλάκωση** και αφορά τις διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις που υφίσταται το έμβρυο μέχρι την εμφύτευσή του στο ενδομήτριο. Η πρώτη αυλάκωση είναι ολική και ισομερής, καθώς προκύπτουν δύο πλήρη και ισομεγέθη θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται βλαστομερίδια. Οι διαδοχικές διαιρέσεις που ακολουθούν οδηγούν στο σχηματισμό εμβρύου 4, 8, 16,… βλαστομεριδίων αντίστοιχα. Η δεύτερη αυλάκωση κάθε βλαστομεριδίου είναι ολική, ισομερής και περιστροφική, μιας και για το ένα βλαστομερίδιο γίνεται σε οριζόντιο και για το άλλο σε κατακόρυφο επίπεδο. Κατά τη διάρκεια της τρίτης και τέταρτης αυλάκωσης, δηλαδή στο στάδιο των 8-10 κυττάρων, τα βλαστομερίδια αρχίζουν να συνδέονται ισχυρά μέσω χασμοσυνδέσμων. Το στάδιο αυτό της συνένωσης των κυττάρων εξυπηρετεί την διασφάλιση της μεταξύ τους επικοινωνίας, αλλά και την κοινή τους απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Κάθε κύτταρο παραμένει ολοδύναμο και επομένως ικανό -εφόσον απομονωθεί- να σχηματίσει ένα πλήρες έμβρυο. Την τέταρτη μέρα της πρώιμης εμβρυικής ανάπτυξης έχει σχηματιστεί μια συμπαγής σφαίρα αποτελούμενη από 12-16 βλαστομερίδια, η οποία ονομάζεται **μορίδιο (morula)**.(Forgacs and Newman 2005)



Εικόνα 9. *Αυλάκωση στο στάδιο 2 κυττάρων. Τα βλαστομερίδια είναι ισομεγέθη και καθένα περιέχει έναν ευδιάκριτο πυρήνα.*

Εικόνα 10. *Αυλάκωση στο στάδιο 4 κυττάρων. Τα βλαστομερίδια είναι ισομεγέθη και καθένα περιέχει έναν ευδιάκριτο πυρήνα.*

Ο σχηματισμός του ομοιόμορφου αυτού κυτταρικού πληθυσμού που ονομάζεται μορίδιο είναι δυνατόν να παρατηρηθεί σε έμβρυα 8-16 κυττάρων και μέχρι την εμφάνιση της βλαστοκυστικής κοιλότητας και είναι αποτέλεσμα της διεργασίας της **συνείλησης**. Κατά τη

διεργασία αυτή, που είναι γνωστή και ως compaction, τα βλαστομερίδια αποπλατύνονται, μεγιστοποιώντας τις μεσοκυττάριες επαφές και ελαχιστοποιώντας τα μεσοκυττάρια διαστήματα. Επιπλέον, αρχίζει η πόλωση και η διαφοροποίηση των κυττάρων και εκφράζονται νέα γονιδιακά προϊόντα που διευκολύνουν τη δημιουργία κυτταρικής πολικότητας στα εξωτερικά κύτταρα (κύτταρα μελλοντικής τροφοβλάστης). Έμβρυα των οποίων τα κύτταρα διαιρούνται είτε πολύ γρήγορα είτε πολύ αργά είναι πιθανόν να παρουσιάσουν διαταραχές στον μεταβολισμό ή ανωμαλίες στον αριθμό και στην δομή των χρωμοσωμάτων.(Prados et al. 2012)

Εικόνες 11. Α και Β: *Αυλάκωση στο στάδιο 8 κυττάρων (3ης ημέρας ανάπτυξης). Τα βλαστομερίδια είναι ισομεγέθη, δεν περιέχουν ευδιάκριτους πυρήνες και δεν παρουσιάζουν σημάδια compaction.*

Εικόνες 12. Α: *Έμβρυο 8 κυττάρων σε αρχικό στάδιο compaction και* ***Β:*** *Έμβρυο 8 κυττάρων σε προχωρημένο στάδιο compaction, όπου τα επιμέρους κύτταρα δεν είναι δυνατόν να διακριθούν.*

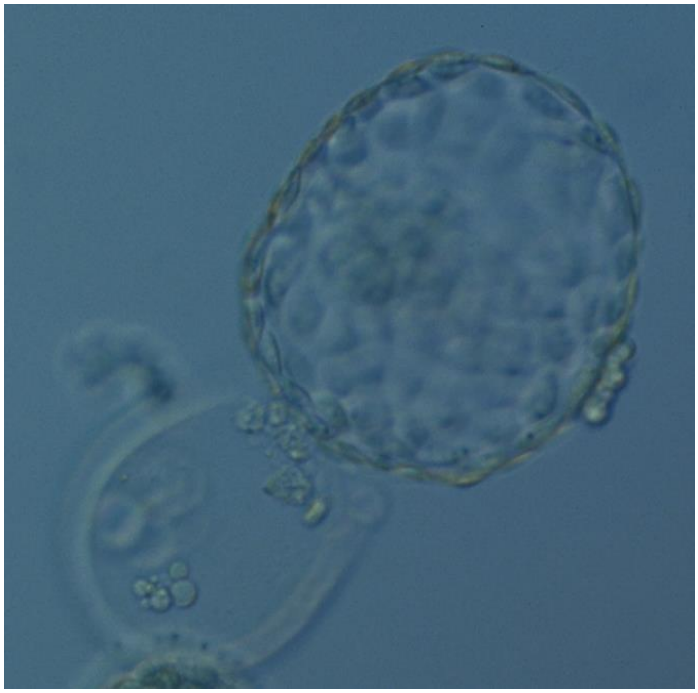
Το πρώιμο έμβρυο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας στο στάδιο του μοριδίου και όταν το ενδομήτριο είναι στην αρχή της εκκριτικής φάσης. Καθοριστική στιγμή κατά την εμβρυική ανάπτυξη αποτελεί η συσσώρευση υγρού μεταξύ των κυττάρων του μοριδίου. Καθώς ο όγκος του υγρού αυτού αυξάνεται, δημιουργείται σταδιακά μια κοιλότητα που ονομάζεται **βλαστόκοιλο** ή **βλαστοκυστική κοιλότητα**. Αυτό φυσιολογικά συμβαίνει στο στάδιο 16-32 κυττάρων, δηλαδή μεταξύ 4^{ης} και 5^{ης} ημέρας της ανάπτυξης του εμβρύου (blastulation), το οποίο πλέον καλείται **βλαστοκύστη**. Καθώς το υγρό αυξάνει σε όγκο, τα κύτταρα της βλαστοκύστης πληθαίνουν και διαφοροποιούνται σε:

1. **Τροφοβλάστη ή τροφοεκτόδερμα (trophoblast/ trophoectoderm):** Περιφερειακή κυτταρική μάζα πεπλατυσμένων κυττάρων που χρησιμεύει για την διατροφή της βλαστοκύστης και αργότερα για το σχηματισμό του πλακούντα.

2. **Εσωτερική κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη (inner cell mass):** Άθροισμα κυττάρων που βρίσκονται πιο κεντρικά και από τα οποία αργότερα θα δημιουργηθεί το έμβρυο και οι εξωεμβρυικές μεμβράνες. Τα κύτταρα του inner cell mass θεωρείται ότι αρχικά είναι ολοδύναμα και ως εκ τούτου ικανά να παράγουν άμεσα διάφορες σειρές εμβρυικών κυττάρων. Το inner cell mass είναι δίστοιβο και συγκεκριμένα αποτελείται από την πολυδύναμη **επιβλάστη** και την **υποβλάστη**. Ο συνδυασμός επιβλάστης και υποβλάστης είναι γνωστός ως εμβρυϊκός δίσκος.

Σταδιακά το βλαστόκοιλο μεγαλώνει και τα κύτταρα της βλαστοκύστης πληθαίνουν, με αποτέλεσμα η βλαστοκύστη να αυξάνει σε μέγεθος και η διαφανής ζώνη που την περιβάλλει να λεπταίνει. Κατά την 6^{η} ημέρα της εμβρυικής ανάπτυξης, η διαφανής ζώνη εκφυλίζεται, διαρρηγνύεται και επιτρέπει στην βλαστοκύστη να απελευθερωθεί και να προσκολληθεί στο επιθήλιο της μήτρας (ενδομήτριο). Η διαδικασία κατά την οποία η βλαστοκύστη απελευθερώνεται από την διαφανή ζώνη της ονομάζεται **εκκόλαψη (hatching)**. Ο αριθμός των κυττάρων που συνιστούν μια βλαστοκύστη είναι δυνατόν να ποικίλλει αρκετά και κυμαίνεται από 24 μέχρι και 322 κύτταρα.(Hardarson 2003)

Εικόνα 13. *Διογκωμένη βλαστοκύστη καλής ποιότητας με ευδιάκριτο inner cell mass. Η διαφανής ζώνη είναι λεπτή λόγω της αύξησης του μεγέθους της βλαστοκύστης.*

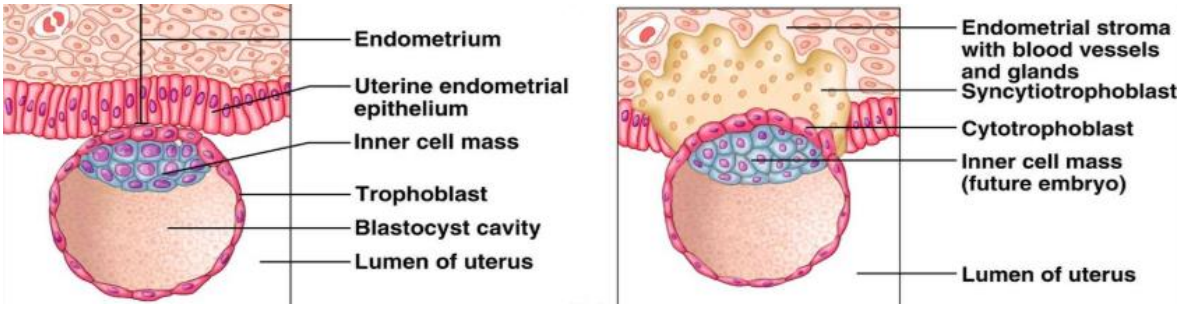


Εικόνα 14. *Βλαστοκύστη μετά την εκκόλαψη (Totally hatched blastocyst).*

Η βλαστοκύστη προσεγγίζει το ενδομήτριο με προσανατολισμό τέτοιο, ώστε η εσωτερική κυτταρική μάζα να βρίσκεται στην πλευρά του ενδομητρικού τοιχώματος. Η τροφοβλάστη αρχίζει να προσκολλάται και να εισβάλλει στο ενδομήτριο, το οποίο διαβρώνεται από ένζυμα που παράγουν τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος (το τμήμα του τοιχώματος της μήτρας το οποίο φθείρεται καλείται φθαρτός).

Σε αυτό το στάδιο, στην τροφοβλάστη είναι διακριτές δύο κυτταρικές στοιβάδες:

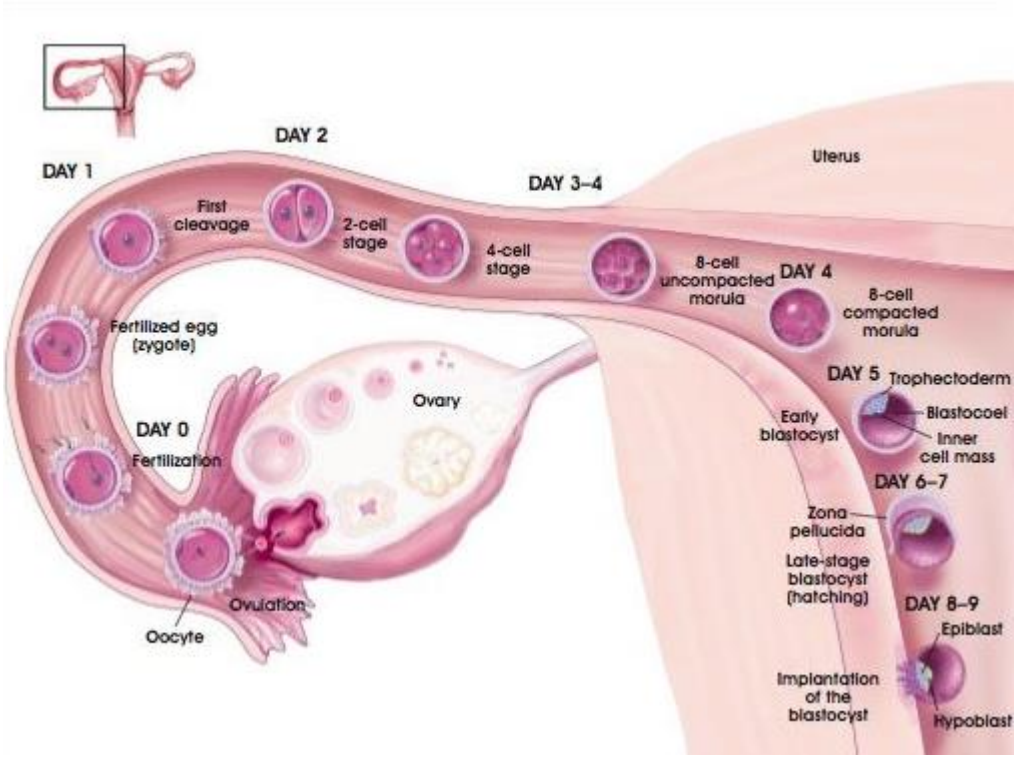
- η εσωτερική **κυτταροτροφοβλάστη** και
- η εξωτερική **συγκυτιοτροφοβλάστη**



Εικόνα 15. *Αρχικά στάδια εμφύτευσης βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.*

Στο τέλος της πρώτης εβδομάδας το ενδομήτριο διαβιβρώσκεται εξ' ολοκλήρου από την τροφοβλάστη, η οποία διαπερνά τη βασική μεμβράνη και τα κύτταρά της φθάνουν μέχρι το τοίχωμα των αγγείων του ενδομητρίου. Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της βλαστοκύστης αρχίζει η διαφοροποίηση του εμβρύου. Το μέγεθος της συγκυτιοτροφοβλάστης αυξάνει σημαντικά ενώ μιτωτικές διαιρέσεις παρατηρούνται μόνο στην κυτταροτροφοβλάστη. Τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας διαφοροποιούνται και σχηματίζουν δύο στιβάδες, την εξωδερμική βλαστική στιβάδα ή εξώδερμα και την ενδοδερμική βλαστική στιβάδα ή ενδόδερμα. Κάθε στιβάδα σχηματίζει έναν πεπλατυσμένο δίσκο και οι δύο μαζί αποτελούν το διπέταλο βλαστικό εμβρυϊκό δίσκο.

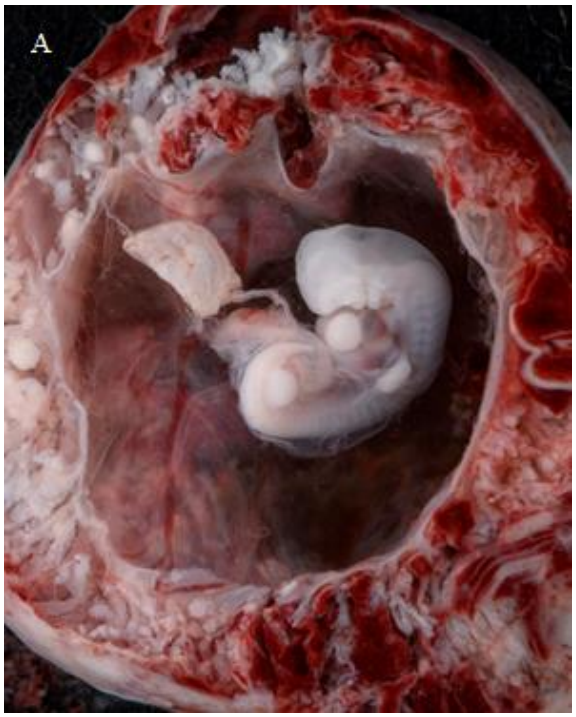
Καθώς αναπτύσσεται ο βλαστικός δίσκος, εμφανίζεται η αρχέγονη γραμμή, ο κόμβος του Hensen και ο σχηματισμός του μεσοδέρματος

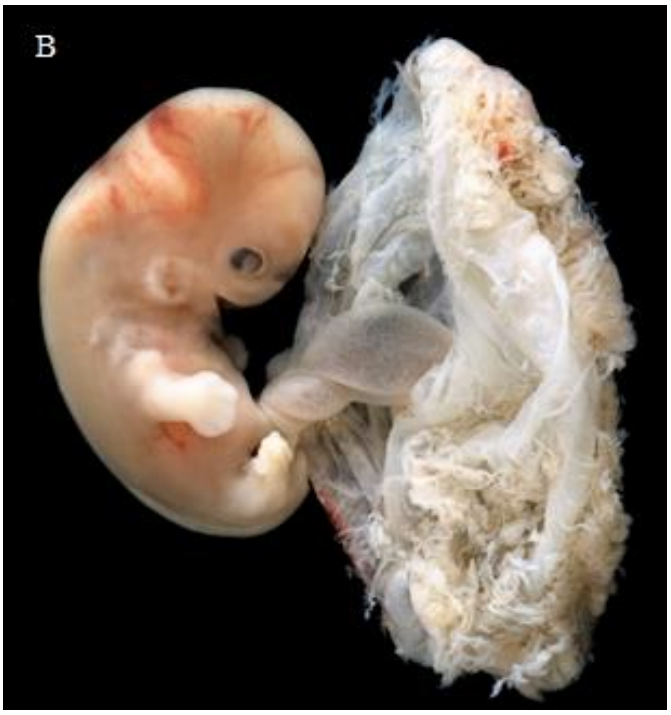


Εικόνα 16. *Η πορεία του εμβρύου στον ωαγωγό από το στάδιο του ζυγώτη μέχρο το στάδιο των 8 κυττάρων και η εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο.*

Τελικά, η βλαστοκύστη εφόσον εμφυτευθεί επιφανειακά στο ενδομήτριο κατά την 7η-8η ημέρα της πρώιμης εμβρυικής ανάπτυξης, τρέφεται μέσω του μητρικού αίματος και των διαβρωμένων ενδομητρικών ιστών.(Gilbert 2000) (Rahilly and Muller 2000) Η εγκυμοσύνη που προκύπτει τελειώνει με τη γέννηση ενός νέου οργανισμού σε διάστημα περίπου 40 εβδομάδων.

Εικόνα 17. Έμβρυο την 4η εβδομάδα της κύησης.





Εικόνες 18. Α*: Έμβρυο την 6η εβδομάδα κύησης* ***Β.*** *Έμβρυο 8η εβδομάδα κύησης* ***Γ.*** *Έμβρυο 11η εβδομάδα κύησης.*

2.2. ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΓΟΝΑΔΩΝ

Οι γονάδες έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση στα δύο φύλα, καθώς τόσο οι ωοθήκες όσο και οι όρχεις μπορούν να προκύψουν από την ίδια αδιαφοροποίητη καταβολή. Ο καθορισμός του αρσενικού ή του θηλυκού γοναδικού φύλου εκφράζεται με τη μορφογένεση του όρχι ή της ωοθήκης και αποτελεί σημείο ελέγχου της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των εσωτερικών και εξωτερικών γεννητικών δομών. Το 1947, ο Alfred Jost απέδειξε με κλασσικά πειράματα ευνουχισμού αρσενικών εμβρύων κουνελιών in utero, ότι το βασικό πρόγραμμα ανάπτυξης της γοναδικής καταβολής ακολουθεί την θηλυκή διαφοροποίηση και ότι ο αρσενικός φαινότυπος επιβάλλεται από την παρουσία φυσιολογικά ανεπτυγμένων όρχεων.

Με βάση, λοιπόν, το γενετικό φύλο (XX στα θήλεα έμβρυα και XY στα άρρενα έμβρυα) καθορίζεται το γοναδικό φύλο. Το κύριο γονίδιο που ελέγχει την διαφοροποίηση των γονάδων προς όρχεις βρίσκεται στα θηλαστικά στο χρωμόσωμα Y, με αποτέλεσμα τα άτομα με ένα Y χρωμόσωμα να έχουν σχεδόν πάντα φαινότυπο άρρενος. Το γονίδιο αυτό ονομάζεται SRY (Sex Determining Region Y chromosome) και κωδικοποιεί την έκφραση ενός ρυθμιστή, ο οποίος πυροδοτεί μια αλληλουχία γεγονότων που καταλήγει στην δημιουργία όρχεων. Η απουσία του γονιδίου SRY οδηγεί στην διαφοροποίηση προς ωοθήκη. Η έκφραση του γονιδίου SRY είναι ως εκ τούτου αναγκαία, αλλά όχι ικανή συνθήκη για τον καθορισμό του άρρενος φύλου. Η λειτουργική διαφοροποίηση των γονάδων οδηγεί στην παραγωγή και έκκριση ειδικών ορμονών του φύλου, οι οποίες ελέγχουν την ανάπτυξη του φαινοτυπικού φύλου. Στο άνθρωπο, επομένως, διακρίνονται τρία επίπεδα φυλετικού διμορφισμού, καθώς το γενετικό φύλο καθορίζει το γοναδικό φύλο και αυτό με τη σειρά του το φαινοτυπικό φύλο. Αξίζει, φυσικά, να αναφερθεί ότι ο ατομικός αυτοπροσδιορισμός του ατόμου ως άρρεν ή θήλυ, ο τρόπος δηλαδή με τον οποίο κάθε άτομο εννοεί την φυλετική του ταυτότητα ορίζει το φύλο συμπεριφοράς του.

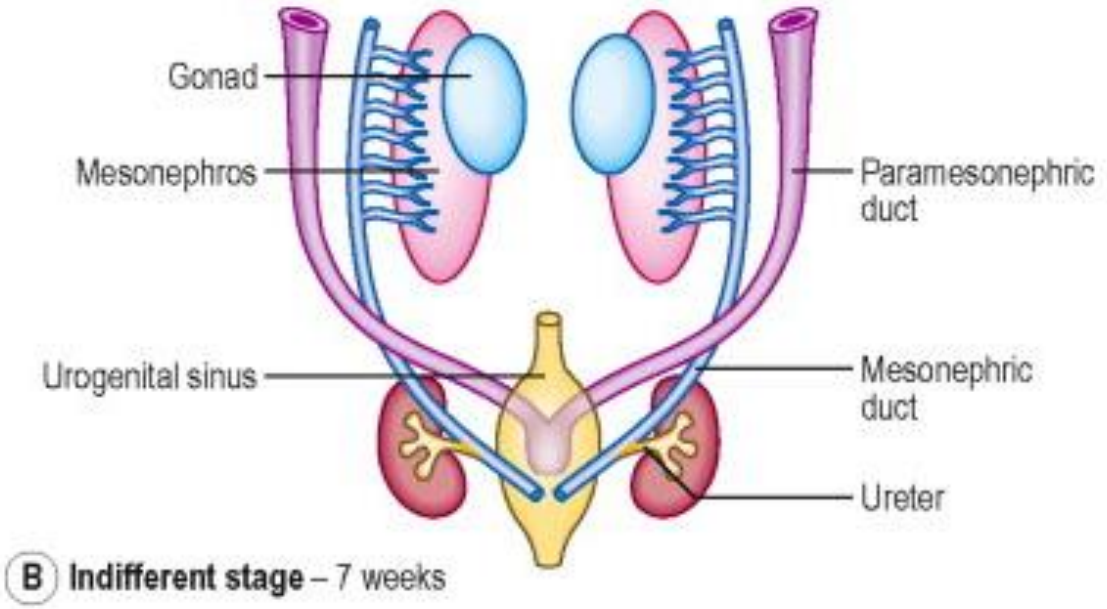
Κατά την αμφιφυλετική ή αδιαφοροποίητη φάση, το γεννητικό σύστημα είναι πανομοιότυπο και στα δύο φύλα. Στην φάση αυτή υφίστανται γεννητικά κύτταρα και φυλετικές δοκίδες τόσο στις φλοιώδεις, όσο και στις μυελώδεις περιοχές των μελλοντικών γονάδων, καθώς και πλήρως σχηματισμένοι μεσονεφρικοί και παραμεσονεφρικοί πόροι ο ένας παράπλευρα στον άλλο. Η γοναδική καταβολή εμφανίζεται κατά την $4^{η}$ εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης και παραμένει στο αμφιφυλετικό στάδιο έως την $7^{η}$ εβδομάδα. Στο τέλος της αδιαφοροποίητης φάσης της φυλετικής ανάπτυξης, η αρχέγονη γεννητική οδός αποτελείται και στα δυο φύλα από:

1) Τις γονάδες.

2) Τα δυο συστήματα γεννητικών πόρων (Μεσονεφρικοί πόροι ή Πόροι του Wolff και Παραμεσονεφρικοί πόροι ή Πόροι του Muller). Από τους γεννητικούς πόρους θα προκύψουν τα έσω γεννητικά όργανα. Παρουσία του εμβρυικού όρχι παράγονται ανδρογόνα και αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH) που επάγουν την διατήρηση και την ανάπτυξη των πόρων του Wolf και επομένως της επιδιδυμίδας, των σπερματικών πόρων, της σπερματοδόχου κύστης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του άρρενος. Συμπληρωματικά, η έκκριση της AMH από τα κύτταρα Sertoli αναστέλλει την ανάπτυξη των πόρων του Müller και

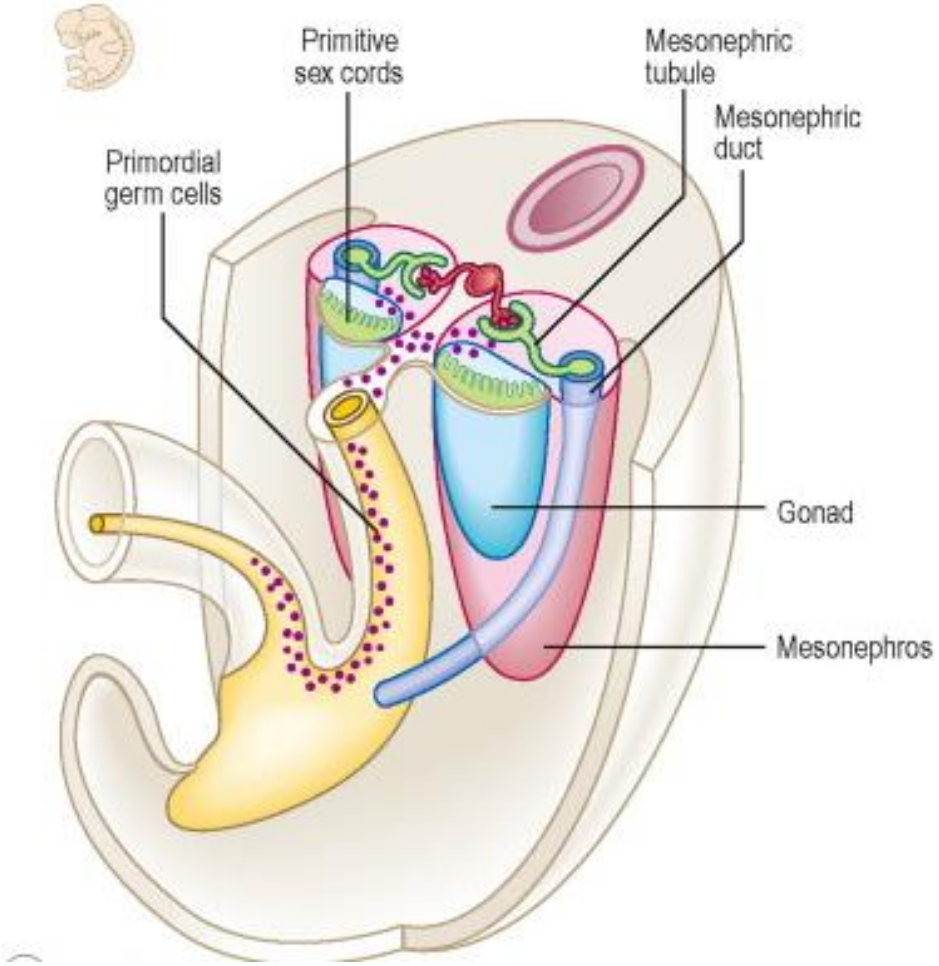
επομένως την ανάπτυξη των σαλπίγγων, της μήτρας και του άνω τριτημορίου του κόλπου. Στα θήλεα έμβρυα, ακολουθείται η αντίθετη πορεία μιας και αναστέλλεται η ανάπτυξη των πόρων του Wolf και επάγεται η ανάπτυξη των πόρων του Müller.

3) Την κοινή έξοδο των πόρων ουροποιητικού και γεννητικού συστήματος από τις γεννητικές πτυχές.



Εικόνα 19. *Αμφιφυλετική/ αδιαφοροποίητη φάση γεννητικού συστήματος. Παρατηρούνται οι γονάδες, οι γεννητικοί πόροι και η κοινή έξοδος γεννητικού και ουροποιητικού συστήματος.*

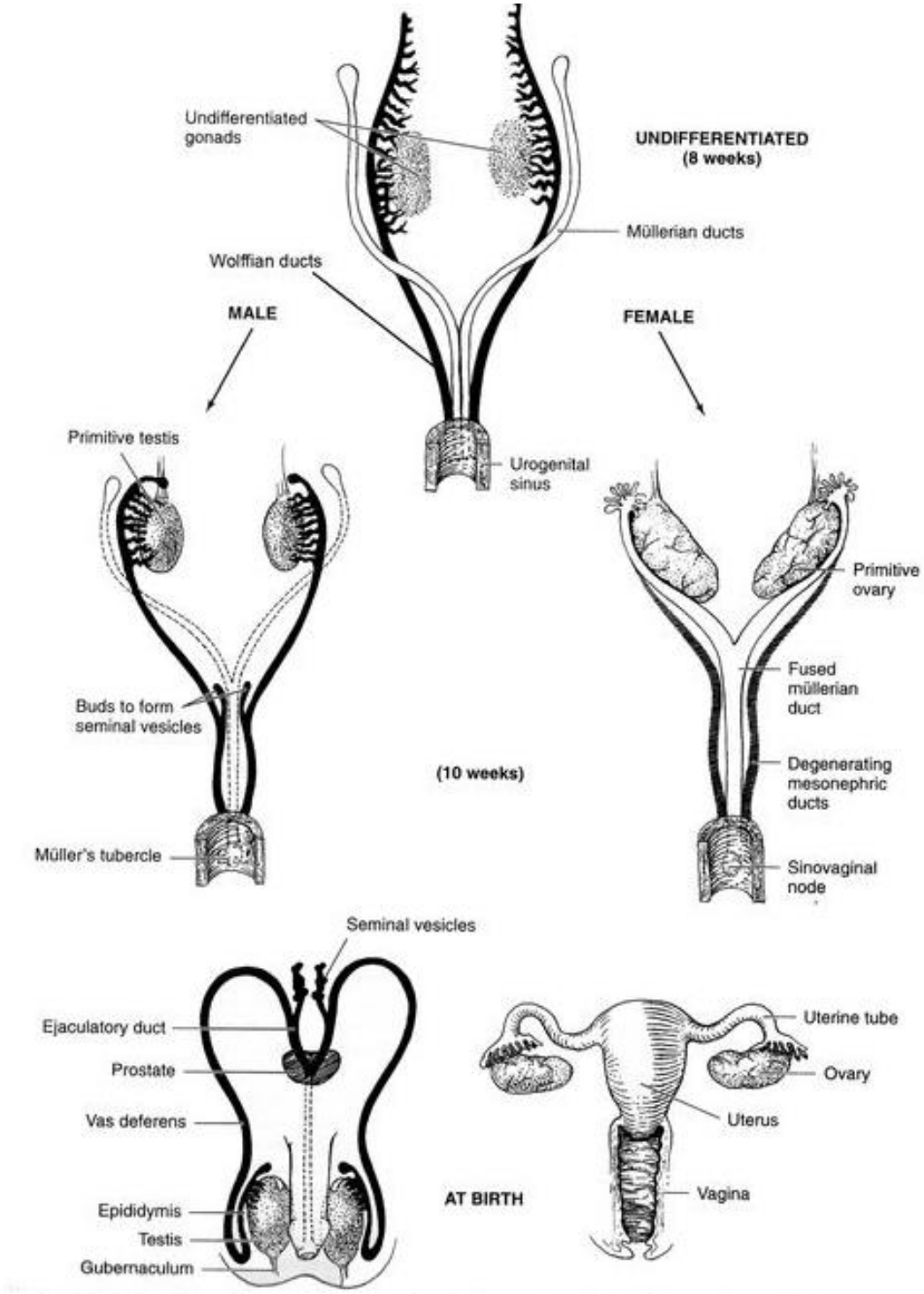
Οι γονάδες εμφανίζονται αρχικά με τη μορφή ενός ζεύγους επίμηκων ακρολοφιών (γεννητικοί ή γοναδικοί κρημνοί) και σχηματίζονται με πολλαπλασιασμό του βλαστικού επιθηλίου και πύκνωση του υποκείμενου μεσεγχύματος στο ραχιαίο μεσεντέριο, στην επιφάνεια του μεσόνεφρου. Καθώς αναπτύσσονται προβάλλουν στο σπλαχνικό κοίλωμα και χωρίζονται βαθμιαία από το μεσόνεφρο, με τον οποίο παραμένουν συνδεδεμένες. Η απαρχή της δημιουργίας των γονάδων τοποθετείται στην 7^{η} εβδομάδα, όταν τα αρχέγονα γεννητικά ή βλαστικά κύτταρα (Primordial Germ Cells, PGCs) κάνουν την εμφάνισή τους. Πρόκειται για τη φάση της γαστριδίωσης (gastrulation), κατά την οποία το έμβρυο διαφοροποιείται στα τρία βλαστικά δέρματα (εξώδερμα, ενδόδερμα, μεσόδερμα). Στα ανθρώπινα έμβρυα, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται σε ένα πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης ανάμεσα στα ενδοδερμικά κύτταρα στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού κοντά στην αλλαντοϊδα. Πολλαπλασιαζόμενα μεταναστεύουν μέσω του αρχέγονου μεσεντερίου στις αρχέγονες γονάδες και εισχωρούν στους γεννητικούς κρημνούς. Όπως είναι λοιπόν σαφές, ο ρόλος των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων δεν περιορίζεται στην παροχή γαμετών. Ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η μετανάστευσή τους στις γεννητικές χορδές που σηματοδοτεί τη διέγερση του μεσοδέρματος και την διαφοροποίησή του σε γονάδα.(Palma et al. 2012) (McKay et al. 1953)



Εικόνα 20. *Γονάδες την 7η εβδομάδα της εμβρυικής ανάπτυξης. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν στις αρχέγονες γονάδες.*

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό και μερικές εκατοντάδες από αυτά εγκαθίστανται στην γεννητική ταινία σχηματίζοντας τις αρχέγονες γονάδες, ενώ εκείνα που εγκαθίστανται οπουδήποτε αλλού στην αρχέγονη περιτοναϊκή κοιλότητα εκφυλίζονται. Οι αρχέγονες γονάδες, ακολουθούν στη συνέχεια διαφορετική πορεία ανάπτυξης και εξέλιξης ανάλογα με το γενετικό φύλο του εμβρύου.

Στα θήλεα έμβρυα, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα σύντομα μετά την μετανάστευσή τους περιβάλλονται από επιθηλιακά κύτταρα. Όταν πλέον έχουν περιβληθεί ολοκληρωτικά από επιθηλιακά κύτταρα –πρόδρομα των ωοθυλακικών κυττάρων- αναφέρονται ως **ωογόνια**, τα οποία αναπτύσσονται και εξελίσσονται σε θηλυκούς γαμέτες.



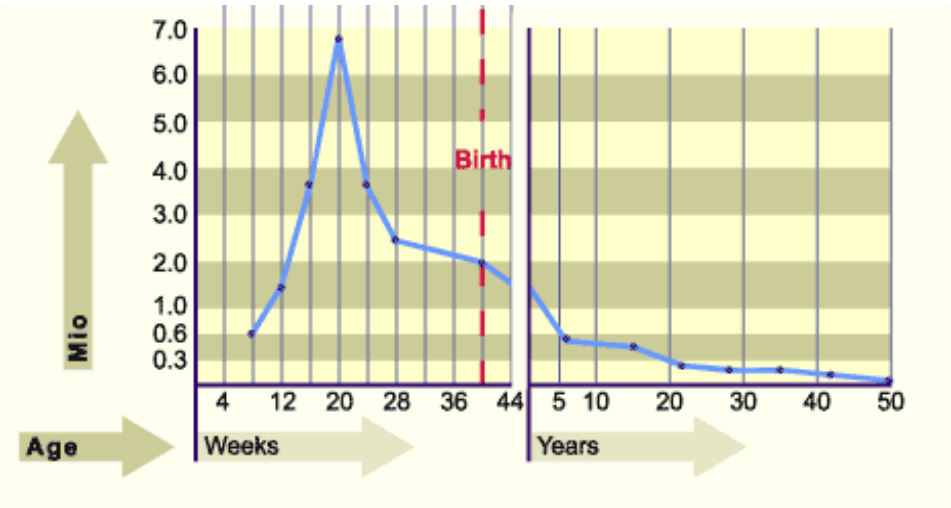
Εικόνα 21. *Από την αδιαφοροποίητη γονάδα στο γεννητικό σύστημα άρρενος και θήλεος.*

Οι ωοθήκες, οι θηλυκές γονάδες, αποτελούν τα κύρια αναπαραγωγικά όργανα και μαζί με τη μήτρα και τους ωαγωγούς συνιστούν το αναπαραγωγικό σύστημα στα θήλεα. Εξυπηρετούν δυο σκοπούς: 1) την ωογένεση και 2) την έκκριση στεροειδών και μη ορμονών.

2.3. ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Η διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης των θηλυκών γαμετών χαρακτηρίζεται ως ωογένεση. Ξεκινά, όπως προαναφέρθηκε, στις εμβρυικές ωοθήκες με την ανάπτυξη ωογονίων από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGCs). Από την 6η- 8η εβδομάδα τα ωογόνια υφίστανται αλλεπάλληλες μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ μερικά από αυτά ξεκινούν την πρώτη μειωτική τους διαίρεση και μετατρέπονται σε **πρωτογενή ωοκύτταρα**. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα αμέσως μετά το σχηματισμό τους (βραχεία φάση G1), διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό (φάση S) και μπαίνουν στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (πρόφαση I). Παραμένουν στο στάδιο της δικτυοταινίας (ή διπλοταινίας), μέχρι να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους κατά την αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας με αφετηρία στην περίοδο της εμμηναρχής.

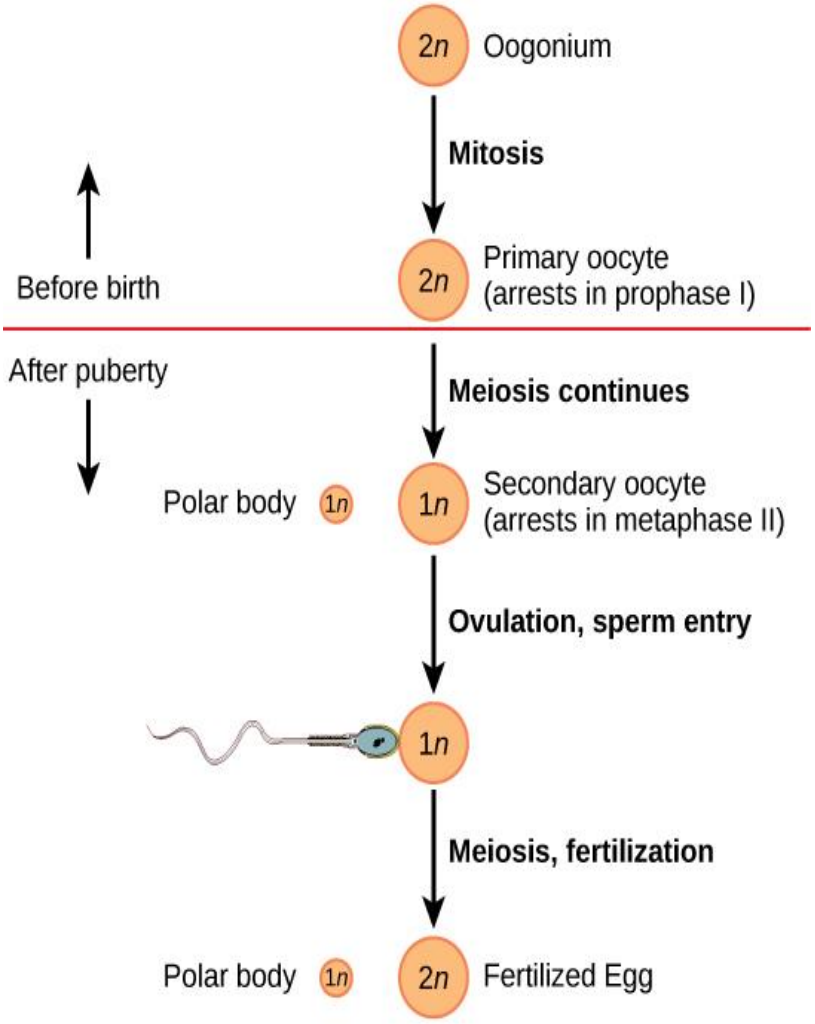
Κατά την 7η εβδομάδα της κύησης ο αριθμός των πρωτογενών ωοκυττάρων αγγίζει τις 10 χιλιάδες, ενώ μεταξύ 16ης και 20ης εβδομάδας, τα κύτταρα αυτά φθάνουν στο μέγιστο αριθμό τους, που προσεγγίζει τα 6-7 εκατομμύρια και στις δύο ωοθήκες. Τότε, ο πολλαπλασιασμός τους σταματά και ξεκινά ο αποπτωτικός τους θάνατος. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος των ωογονίων χαρακτηρίζεται ως ατρησία και ευθύνεται για την σημαντική μείωση του αριθμού τους που ξεκινά από την 20η εβδομάδα της εμβρυικής ανάπτυξης. Κατά τη γέννηση, οι ωοθήκες ενός θήλεος περιέχουν έναν πεπερασμένο αριθμό πρωτογενών ωοκυττάρων (περίπου 1 εκατομμύριο) που δεν είναι δυνατόν να υποστεί αύξηση με βάση τα όσα μέχρι σήμερα ισχύουν. Στην εφηβεία, ο αριθμός των πρωτογενών ωοκυττάρων που έχουν απομείνει στην ωοθήκη υπολογίζεται στις 300-400 χιλιάδες. Σε κάθε έμμηνο ρήση στρατολογούνται μόνο μερικά από τα πρωτογενή ωοκύτταρα και τελικά μόνο ένα ωριμάζει και συμμετέχει στην ωορρηξία. Μετά τα 37 έτη η πτώση του αριθμού των ωογονίων είναι κατακόρυφη και ο ρυθμός ατρησίας τους πολύ πιο έντονος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα πρωτογενή ωοκύτταρα είναι δυνατό να παραμείνουν αδρανή και καθηλωμένα στην πρόφαση I έως και 50 περίπου χρόνια, οπότε σηματοδοτείται η ολοκλήρωση της αναπαραγωγικής ηλικίας και η μετάβαση στην εμμηνόπαυση.(McGee and Hsueh 2000)



***Διάγραμμα 1**. Η χρονο-εξαρτώμενη μεταβολή του αριθμού των ωογονίων/ πρωτογενών ωοκυττάρων.*

Κάθε πρωτογενές ωοκύτταρο είναι καθηλωμένο στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (μειωτική παύση), είναι διπλοειδές, και περιβάλλεται από μια πυκνή στοιβάδα αποπλατυσμένων κοκκωδών κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης (προκοκκώδη κύτταρα) και μια βασική μεμβράνη. Έχει έναν πυρήνα που ονομάζεται βλαστική κυψελίδα (GV/ Germinal Vesicle) και για το λόγο αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται ως στάδιο GV της ωρίμανσης. Εντοπίζεται εντός του αρχέγονου ωοθυλακίου στο έξω τμήμα της φλοιώδους μοίρας της ωοθήκης. Στο τέλος της εμβρυικής περιόδου, όλα τα πρωτογενή ωοκύτταρα έχουν σχηματιστεί και έχουν καθηλωθεί στο στάδιο GV. (Virant-Klun et al. 2013)

Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο στο πρωτογενές ωοκύτταρο που προορίζεται για ωορρηξία.(A. Vander - m.d. - J.Sherman - ph.d. - D. Luciano - ph.d. - M. Τσακόπουλος m.d. Ν. Γελαδάς 2011) Από κάθε πρωτογενές ωοκύτταρο προκύπτουν τότε δυο θυγατρικά κύτταρα: το απλοειδές **δευτερογενές ωοκύτταρο** και το **πρώτο πολικό σωμάτιο**. Η διαίρεση αυτή είναι ασύμμετρη καθώς τα δυο κύτταρα παρότι ίδιας γενετικής σύστασης διαφέρουν σε μέγεθος και λειτουργικότητα. Το δευτερογενές ωοκύτταρο είναι σαφώς μεγαλύτερο, καθώς διατηρεί το σύνολο, σχεδόν, του κυτταροπλάσματος σε αντίθεση με το πολικό σωμάτιο που δεν περιέχει μεγάλη ποσότητα κυτταροπλάσματος, είναι πολύ μικρότερο σε μέγεθος και μη λειτουργικό.(Virant-Klun et al. 2013) Επομένως, η πρώτη μειωτική διαίρεση ξεκινά κατά την ενδομήτρια ζωή, ολοκληρώνεται σε κάποια μόνο πρωτογενή ωοκύτταρα κατά την εφηβεία, πριν την ωορρηξία και οδηγεί στη δημιουργία ενός δευτερογενούς ωοκυττάρου που περιέχει τα μισά χρωμοσώματα του πρωτογενούς και σχεδόν όλο το κυτταρόπλασμά του και ενός πρώτου πολικού σωματίου που περιέχει τα άλλα μισά χρωμοσώματα του πρωτογενούς ωοκυττάρου.



Εικόνα 22. *Στάδια Ωογένεσης.*

Το δευτερογενές ωοκύτταρο εισέρχεται στην δεύτερη μειωτική διαίρεση αμέσως μετά την ωορρηξία και διατηρείται στο στάδιο της μετάφασης (MII) μέχρι και την γονιμοποίηση. Το ωοκύτταρο σε αυτό το στάδιο ονομάζεται MII και μπορεί να γονιμοποιηθεί. Κατά την γονιμοποίηση ολοκληρώνεται και η δεύτερη μειωτική διαίρεση και προκύπτουν ένα **ώριμο ωάριο** και ένα **δεύτερο πολικό σωμάτιο**. Εφόσον η γονιμοποίηση ήταν επιτυχής, το γονιμοποιημένο ωάριο θα εξελιχθεί σε έμβρυο. ***Όπως είναι, λοιπόν σαφές, από κάθε ένα αρχέγονο κύτταρο (ωογόνιο) προκύπτει τελικά ένα μόνο ώριμο ωάριο.***

Το ωοκύτταρο, ο θηλυκός γαμέτης, συμμετέχει στην αναπαραγωγική διαδικασία και είναι ένα από τα μεγαλύτερα σε μέγεθος κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα. Ένα ώριμο ωοκύτταρο έχει διάμετρο τουλάχιστον 100μm. Περιέχει κυτταρόπλασμα πλούσιο σε λεκιθικά κοκκία, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου, την ωρίμανσή του, αλλά και την αρχική ανάπτυξη του εμβρύου μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο. In vivo αναπτύσσεται στο ωοθυλάκιο, μια εξειδικευμένη λειτουργική μονάδα μέσα στην ωοθήκη και ωριμάζει μέσω των διαδικασιών ωογένεσης/ ωοθυλακιογένεσης. Κατά συνέπεια, η ωογένεση και η ωοθυλακιογένεση είναι διαδικασίες άρρηκτα συνδεδεμένες.(Virant-Klun et al. 2013)

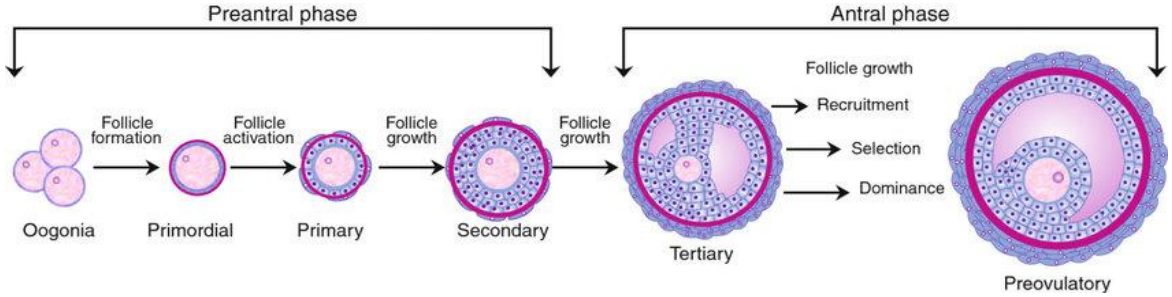
2.4. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωοθυλακιογένεση είναι μια μακρά και σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων.
2. Βασική ωοθυλακική ανάπτυξη.
3. Επιλογή και ωρίμανση του κυρίαρχου ωοθυλακίου.

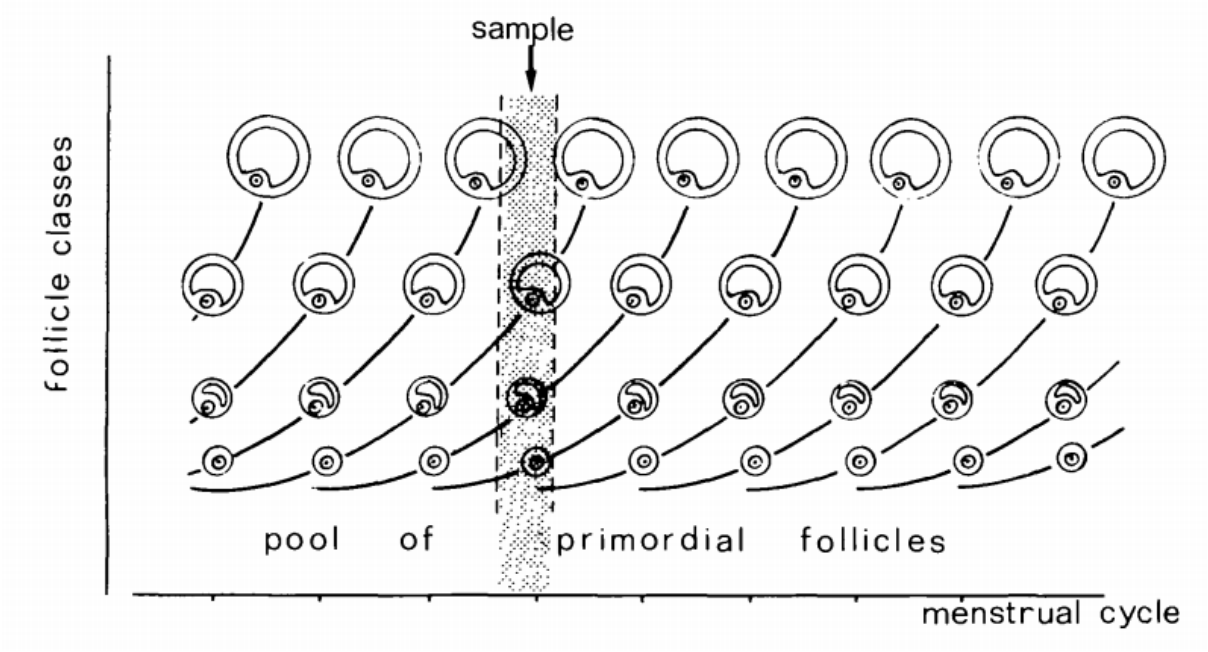
Τα **ωοθυλάκια** είναι εξειδικευμένες δομές που αποτελούν τις βασικές λειτουργικές μονάδες της ωοθήκης. Πρωταρχικός τους ρόλος είναι η υποστήριξη του ωοκυττάρου, αλλά και η συμμετοχή τους στην έκκριση ορμονών.

Από την 7η ήδη εβδομάδα της κύησης σχηματίζονται τα πρώτα ωοθυλάκια, τα οποία ονομάζονται αρχέγονα (primordial follicles, PMFs).(Rimon-Dahari et al. 2016) Τα αρχέγονα ωοθυλάκια ενεργοποιούνται και εξελίσσονται σε πρωτογενή, δευτερογενή, τριτογενή και τελικά σε ώριμα ωοθυλάκια έτοιμα για ωορρηξία. Η ωοθυλακιογένεση είναι μια διαδικασία συνεχής. Αναλύσεις του αριθμού των προκοιλοτικών ωοθυλακίων κατά τη

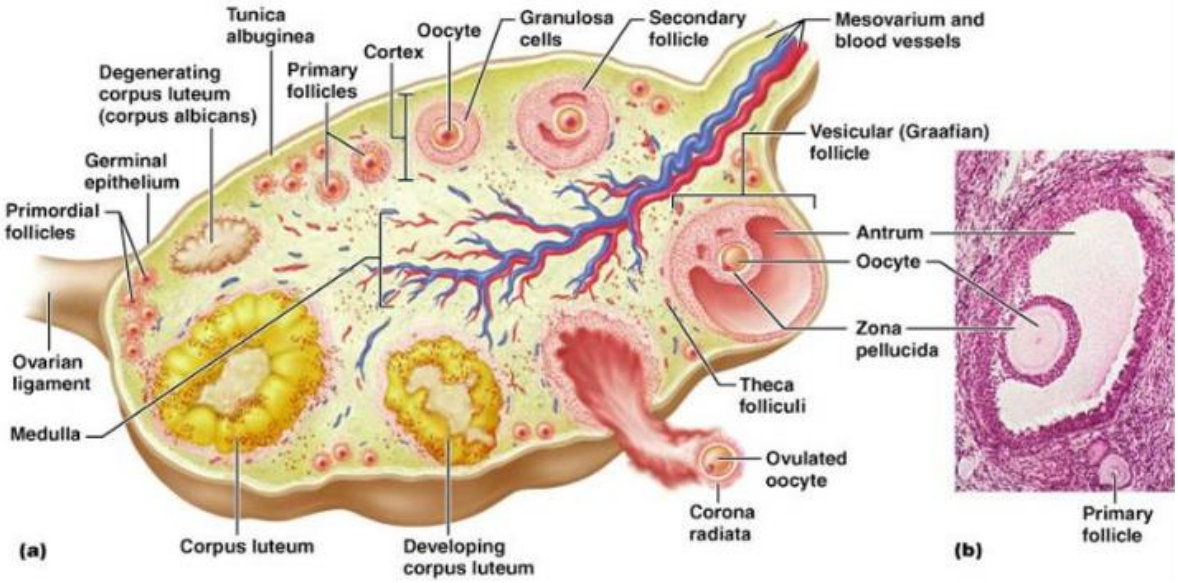


Εικόνα 23. *Αναπτυξιακά στάδια ωοθυλακίου.*

διάρκεια του κύκλου καταδεικνύουν πως ο αριθμός αυτός είναι σταθερός. Η υπόθεση, λοιπόν, που προκύπτει είναι ότι τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται σε κοόρτες-κατά κύματα (growth waves) μέσα στην ανθρώπινη ωοθήκη. Τα «κύματα ωοθυλακικής ανάπτυξης» διαδέχονται χρονικά το ένα το άλλο, με αποτέλεσμα σε κάθε τυχαία χρονική στιγμή του κύκλου το τυχαίο δείγμα των ωοθυλακίων να αποτελείται από ωοθυλάκια διαφορετικών μεγεθών και αναπτυξιακών σταδίων. (A. Gougeon 1986)

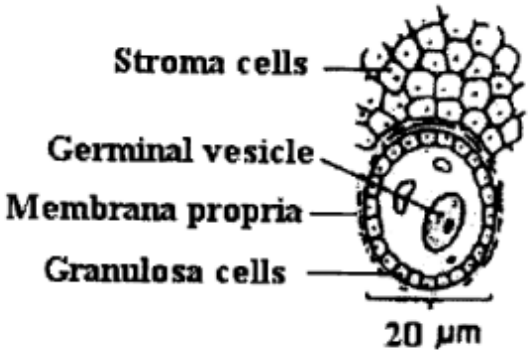


Διάγραμμα 2. *Σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης της ωοθυλακικής ανάπτυξης σε κύματα (growth waves). Στην τυχαία χρονική στιγμή του εμμηνορυσαικού κύκλου που στο διάγραμμα ορίζεται στην σκιαγραφημένη περιοχή (sample), παρατηρούνται ωοθυλάκια όλων των σταδίων.*



Εικόνα 24. *Εγκάρσια τομή ωοθήκης. Διακρίνονται ωοθυλάκια όλων των αναπτυξιακών σταδίων.*

Η βασική αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης είναι το **αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicle)**. Κάθε αρχέγονο ωοθυλάκιο έχει διάμετρο περίπου 20μm και περιέχει ένα πρωτογενές ωοκύτταρο σταματημένο στην φάση της δικτυοταινίας (διπλοταινίας) της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, το οποίο περιβάλλεται από μια στοιβάδα αποπλατυσμένων επιθηλιακών κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα, pre-granulosa cells). Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εντοπίζονται στο έξω τμήμα της φλοιώδους μοίρας της ωοθήκης, όπου σχηματίζουν τη δεξαμενή των ωοθυλακίων από την οποία καθημερινά και μέχρι το τέλος της αναπαραγωγικά ενεργής ζωής της γυναίκας, κάποια ξεκινούν τη διαδικασία της ωρίμανσης. Συγκεκριμένα, από την 20η εβδομάδα της εμβρυικής ζωής ομάδες αρχέγονων ωοθυλακίων εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ανάπτυξη. Αυτό συμβαίνει με μία δυναμική διαδικασία, η οποία συνεχίζεται σε όλες τις ηλικίες (εμβρυϊκή, παιδική, εφηβική, αναπαραγωγική, κλιμακτήριος). Η ακατάπαυστη αυτή διεργασία εισόδου των αρχέγονων ωοθυλακίων στην αναπτυξιακή διαδικασία χαρακτηρίζεται με τον όρο αρχική στρατολόγηση (initial recruitment).

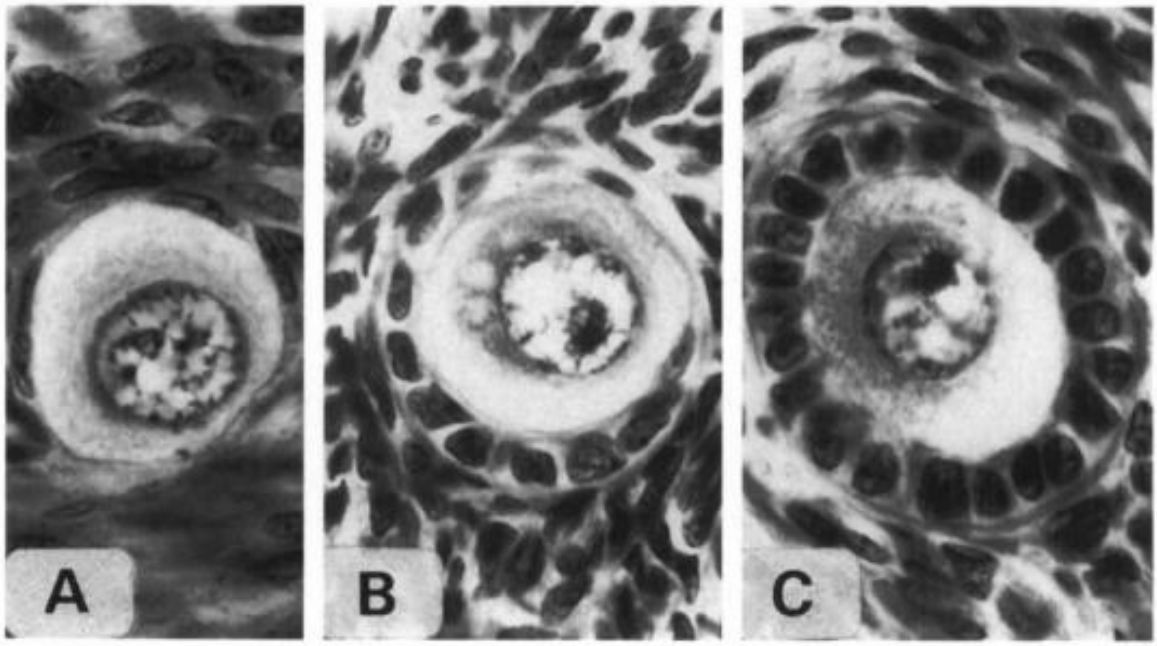


***Εικόνα 25**. Αρχέγονο Ωοθυλάκιο.*

Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων που μπαίνουν σε φάση ωρίμανσης εξαρτάται από το συνολικό αριθμό τους και μειώνεται με την ηλικία. Σημαντικό ποσοστό των ωοθυλακίων αυτών εκφυλίζονται μέσω του μηχανισμού της ατρησίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο αριθμός τους κατά τη γέννηση να είναι περίπου 1-2 εκατομμύρια και στις δύο ωοθήκες, ενώ στην αρχή της εφηβείας να έχει περιοριστεί περίπου στις 400-700 χιλιάδες. Σύμφωνα με ένα μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει τη δυναμική των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, στην ηλικία των 25 ετών, 37 περίπου αρχέγονα ωοθυλάκια «στρατολογούνται» κάθε ημέρα, αριθμός που συνεχώς μειώνεται με την ηλικία και αγγίζει το μηδέν στην εμμηνόπαυση. Κατά την εμμηναρχή, στην περίοδο της ήβης, κυκλικά κάθε μήνα, ένας αριθμός από τα αρχέγονα ωοθυλάκια που έχουν ξεκινήσει την διαδικασία της αρχικής στρατολόγησης, θα αποφύγουν την ατρησία. Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αυτή έχουν τα αυξημένα επίπεδα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) στην αρχή του εμηνορρυσιακού κύκλου που οδηγούν τα αρχέγονα ωοθυλάκια στη διαδικασία της κυκλικής στρατολόγησης. (Rimon-Dahari et al. 2016) (McGee and Hsueh 2000; Faddy and Gosden 1995)

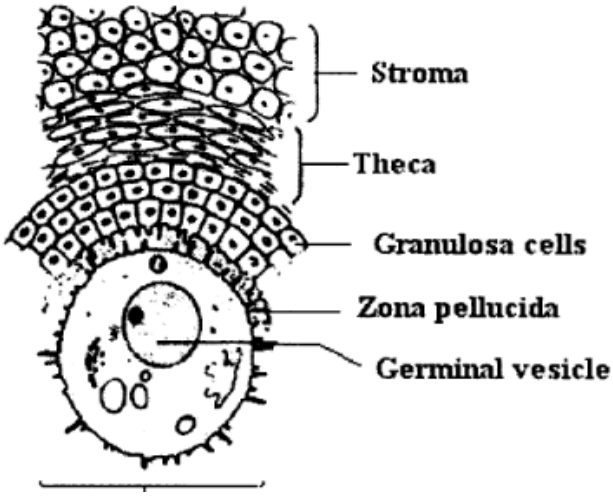
Η μετάβαση από το αρχέγονο στο **πρωτογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο (primary preantral follicle)** χαρακτηρίζεται από μορφολογική αλλαγή στα κοκκώδη κύτταρα που διαφοροποιούνται από αποπλατυσμένα σε κυβοειδή.(Rimon-Dahari et al. 2016) Κάθε πρωτογενές ωοθυλάκιο έχει διάμετρο περίπου 100μm, περιέχει -όπως και το αρχέγονο- ένα πρωτογενές ωοκύτταρο GV, το οποίο όμως περιβάλλεται από μια στοιβάδα κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται με μίτωση. Τα κοκκώδη κύτταρα περιβάλλονται από μια βασική μεμβράνη. Η εξέλιξη του αρχέγονου σε πρωτογενές

ωοθυλάκιο διαρκεί περίπου 150 ημέρες.(Rimon-Dahari et al. 2016) (Alain Gougeon 1996) Η ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλακίου από τα 20 στα 100μm οφείλεται στην αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους του περιεχόμενου ωοκυττάρου. Η ανάπτυξη αυτή παρατηρείται λόγω της επανενεργοποίησης του γονιδιώματος του ωοκυττάρου. Γονίδια που εκφράζονται στο ωοκύτταρο, μεταφράζονται στο στάδιο αυτό σε πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ωοκυττάρου.



Εικόνα 26*. Ανθρώπινα ωοθυλάκια. Α. Αρχέγονο ωοθυλάκιο στο οποίο το ωοκύτταρο περιβάλλεται από αποπλατυσμένα κοκκώδη κύτταρα. Β. Ωοθυλάκιο που εξελίσσεται από αρχέγονο σε πρωτογενές στο οποίο το ωοκύτταρο περιβάλλεται από μίγμα αποπλατυσμένων και κυβοειδών κυττάρων* και χαρακτηρίζεται ως «μεταβατικό» ωοθυλάκιο. C. Πρωτογενές ωοθυλάκιο στο οποίο το ωοκύτταρο περιβάλλεται από μια στοιβάδα κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων.*(Alain Gougeon 1996)*

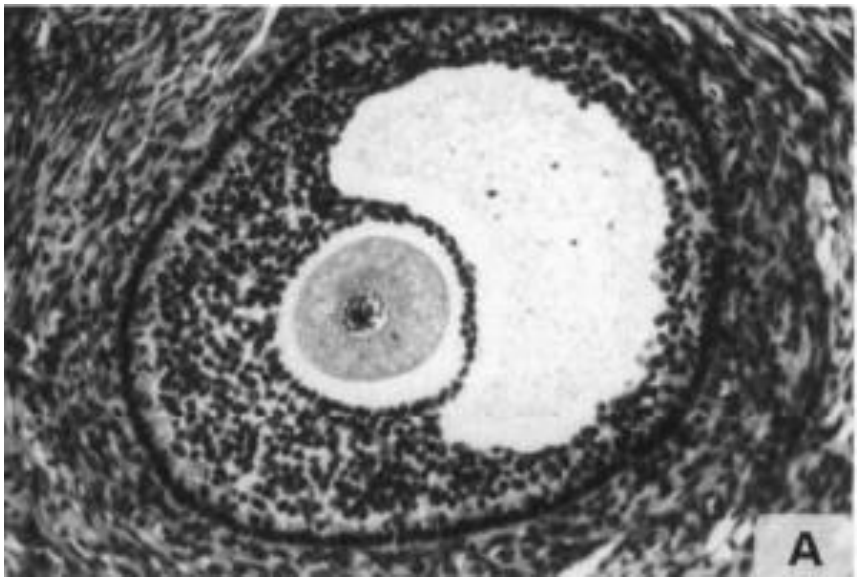
Το **δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο (secondary preantral follicle**) έχει διάμετρο περίπου 200μm, περιέχει ένα πρωτογενές ωοκύτταρο σταματημένο στην πρόφαση Ι, το οποίο είναι μεγαλύτερου μεγέθους και περιβάλλεται από περισσότερες από δυο στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται διαρκώς. Το ωοκύτταρο αρχίζει να παράγει τη διαφανή ζώνη (zona pellucida), δηλαδή ένα παχύ στρώμα γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως που το διαχωρίζει από την εσωτερική στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων χωρίς όμως να παρεμποδίζει την επικοινωνία του με αυτά. Στο στάδιο αυτό παρουσιάζονται για πρώτη φορά τα κύτταρα της θήκης, τα οποία είναι μεσεγχυματικής



Εικόνα 27. *Δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο (preantral stage).*

προέλευσης, συρρέουν γύρω από το ωοθυλάκιο μαζί με νεόπλαστα αγγεία και συνδετικό ιστό. Το ωοθυλάκιο εκτίθεται στο στάδιο αυτό για πρώτη φορά στο ορμονικό περιβάλλον της συστηματικής κυκλοφορίας και παράλληλα εμφανίζονται υποδοχείς ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH-R) στα κύτταρα της θήκης και υποδοχείς θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH-R) στα κοκκώδη κύτταρα. Παρόλαυτα, στο στάδιο αυτό (στάδιο προ άντρου, preantral stage) η εξέλιξη των ωοθυλακίων είναι ανεξάρτητη των γοναδοτροπινών. (Fortune 2003) (Rimon-Dahari et al. 2016)

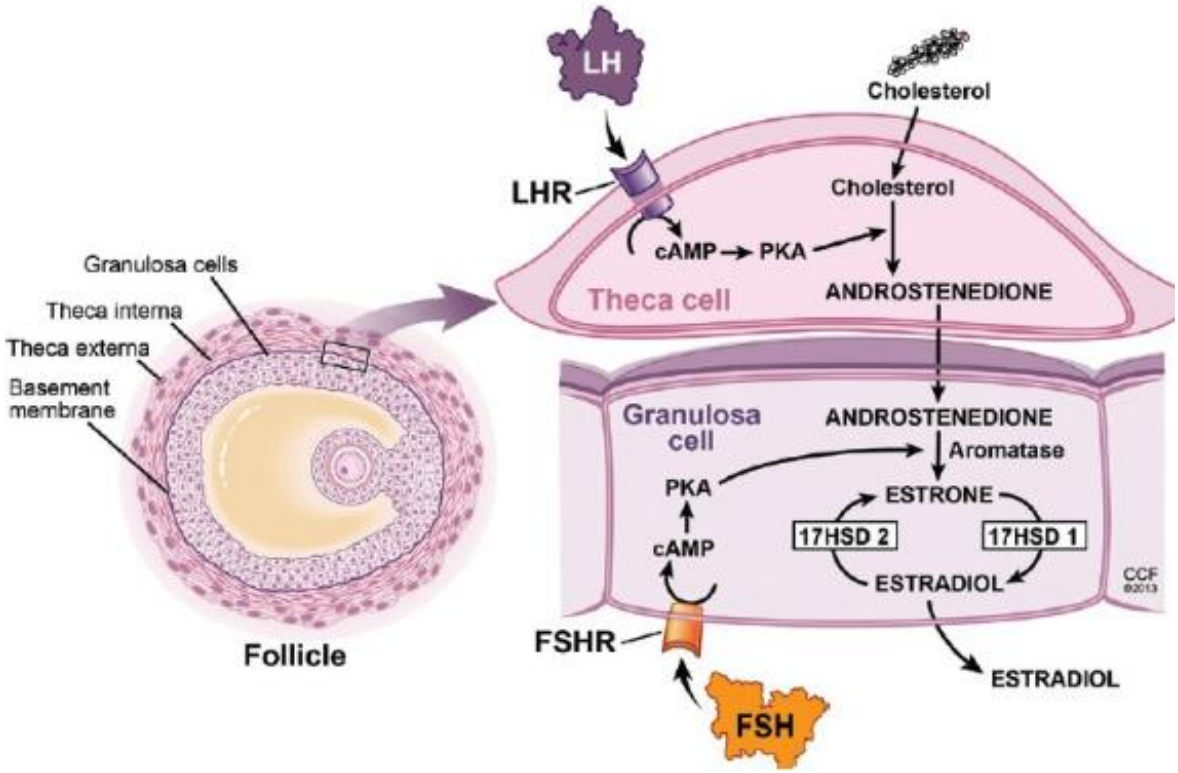
Σύντομα το δευτερογενές ωοθυλάκιο χωρίς άντρο, εξελίσσεται σε **ωοθυλάκιο με πρώιμο άντρο (antral stage).** Το ωοθυλάκιο στο στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από την ταχεία αύξηση τόσο των κοκκωδών κυττάρων που ξεπερνούν τα 10 εκατομμύρια σε αριθμό, όσο και των κυττάρων της θήκης που διαφοροποιούνται σε κύτταρα έσω (theca interna) και έξω θήκης (theca externa), αλλά και από την εμφάνιση του πρώιμου άντρου. Αρχικά, σχηματίζονται στο ωοθυλάκιο μικρές κοιλότητες γεμάτες υγρό, οι οποίες σταδιακά μεγαλώνουν και συνενώνονται σχηματίζοντας μια μεγαλύτερου μεγέθους κοιλότητα, γνωστή και ως πρώιμο άντρο.(Rimon-Dahari et al. 2016)



***Εικόνα 28**. Ανθρώπινο ωοθυλάκιο με πρώιμο άντρο.*

Το πρώιμο άντρο περιέχει στεροειδή, πρωτεϊνες, ηλεκτρολύτες, πρωτεογλυκάνες και αυξητικούς παράγοντες.(Martini et al. 1994) Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από το σχηματισμό του πρωτογενούς ωοθυλακίου έως το σχηματισμό του πρώιμου άντρου είναι περίπου 120 ημέρες.(Alain Gougeon 1996) Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων από το στάδιο σχηματισμού του πρώιμου άντρου μέχρι την ωοθυλακιορρηξία υπόκειται σε ενδοκρινικό έλεγχο από τις γοναδοτροφίνες, LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) και FSH (ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη) και κυρίως από την FSH. Η FSH είναι απαραίτητη για την επιβίωση και των πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, την παραγωγή οιστογόνων και την έκφραση LH υποδοχέων στα κύτταρα της θήκης.(Rimon-Dahari et al. 2016) Παράλληλα, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μιας ομάδας δέκα περίπου κοιλοτικών ωοθυλακίων (small antral follicles) στην αρχή κάθε γεννητικού κύκλου, από τα οποία θα προέλθει εκείνο που θα προχωρήσει τελικά σε ωοθυλακιορρηξία.(Alain Gougeon 1996)

Στο στάδιο αυτό, υποδοχείς της FSH υπάρχουν μόνο στα κοκκώδη κύτταρα, ενώ υποδοχείς της LH μόνο στα κύτταρα της θήκης. Σύμφωνα με την θεωρία «δυο κυττάρων-δυο γοναδοτροπινών» («Two cell - two gonadotropin hypothesis») η βιοσύνθεση οιστρογόνων στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο απαιτεί τη συνεργασία των κυττάρων της έσω θήκης και των κοκκωδών κυττάρων. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται υπό των έλεγχο των γοναδοτροπινών. Πιο συγκεκριμένα, η LH επιδρά στα κύτταρα της θήκης, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους και την σύνθεση ανδρογόνων. Τα παραγόμενα ανδρογόνα, ανδροστενδιόνη και τεστοστερόνη, διαχέονται στα γειτονικά κοκκώδη κύτταρα, όπου μετατρέπονται μέσω της δράση αρωματοποιών ενζύμων σε οιστρόνη και οιστραδιόλη.

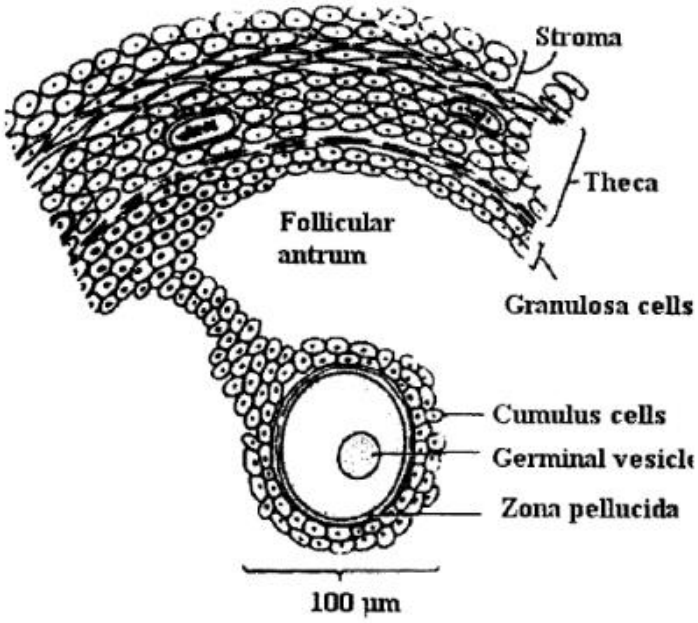


Εικόνα 29. *Υπόθεση "Δύο κυττάρων- Δύο γοναδοτροπινών".*

Έχει φανεί ότι κυρίαρχο τελικά ωοθυλάκιο είναι το ωοθυλάκιο εκείνο, το οποίο υπό την επίδραση της FSH αναπτύσσει γρηγορότερα αρωματοποιά ένζυμα στα κοκκώδη κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να αποκτά οιστρογονική δραστηριότητα, μετατρέποντας τα ανδρογόνα που παράγονται στα κύτταρα της θήκης σε οιστρογόνα, πιο νωρίς από τα υπόλοιπα ωοθυλάκια Το ωοθυλάκιο αυτό παρεμποδίζει την ωρίμανση των υπόλοιπων ωοθυλακίων μέσω παλίνδρομης αλληλορύθμιση της έκκρισης FSH από τα υψηλά επίπεδα παραγόμενης οιστραδιόλης και ανασταλτίνης.

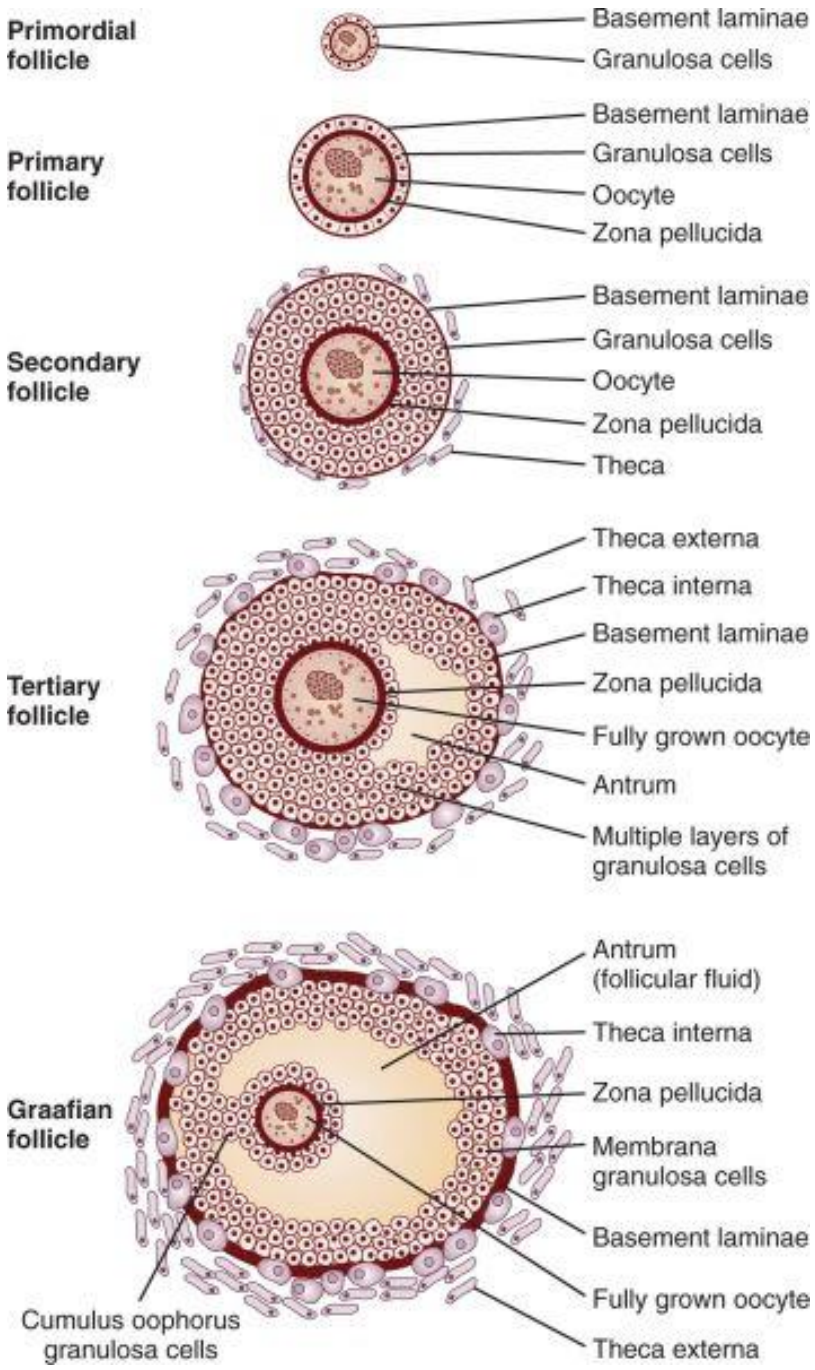
Η πλειοψηφία των ωοθυλακίων με άντρο υφίστανται ατρησία και μόνο λίγα από αυτά προχωρούν στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Τα ωοθυλάκια με πρώιμο άντρο που θα προχωρήσουν υπόκεινται σε έντονα πολλαπλασιαστικές και διαφοροποιητικές διεργασίες που οδηγούν γρήγορα σε περισσότερο ώριμες μορφές, με μεγαλύτερο άντρο.[5]

Το ωοκύτταρο εντοπίζεται μέσα στο αυξανόμενου μεγέθους άντρο και περιβάλλεται από κοκκώδη κύτταρα τα οποία σχηματίζουν έναν μίσχο, το ωοφόρο λοφίδιο (cumulus oophorous), που συνδέει τα κύτταρα της θήκης με το ωοκύτταρο. Η κοιλότητα του άντρου διαρκώς αυξάνει σε μέγεθος και το ωοθυλακικό υγρό είναι ελαφρά ιξώδες και πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ, στεροειδή, αυξητικούς παράγοντες και γοναδοτροπίνες. Τα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων αυτών εκφράζουν υψηλότερη συγκέντρωση υποδοχέων LH, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αιχμή της LH. Περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου με άντρο και την υψηλότερη ευαισθησία στην LH οδηγεί στο σχηματισμό του **τριτογενούς ή γραφιανού ωοθυλακίου** (διάμετρος ~ 20 mm).(Alain Gougeon 1996) Κατά την αιχμή της LH, λίγο πριν την ωορρηξία, το ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση και δίνει γένεση στο δευτερογενές ωοκύτταρο. Αμέσως μετά το σχηματισμό του, το δευτερογενές ωοκύτταρο εισέρχεται στη δεύτερη μειωτική διάιρεση και παραμένει καθηλωμένο στο στάδιο της μετάφασης ΙΙ. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση θα ολοκληρθεί σε περίπτωση που επέλθει γονιμοποίηση.



Εικόνα 30. *Τριτογενές ωοθυλάκιο με διευρυμένο άντρο.*

Στη συνέχεια, στο γραφιανό ωοθυλάκιο, τα κύτταρα του ωοφόρου λοφιδίου πολλαπλασιάζονται, σχηματίζουν ένα άνοιγμα στο θυλάκιο (follicle rupture) από όπου εξωθείται το δευτερογενές ωοκύτταρο μαζί με ορισμένα κοκκώδη κύτταρα (σύμπλεγμα ωοκυττάρου-κοκκωδών, COC) και πραγματοποιείται η ωοθυλακιορρηξία. Το ωοθυλάκιο που διαρρήχθηκε και αποτελείται από τα εναπομείναντα κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης, θα υποστεί τελική διαφοροποίηση και θα μετατραπεί στο λεγόμενο ωχρό σωμάτιο (corpus luteum), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση στεοειδών ορμονών και κυρίως προγεστερόνης που προετοιμάζει το ενδομήτριο για την υποδοχή και την εμφύτευση του εμβρύου. (Fortune 2003)

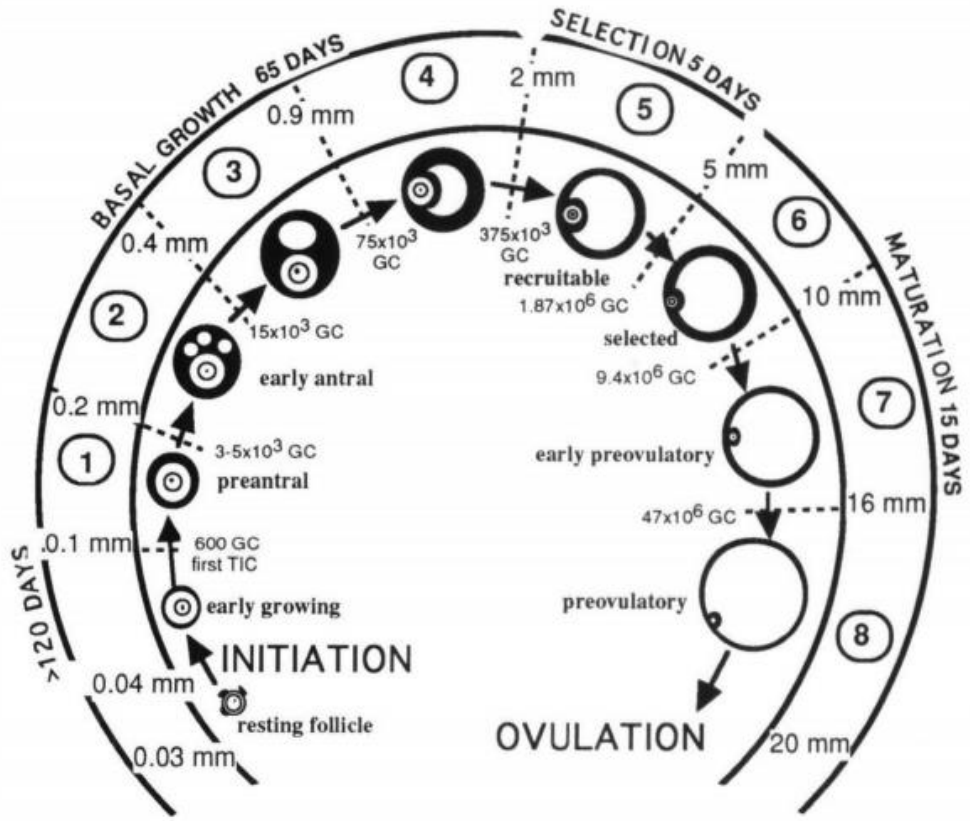


Εικόνα 31. *Στάδια ωοθυλακιογένεσης.*

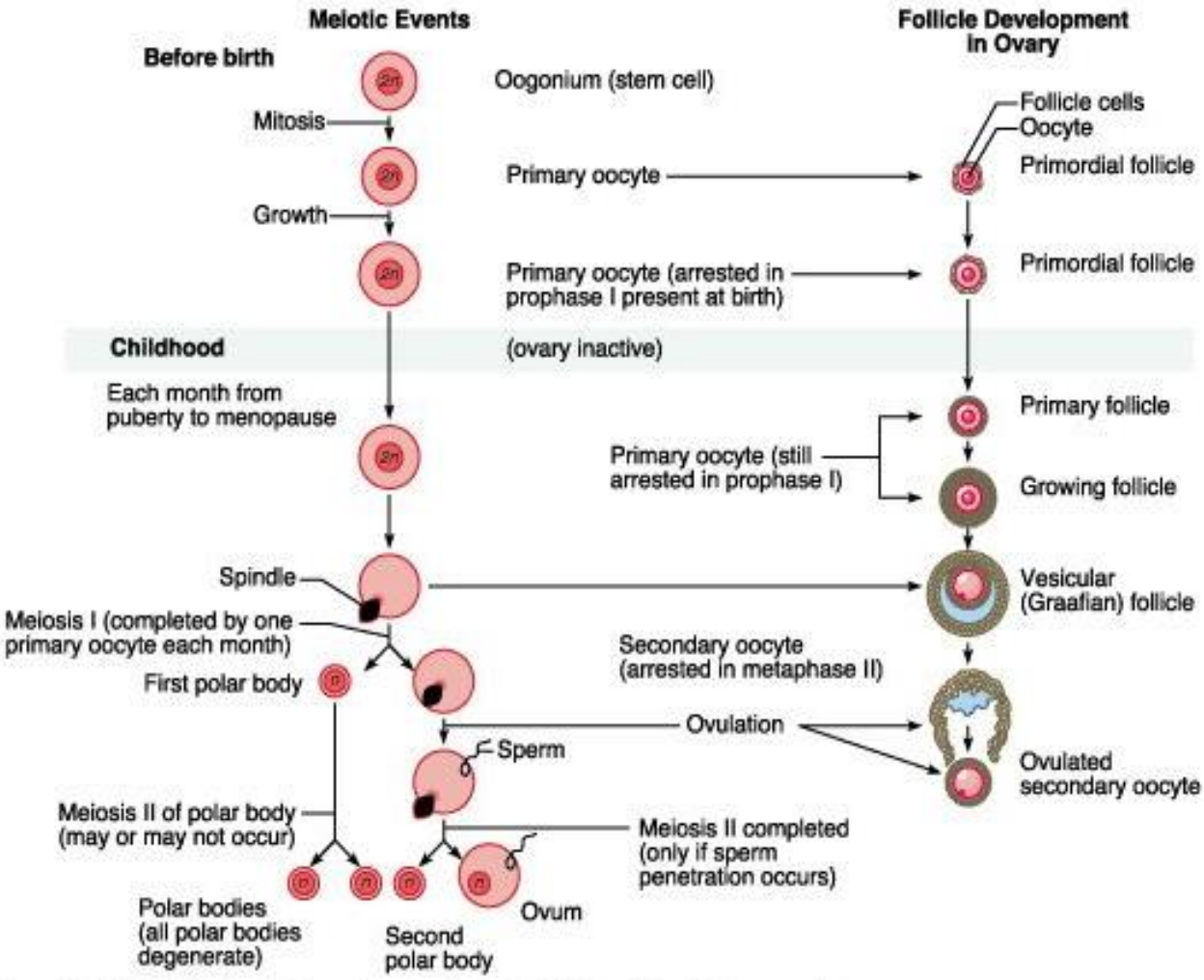
Συνοψίζοντας, από την στιγμή που τα αρχέγονα ωοθυλάκια εγκαταλείψουν τη δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων και εισέλθουν στην αρχική στρατολόγηση, τα περισσότερα θα φθάσουν έως το στάδιο του ωοθυλακίου με άντρο, όπου και θα εκφυλιστούν μέσω ατρησίας. Ένας μόνο μικρός αριθμός περίπου 10 ωοθυλακίων ανά μήνα θα εισέλθει στην κυκλική στρατολόγηση υπό την επίδραση των γοναδοτροπινών και θα αναπτυχθεί περαιτέρω. Εν τέλει, από αυτήν την μικρή ομάδα ωοθυλακίων όλα θα οδηγηθούν σε ατρησία με εξαίρεση το κυρίαρχο ωοθυλάκιο που θα καταλήξει σε ωοθυλακιορρηξία.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι το ωοκύτταρο ολοκληρώνει την ανάπτυξή του πριν από το ωοθυλάκιο, το οποίο συνεχίζει να αυξάνεται σε μέγεθος με τον συνεχή πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων που το αποτελούν. In vivo το μέγεθος του ωοθυλακίου αντανακλά το αναπτυξιακό δυναμικό του περιεχόμενου σε αυτό ωοκυττάρου. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του ωοθυλακίου, τόσο πιθανότερο είναι το ωοκύτταρο να ολοκληρώσει την ωρίμανσή του, να γονιμοποιηθεί, να αναπτυχθεί ομαλά στο προεμβρυϊκό στάδιο και να εμφυτευθεί επιτυχώς.(Hartshorne 1997) Η ωρίμανση των ωοκυττάρων συνοδεύεται από πολλαπλές σύνθετες κυτταρικές διαδικασίες. Αυτές περιλαμβάνουν την πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση και την παραγωγή οργανιδίων και RNA που υποστηρίζουν την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η πυρηνική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την επανέναρξη της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και την πρόοδο στην μετάφαση ΙΙ, ενώ η κυτταροπλασματική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του ωαρίου, το σχηματισμό προπυρήνων και την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη.

Συνολικά, η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης στον άνθρωπο αποτελεί μια μακρά διαδικασία με χρονική διάρκεια μεγαλύτερη από 220 ημέρες. Η μετάβαση από το πρωτογενές στο δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο υπολογίζεται να ξεπερνά τις 120 ημέρες, ενώ το διάστημα από το αρχέγονο στο πρωτογενές ωοθυλάκιο υπολογίζεται να είναι ακόμη μεγαλύτερο. Η μετάβαση από το δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο στο ωοθυλάκιο με πρώιμο άντρο διαρκεί περίπου 71 ημέρες, ενώ η μετάβαση του τελευταίο στο γραφιανό απαιτεί επιπλέον 14 ημέρες.



***Εικόνα 32**. Στάδια ανάπτυξης ανθρώπινων ωοθυλακίων συναρτήσει του χρόνου.*



Εικόνα 33. *Ωογένεση-Ωοθυλακιογένεση*

2.5. ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ ΚΑΙ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Μια αξιοσημείωτη και ιδιαιτέρως εντυπωσιακή ανακάλυψη των περασμένων ετών είναι ότι η ωοθυλακιογένεση ελέγχεται και από παράγοντες ανάπτυξης, που εκκρίνονται από το ωοκύτταρο.(Erickson and Shimasaki 2000) Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε από αυτούς τους παράγοντες, οι οποίοι είναι:

- ο αυξητικός παράγοντας ανάπτυξης- 9 (GDF-9, Growth Differentiation Factor-9) (McGrath, Esquela, and Lee 1995)
- η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη- 15 (BMP-15, Bone Morphogenetic Protein- 15) (Dube et al. 1998)
- η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη- 6 (BMP-6, Bone Morphogenetic Protein- 6) (Lyons, Pelton, and Hogan 1989)
- ο μετατρεπτικός πράγοντας ανάπτυξης β2 (TGF-b2, Transforming Growth Factor- b2) (Schmid et al. 1994)
- ο παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών-8 (FGF-8, Fibroblast Growth Factor- 8)

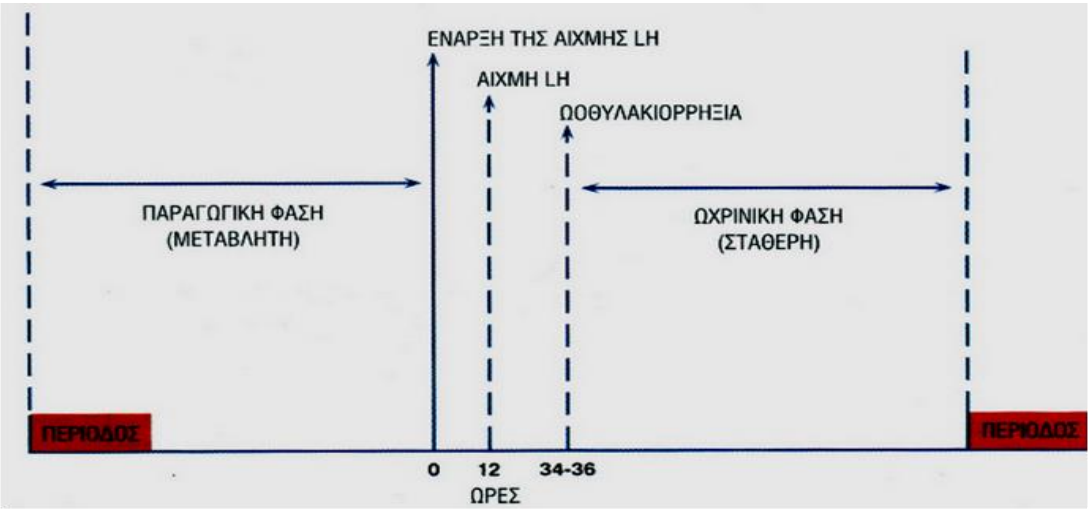
Οι παράγοντες GDF-9 και BMP-15 εκφράζονται μόνο στο ωοκύτταρο, ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF-β και αποτελούν απαραίτητα μόρια για την ομαλή διεξαγωγή της ωοθυλακιογένεσης. Αν και εκφράζονται μόνο στο ωοκύτταρο, επιδρούν και στα κοκκώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο φυσιολογικός ρόλος του GDF-9 είναι η διέγερση του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων κατά την φάση της ανάπτυξης του ωοθυλάκιου, που είναι ανεξάρτητη της δράσης των γοναδοτροπινών. Από την άλλη, ο παράγοντας BMP-15 πιθανόν επηρεάζει τη μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων in vitro. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παραουσιάζει το γεγονός, ότι οι δυο αυτοί παράγοντες επιφέρουν αλλαγές στη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, μια διαδικασία που επηρεάζεται από τη δράση της FSH. (Otsuka et al. 2000)

ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

3. ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΜΜΗΝΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Οι αναπαραγωγικές διαδικασίες στη γυναίκα χαρακτηρίζονται από μια κυκλική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, η οποία αποδίδεται με τον όρο **έμμηνος ή καταμήνιος κύκλος.** Η κυκλική αυτή λειτουργία αποσκοπεί στην παραγωγή ώριμων ωαρίων, στην έκκριση και ρύθμιση των ορμονών που σχετίζονται με τις αναπαραγωγικές διαδικασίες και στην προετοιμασία του αναπαραγωγικού συστήματος για επίτευξη γονιμοποίησης, εμφύτευσης του εμβρύου και επιτυχούς κυήσεως. Σε περίπτωση μη επίτευξης κυήσεως, αποβάλλεται η επιφανειακή στιβάδα του ενδομητρίου με μικρή ποσότητα αίματος που καλείται έμμηνος ρύση. Τα φαινόμενα αυτά επαναλαμβάνονται από την εμμηναρχή έως και την εμμηνόπαυση και το σύνολο της διαδικασίας βρίσκεται υπό τον έλεγχο ορμονών, ώστε τα επιμέρους στάδια του κύκλου να πραγματοποιούνται συντονισμένα. Η διάρκεια του έμμηνου κύκλου ορίζεται από την πρώτη μέρα της εμμήνου ρύσεως έως την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως του επόμενου κύκλου και η μέση διάρκειά του κατά την αναπαραγωγική ηλικία είναι 28+/- 3 ημέρες.(B. G. Reed and Carr 2000)

Η συγχρονισμένη λειτουργία του άξονα Υποθάλαμος - Υπόφυση – Ωοθήκες καθίσταται αναγκαία στη ρύθμιση του καταμήνιου κύκλου. Ο υποθάλαμος παίζει καθοριστικό ρόλο απελευθερώνοντας την **εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών** (**GnRH**, Gonadotropin-Releasing Hormone). Η GnRH προσδένεται σε υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των γοναδοτρόπων κυττάρων του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση. Οι **γοναδοτροπίνες, LH και FSH** (**LH**, Luteinizing hormone, ωχρινοποιητική ορμόνη και **FSH**, follicle-stimulating hormone, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη) ρυθμίζουν την παραγωγή των γαμετών και των στεροειδών ορμονών του φύλου από τις γονάδες (ωοθήκες και όρχεις). Η GnRH παράγεται κατά ώσεις κάθε 120-150 λεπτά και η ασυνέχεια στην απελευθέρωσή της είναι καθοριστικής σημασίας για τη σύνθεση και την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών.(B. G. Reed and Carr 2000)



Διάγραμμα 3. *Φάσεις έμμηνου κύκλου.*

Ο έμμηνος κύκλος διαιρείται σε τρεις βασικές και διακριτές φάσεις:

1. Την **ωοθυλακική ή παραγωγική** φάση.
2. Την **ωοθυλακιορρηξία ή ωορρηκτική** φάση.
3. Την **ωχρινική ή εκκριτή** φάση.

3.1. Ωοθυλακική – Παραγωγική Φάση

Η ωοθυλακική είναι η φάση του κύκλου κατά την οποία πραγματοποιείται η ωρίμανση των ωοθυλακίων και η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου που προορίζεται για ωορρηξία. Διαρκεί από την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως ($1^{η}$ ημέρα του κύκλου) μέχρι και την ωορρηξία ($14^{η}$ ημέρα του κύκλου).

Κοντά στο τέλος κάθε κύκλου, η συγκέντρωση της προγεστερόνης, των οιστρογόνων και της ινχιμπίνης Α στο πλάσμα αρχίζει να πέφτει (με την προϋπόθεση ότι δεν έχει επέλθει γονιμοποίηση), λόγω της σταδιακής αποδόμησης του ωχρού σωμάτιου. Παράλληλα, η έκκριση της GnRH αυξάνεται.(B. G. Reed and Carr 2000) Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην άνοδο των επιπέδων της FSH. Η έκκριση της FSH ξεκινά 1-2 ημέρες πριν το τέλος του προηγούμενου κύκλου («παράθυρο της FSH») και συνεχίζεται στον νέο κύκλο. Η συνεχόμενη έκκρισή της έχει ως αποτέλεσμα να αναπτύσσεται μια κοόρτη δευτερογενών ωοθυλακίων και να ωριμάζει με γρηγορότερο ρυθμό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, 6-12 ωοθυλάκια ωριμάζουν και αναπτύσσονται κάτω από την επίδραση της FSH στο τέλος της ωχρινικής φάσης του προηγούμενου κύκλου, αλλά μόνο ένα -το κυρίαρχο ωοθυλάκιο- επιλέγεται στα αρχικά στάδια της παραγωγικής φάσης για ωορρηξία.

Συγκεκριμένα, τα στάδια μέχρι την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου είναι τρια:

1ο στάδιο: Στρατολόγηση μιας ομάδας ωοθυλακίων μεταξύ $1^{ης}$ και $4^{ης}$ ημέρας του κύκλου.

2ο στάδιο: Επιλογή ενός (ή σπάνια δύο) από τα στρατολογημένα ωοθυλάκια (κυρίαρχο ωοθυλάκιο), το οποίο θα προχωρήσει σε ωορρηξία . Διαρκεί από την $5^{η}$ έως την $7^{η}$ ημέρα του κύκλου.

3ο στάδιο: Κυριαρχία πριν την ωορρηξία, όπου το κυρίαρχο ωοθυλάκιο συνεχίζει να αυξάνεται σε μέγεθος έναντι των υπόλοιπων ωοθυλακίων. Διαρκεί από την $8^{η}$ ημέρα του κύκλου ως την ωορρηξία.

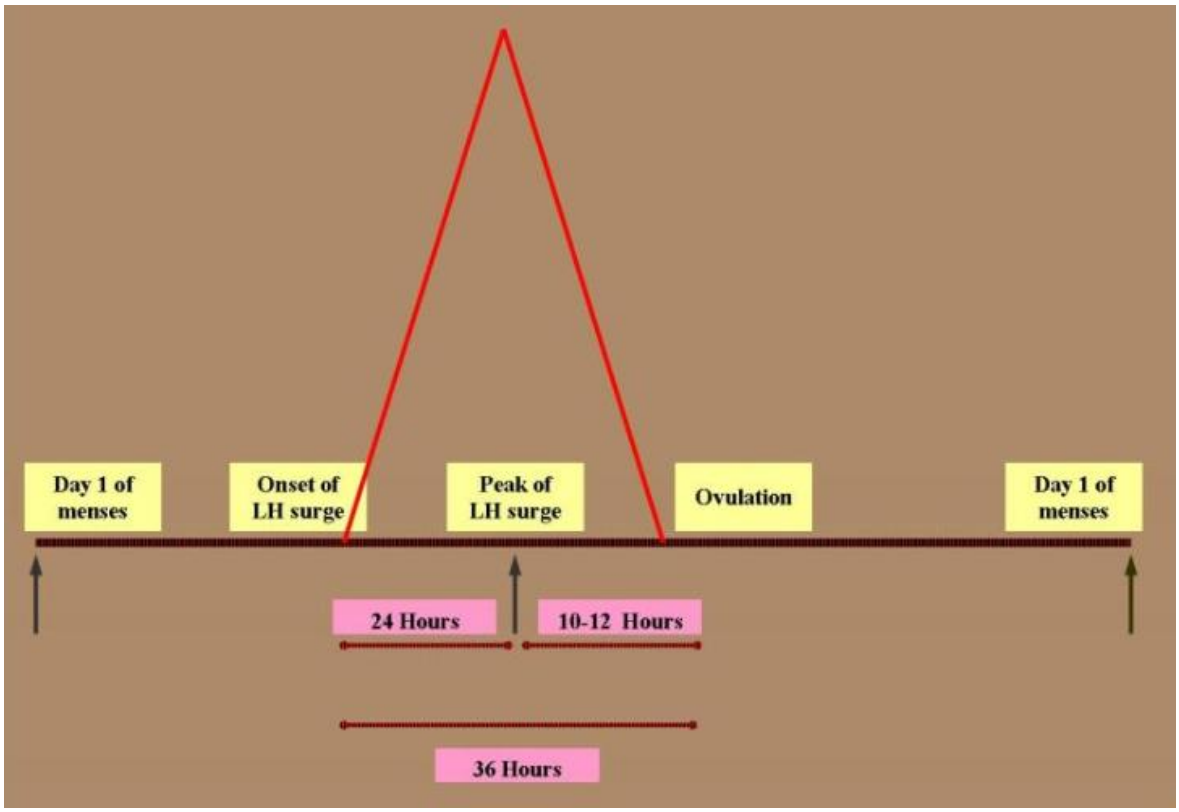
Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, στη φάση της κυριαρχίας, εκκρίνει οιστρογόνα, τα οποία ασκούν αρνητική ρύθμιση στην έκκριση των γοναδοτροφινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η έκκριση των γοναδοτροφινών να μην επαρκεί για την υποστήριξη της ανάπτυξης των μικρότερων ωοθυλακίων, τα οποία εν τέλει υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (ατρησία). Παράλληλα, το κυρίαρχο θυλάκιο ευαισθητοποιείται περισσότερο στην FSH, καθώς ο αριθμός των κοκκωδών του κυττάρων και των υποδοχέων FSH αυξάνονται αισθητά και τελικά παράγει αυξημένες ποσότητες οιστρογόνων που αγγίζουν την μέγιστη τιμή τους 24-36 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία. Στο ίδιο χρονικό διάστημα και πριν την ωορρηξία, το GV ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεσή του. Τέλος, στο

διάστημα αυτό εμφανίζονται στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων υποδοχείς LH, χάρη στη συνεργιστική δράση FSH και οιστρογόνων. (B. G. Reed and Carr 2000) (Salha 1998) Η αύξηση των υποδοχέων LH επάγει την παραγωγή προγεστερόνης και 17-υδροξυπρογεστερόνης. Τελικά, η προγεστερόνη δρα συνεργιστικά με την οιστραδιόλη και μέσω ενός μηχανισμού θετικής παλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) αυξάνουν περαιτέρω τα επίπεδα της LH. Εν ολίγοις, με την πρόοδο της ωοθυλακικής φάσης, τα επίπεδα της FSH πέφτουν ενώ τα επίπεδα της LH αυξάνονται μέχρι να φθάσουν στη μέγιστη τιμή τους (αιχμή LH).

Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο αυξάνει σε μέγεθος κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης και η αύξηση αυτή οφείλεται κατά βάση στην εισροή ωοθυλακικού υγρού στο άντρο. Το προ-ωορρηκτικό ωοθυλάκιο καλείται γρααφιανό, έχει διάμετρο μεγαλύτερη από 15 χιλιοστά και εντοπίζεται στην επιφάνεια της ωοθήκης με τη μορφή κυστικού σχηματισμού.

3.2. Ωοθυλακιορρηξία – Ωορρηκτική Φάση

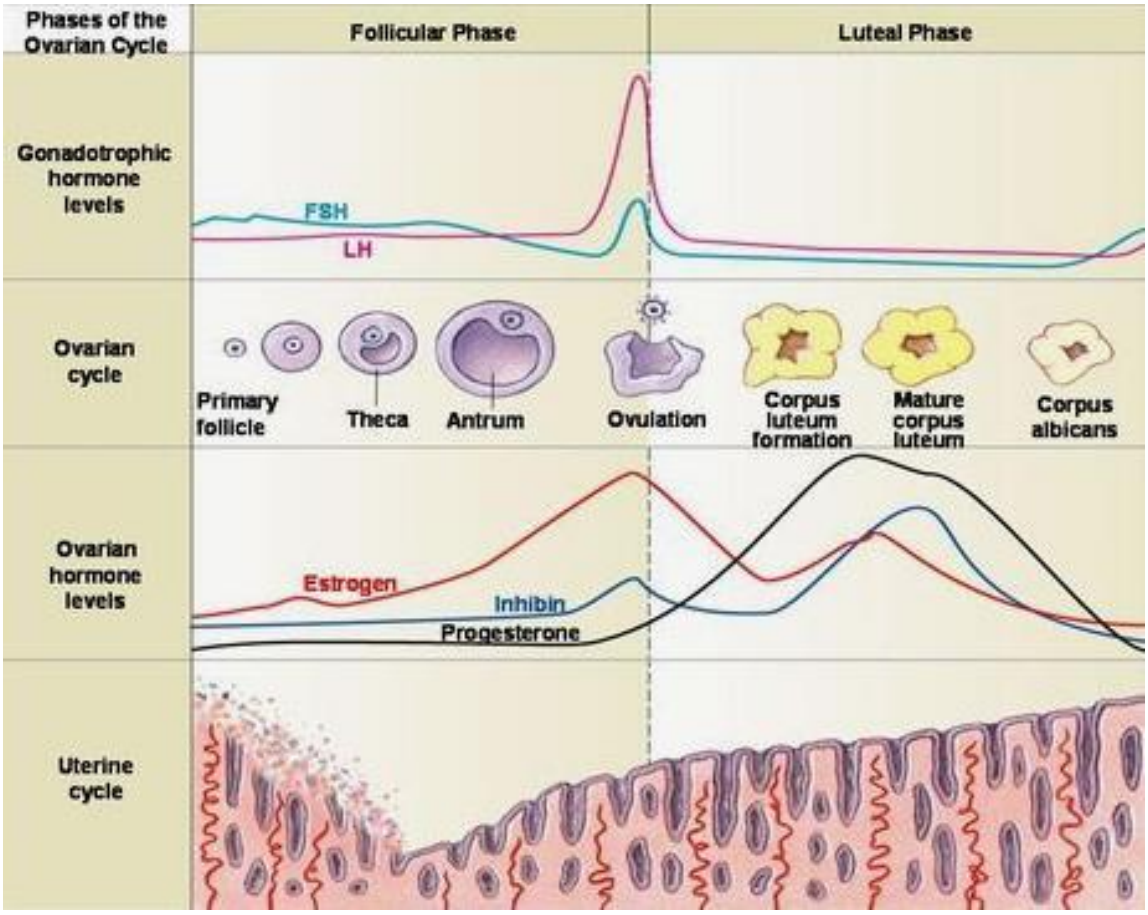
Η αιχμή της LH ξεκινά, όπως προαναφέρθηκε 36-48 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία και οδηγεί στην ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων. Επιπλέον, σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και τον σχηματισμό του πρωτογενούς ωοκυττάρου και του πρώτου πολικού σωματίου. Η άνοδος των επιπέδων της προγεστερόνης που συντελείται παράλληλα, επάγει την εκ νέου αύξηση των επιπέδων της FSH στη φάση της ωοθυλακιορρηξίας.(B. G. Reed and Carr 2000)



***Διάγραμμα 4**. Η έναρξη της αιχμής της LH απέχει περίπου 36 ώρες από την ωοθυλακιορρηξία.(B. G. Reed and Carr 2000)*

Ο όρος ωοθυλακιορρηξία ή απλούστερα ωορρηξία αναφέρεται στη ρήξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου και στην απελευθέρωση του ωοκυττάρου. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η ρήξη του ωοθυλακίου και η απελευθέρωση του ωοκυττάρου δεν έχει περιγραφεί με ακρίβεια. Παρόλαυτα, η διαδικασία έχει φωτογραφηθεί, πραγματοποιείται 36-48 ώρες μετά την έναρξη της ανόδου της LH και διαρκεί λίγο μόνο λεπτά. Πιστεύεται, ότι το cAMP (κυκλικό AMP) που εκκρίνεται από τα κοκκώδη κύτταρα υπό την δράση της LH, δρά συνεργιστικά με την προγεστερόνη και μαζί ενεργοποιούν πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η κολλαγενάση και η πλασμίνη. Τα ένζυμα αυτά προκαλούν πέψη του κολλαγόνου στο τοίχωμα του ωοθυλακίου, καθιστώντας το λεπτότερο και ασταθέστερο. Πιθανόν, συνεργιστικά δρουν και ο ιστικός παράγοντας ενεργοποίησης πλασμινογόνου (Tissue Plasminogen Activator, TPA), καθώς και ορισμένες προσταγλαδίνες και μεθυλικοί εστέρες.(B. G. Reed and Carr 2000) Το ωοθυλάκιο γεμίζει σταδιακά με όλο και περισσότερο υγρό με αποτέλεσμα η πίεση στο εσωτερικό του να αυξάνεται αισθητά και το ωοθυλάκιο να οδηγείται σε ρήξη. Το ωοκύτταρο, ελεύθερο πια από το ωοθυλάκιο στο οποίο ενυπήρχε, προσλαμβάνεται από τον ωαγωγό.

Στον άνθρωπο, η ωορρηξία πραγματοποιείται τυχαία και από τις δυο ωοθήκες καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Βάσει μελετών, πραγματοποιείται συχνότερα από την δεξιά ωοθήκη και στην περίπτωση αυτή συνδέεται με μεγαλύτερη πιθανότητα επίτευξης κύησης. (B. G. Reed and Carr 2000)΄



Εικόνα 34. *Διακύμανση ορμονών, εξέλιξη ωοθυλακίου και μεταβολές επιθηλίου της μήτρας κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου*

Λίγο πριν την αιχμή της LH, παρατηρείται η πρώτη έντονη πτώση των οιστρογόνων. Η πτώση αυτή οφείλεται είτε στην αρνητική ρύθμιση που ασκεί η LH στην έκφραση των υποδοχέων της, είτε στην άμεση παρεμπόδιση της σύνθεσης των οιστρογόνων από την προγεστερόνη. Η προγεστερόνη ευθύνεται και για την αύξηση των επιπέδων της FSH στην φάση αυτή. Η αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την απελευθέρωση του ωοκυττάρου από το ωοθυλάκιο, μέσω διέγερσης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και αύξησης των υποδοχέων της LH στα κοκκώδη κύτταρα. Λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία, παρατηρείται η δεύτερη πτώση των επιπέδων της LH, αλλά ο μηχανισμός που προκαλεί την πτώση αυτή δεν έχει περιγραφεί. Πιθανόν, η πτώση οφείλεται σε έλλειψη της θετικής ρύθμισης (positive feedback) των οιστρογόνων, σε αύξηση αρνητικής ρύθμισης (negative feedback) από την προγεστερόνη ή σε αρνητική ρύθμιση από τους υποδοχείς GnRH του υποθαλάμου.(B. G. Reed and Carr 2000)

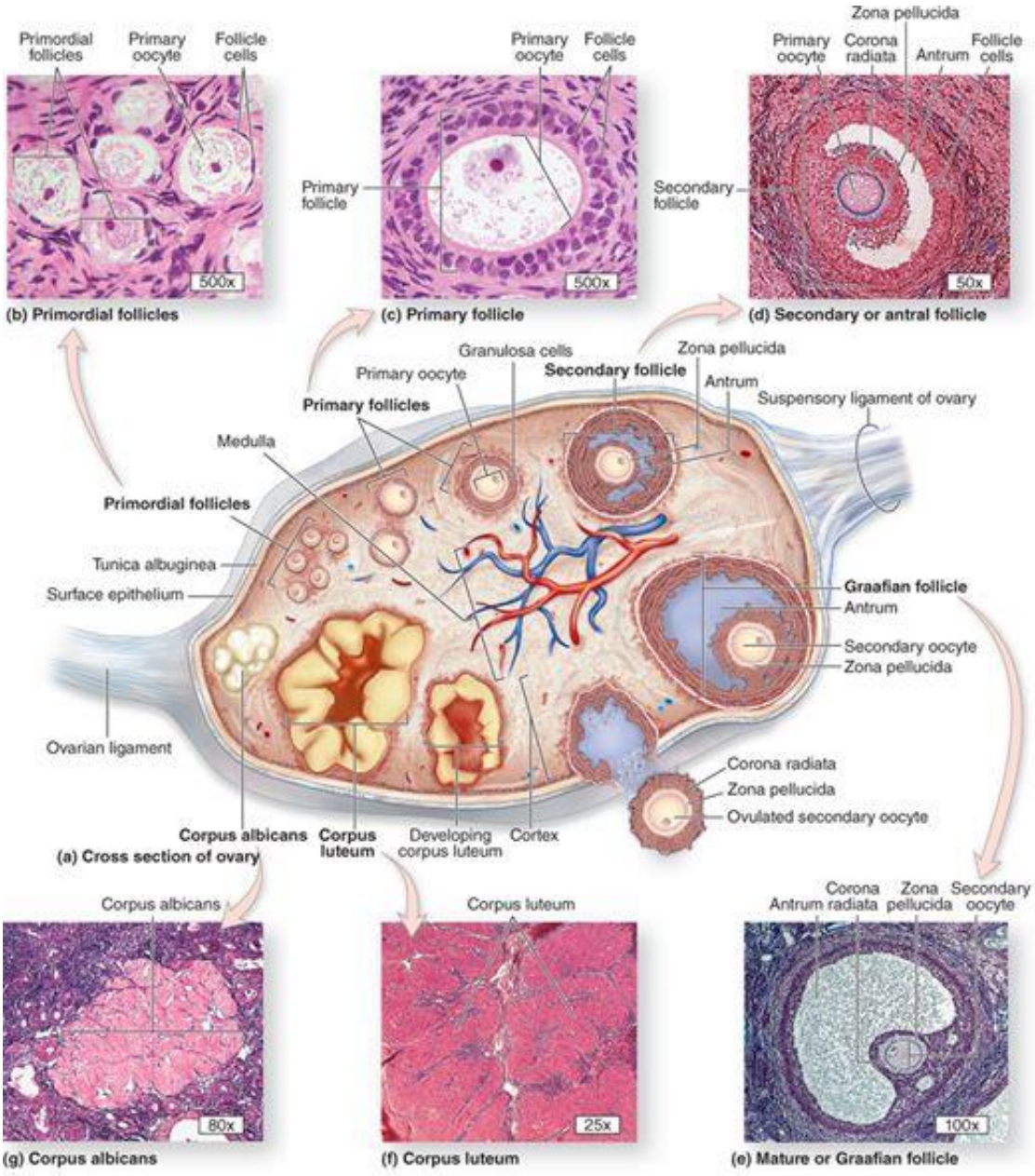
3.3. Ωχρινική – Εκκριτική Φάση

Αμέσως μετά την ωοθυλακιορρηξία και την απελευθέρωση του ωοκυττάρου, το εναπομείναν ωοθυλάκιο μετασχηματίζεται υπό την δράση των γοναδοτροπινών σε μια σημαντική εκκριτική δομή, το **ωχρό σωμάτιο**. Τα κοκκώδη κύτταρα που παρέμειναν στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο και δεν αποτέλεσαν συστατικό του συμπλέγματος ωοκυττάρου-κοκκωδών, συνεχίζουν να αυξάνουν σε μέγεθος, αποκτούν αδρή όψη και αρχίζουν να συσσωρεύουν μια χρωστική κίτρινου χρώματος, την λουτεϊνη. Τα ωχρινοποιημένα, πλέον, κοκκώδη κύτταρα, μαζί με τα ωχρινοποιημένα κύτταρα της θήκης και τα κύτταρα του στώματος συνιστούν το ωχρό σωμάτιο. Το ωχρό σωμάτιο αποτελεί μια δομή που υπάρχει παροδικά και εκκρίνει κατά κύριο λόγω προγεστερόνη. Βασική του λειτουργία είναι η προετοιμασία του ενδομητρίου για εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωοκυττάρου. Η διάρκεια εξαρτάται από την συνεχή υποστήριξη της LH και η λειτουργία του σταματά στο τέλος της ωχρινικής φάσης, εκτός και αν έχει επιτευχθεί εγκυμοσύνη. Στην περίπτωση αυτή, μετατρέπεται υπό την επίδραση οιστρογόνων και προσταγλαδινών στο αποκαλούμενο ωχρό σωμάτιο της εγκυμοσύνης. Η παραγόμενη κατά την εγκυμοσύνη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG, υποστηρίζει την ανάπτυξή του μέχρι να αναλάβει την παραγωγή προγεστερόνης ο πλακούντας.(B. G. Reed and Carr 2000)

Σε αντίθετη περίπτωση (μη επίτευξης εγκυμοσύνης), η διάρκεια ζωής του ωχρού σωμάτιου είναι 14+/-2 ημέρες. Σταδιακά, το ωχρό σωμάτιο εκφυλίζεται και μετασχηματίζεται σε μια μάζα ωχρινοποιημένων κυττάρων, το αποκαλούμενο λευκό σωμάτιο. Σταματά να παράγει προγεστερόνη και οιστρογόνα, γεμίζει με αίμα και μετατρέπεται σε αιμορραγικό ωχρό σωμάτιο. Επιπλέον, οι επιφανειακές στοιβάδες του ενδομητρίου απορρίπτονται, προκαλώντας την έμμηνο ρύση και ένας νέος κύκλος ξεκινά.

Οι περισσότερες μελέτες αποκαλύπτουν μια αξιοσημείωτη σταθερότητα στη διάρκεια της ωχρινικής φάσης, η οποία σε υγιή άτομα διαρκεί πάντα 13-14 ημέρες. Σε διάστημα 8-9 ημερών μετά την ωορρηξία, δηλαδή περίπου στο μέσο της ωχρινικής φάσης, παρατηρούνται στον ορό τα μέγιστα επίπεδα προγεστερόνης και οιστρογόνων και η έκκρισή τους πραγματοποιείται από το ωχρό σωμάτιο.(B. G. Reed and Carr 2000)

Συμπερασματικά, η διακύμανση των ορμονών κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου δεν είναι καθόλου τυχαία, αλλά απολύτως συντονισμένη. Ο ρόλος των γοναδοτροπινών στην εξέλιξη του ωοθυλακίου είναι ζωτικής σημασίας. Η FSH δρα συνεργιστικά με την LH με κοινό στόχο την ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Συγκεκριμένα, η FSH παίζει πρωταρχικό ρόλο στην στρατολόγηση των ωοθυλακίων και τελικά στην επιλογή και επικράτηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου, ενώ η LH παίζει καθοριστικό ρόλο στην ωρίμανσή του και στην ωοθυλακιορρηξία. Η διακύμανση, τέλος, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι εμφανής, με τα οιστρογόνα να παρουσιάζουν δυο μέγιστες τιμές, μία πριν την ωορρηξία και μια στο μέσο της ωχρινικής φάσης και την προγεστερόνη να αγγίζει τη μέγιστη τιμή της στην ωχρινική φάση παραγόμενη από το ωχρό σωμάτιο.



Εικόνα 35*. Τα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου και η εξέλιξή του σε ωχρό και λευκό σωμάτιο.*

ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

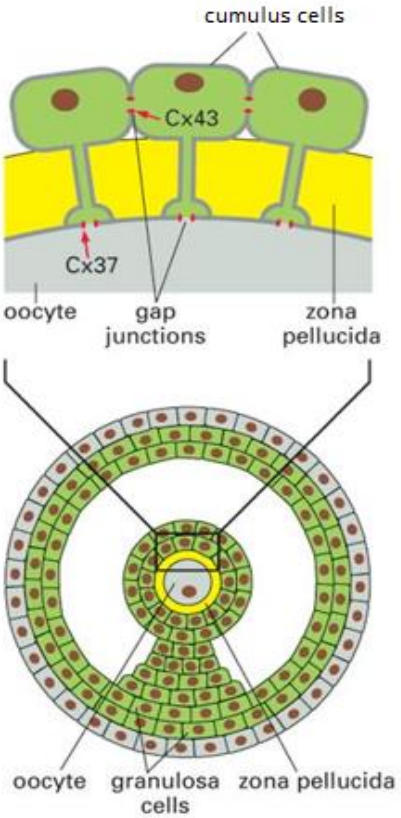
4. ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κοκκώδη κύτταρα περιβάλλουν το ωοκύτταρο και αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του ωοθυλακίου και την κύρια πηγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης στην ωοθήκη. Παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη δομή αλλά και τους υποδοχείς ορμονών που διαθέτουν και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, το σχηματισμό του ωχρού σωμάτιου και τη λειτουργία του. Τα κοκκώδη κύτταρα υποστηρίζουν το ωοκύτταρο και διαμορφώνουν ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την ομαλή ανάπτυξή του.

Κατά την ωοθυλακιογένεση, ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε πρωτογενές, δευτερογενές, τριτογενές και εφόσον τελικά επιλεχθεί, σε επικρατές - γραφιανό ωοθυλάκιο. Τα διάφορα στάδια εξέλιξης από τα οποία περνάει ένα ωοθυλάκιο παρουσιάζουν, όπως έχει ήδη αναλυθεί, πολλές δομικές και λειτουργικές διαφορές. Παρατηρώντας, λοιπόν, ένα ωοθυλάκιο κατά τη διάρκεια της δυναμικής διαδικασίας της ωοθυλακιογένεσης, είναι εμφανείς οι αλλαγές που υφίστανται τα κοκκώδη κύτταρα, από τα οποία τα ωοθυλάκια αποτελούνται.

Ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο αποτελείται από μια μόνο στοιβάδα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων, τα οποία άπτονται του ωοκυττάρου. Τα κύτταρα αυτά περιβάλλονται από μια βασική μεμβράνη, η οποία παρεμποδίζει την άμεση επαφή με άλλα κύτταρα και ως εκ τούτου την συνεργασία του αρχέγονου ωοθυλακίου με το ενδοκρινές σύστημα.(Reynolds and Redmer 1998) Η στρατολόγηση ενός αρχέγονου ωοθυλακίου συνοδεύεται από την μορφολογική αλλαγή στο σχήμα των κοκκωδών κυττάρων, τα οποία από επίπεδα μετατρέπονται σε κυβοειδή. Το πρωτογενές, πλέον, ωοθυλάκιο αποτελείται από κυβοειδή κοκκώδη κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης, FSH. Η έκφραση των υποδοχέων αυτών είναι ζωτικής σημασίας για την περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου, καθώς αυξημένες τιμές της FSH θα επιταχύνουν την ανάπτυξή του.

Στο στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου εμφανίζονται, επιπλέον, χασμοσύνδεσμοι (gap junctions) μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων, αλλά και μεταξύ ωοκυττάρου-κοκκωδών κυττάρων. Οι συνδέσεις αυτές είναι ενδοκυτταρικά κανάλια, αποτελούμενα από πρωτεΐνες, τις αποκαλούμενες κοννεξίνες που επιτρέπουν την διάχυση ιόντων, μεταβολιτών και μορίων μεταγωγής σήματος. Από τα κανάλια αυτά διέρχονται, επιπλέον, μόρια μικρού μοριακού βάρους, για παράδειγμα



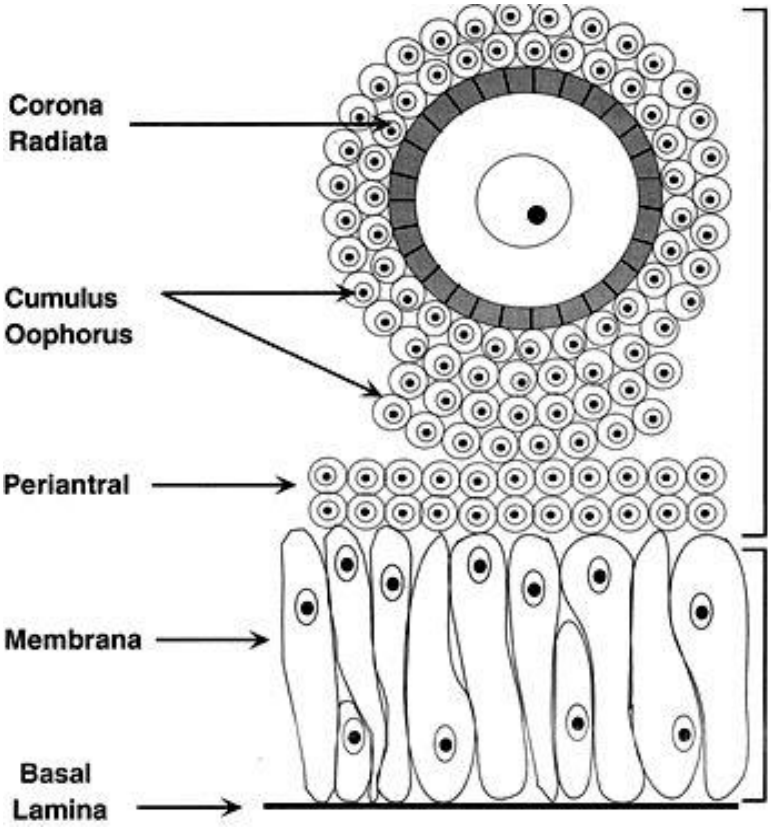
Εικόνα 2. Παρουσία χασμοσυνδέσεων μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και κοκκωδών κυττάρων - ωοκυττάρου.

νουκλεοτίδια και αμινοξέα και φθάνουν στο ωοκύτταρο, όπου χρησιμεύουν στη σύνθεση μακρομορίων αλλά και ριβοσωμικού και αγγελιαφόρου RNA. Η ύπαρξη χασμοσυνδέσμων είναι, επομένως, ζωτικής σημασίας για το ωοκύτταρο. Μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν κοννεξίνη-37 καταδεικνύουν, ότι η έλλειψη της πρωτεϊνης αυτής ευθύνεται για έλλειψη ώριμων ωοθυλακίων, αδυναμία ωοθυλακιορρηξίας, σχηματισμό ανώμαλων ωχρών σωμάτιων και ως εκ τούτου για στειρότητα στα θηλυκά πειραματόζωα. (Z. Huang and Wells 2010)

Καθώς προχωρά η ανάπτυξη του ωοθυλακίου, το πρωτογενές ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε δευτερογενές και η μετατροπή αυτή συνοδεύεται από τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, των οποίων η δομή και η μορφολογία αλλάζουν αρκετά και οι συνδέσεις τους ισχυροποιούνται. Το δευτερογενές ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη των κυττάρων της θήκης (έσω και έξω κύτταρα θήκης), αλλά και από τα κύτταρα στρώματος που εμφανίζονται γύρω από τη βασική μεμβράνη. Ένα πλήρως ανεπτυγμένο δευτερογενές ωοθυλάκιο αποτελείται από πέντε δομικά διακριτές μονάδες:

1. ένα πλήρως ανεπτυγμένο ωοκύτταρο που περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη (zona pellucida)
2. αρκετά στρώματα κοκκωδών κυττάρων
3. τη βασική μεμβράνη (basal lamina)
4. ένα στρώμα έσω (interna) κι ένα έξω (externa) κυττάρων θήκης
5. ένα σύστημα τριχοειδών αγγείων για την επικοινωνία του ωοκυττάρου, τόσο με το υπόλοιπο ωοθυλάκιο, όσο και με άλλους εξωκυττάριους παράγοντες

Το δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο εξελίσσεται σε ωοθυλάκιο με πρώιμο άντρο και τελικά σε τριτογενές ή γρααφιανό ωοθυλάκιο. Σε ένα επικρατές ωοθυλάκιο, τα κοκκώδη κύτταρα, αλλά και τα κύτταρα της θήκης πολλαπλασιάζονται με ταχύτατους ρυθμούς, δημιουργούν πολλαπλά, διαδοχικά στρώματα και διακρίνονται βάσει του καθορισμένου σχήματος και της συγκεκριμένης θέσης που διαθέτουν μέσα στο ωοθυλάκιο. Κατ' αυτόν τον τρόπο, σε ένα προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο διακρίνονται

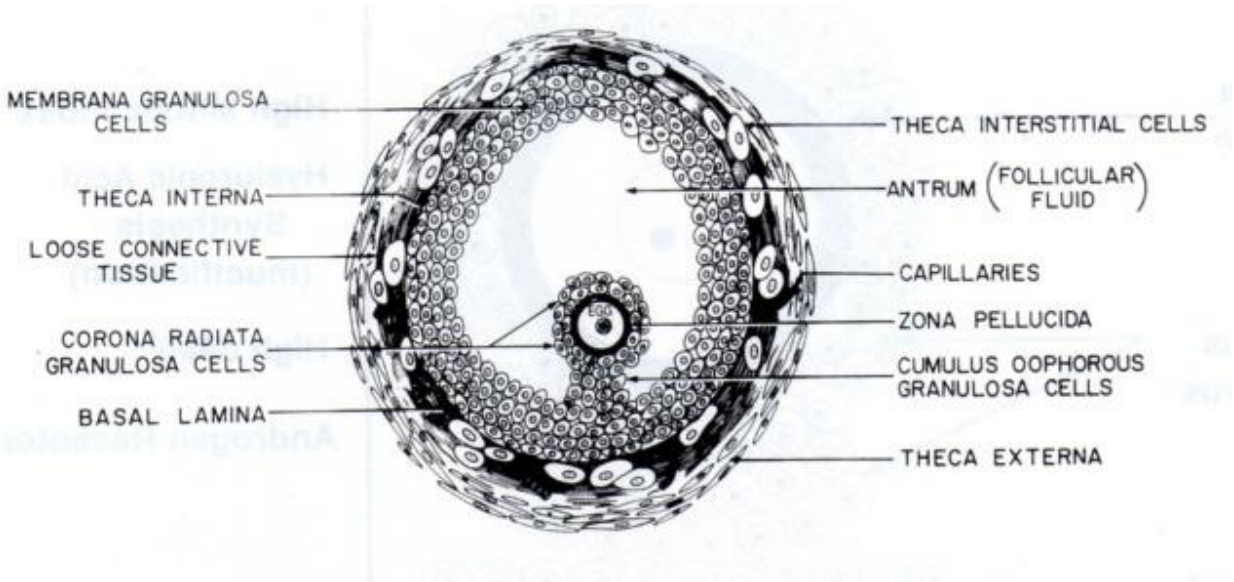


***Εικόνα 36**. Στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων γρααφιανού ωοθυλακίου.*

τέσσερα στρώματα κοκκωδών κυττάρων:

- **τα μεμβρανικά κοκκώδη (membrana/mural granulosa cells)** που αποτελούν το εξωτερικό στρώμα και έχουν κατά βάση στεροειδογενετικό ρόλο
- **τα κοκκώδη που περιβάλλουν τον άντρο (periantral)** και αποτελούν το πιο εσωτερικό στρώμα
- **τα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου (cumulus oophorus)**
- τα κοκκώδη που άπτονται του ωοκυττάρου και αποτελούν τον **ακτινωτό στέφανο (corona radiata).**

Τα τέσσερα μορφολογικά διακριτά στρώματα παρουσιάζουν λειτουργική ετερογένεια και εκφράζουν διαφορετικούς τύπους υποδοχέων. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των κοκκωδών κυττάρων είναι η έκφραση υποδοχέων της FSH.



Εικόνα 37. *Γρααφιανό ωοθυλάκιο. Χαρακτηρίζεται από το άντρο, το ωοκύτταρο, τους τέσσερις τύπους κοκκωδών κυττάρων και τα κύτταρα έσω και έξω θήκης*

Τα μελετώμενα, στην παρούσα εργασία, κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells), είναι τα κοκκώδη που περιβάλλουν το ωοκύτταρο και συνιστούν τον ωοφόρο δίσκο (ωοφόρο λοφίδιο, cumulus oophorous) και την στοιβάδα corona radiata. Το πλήρως ανεπτυγμένο ωοφόρο λοφίδιο επιτελεί τρεις βασικές βιολογικές λειτουργίες:

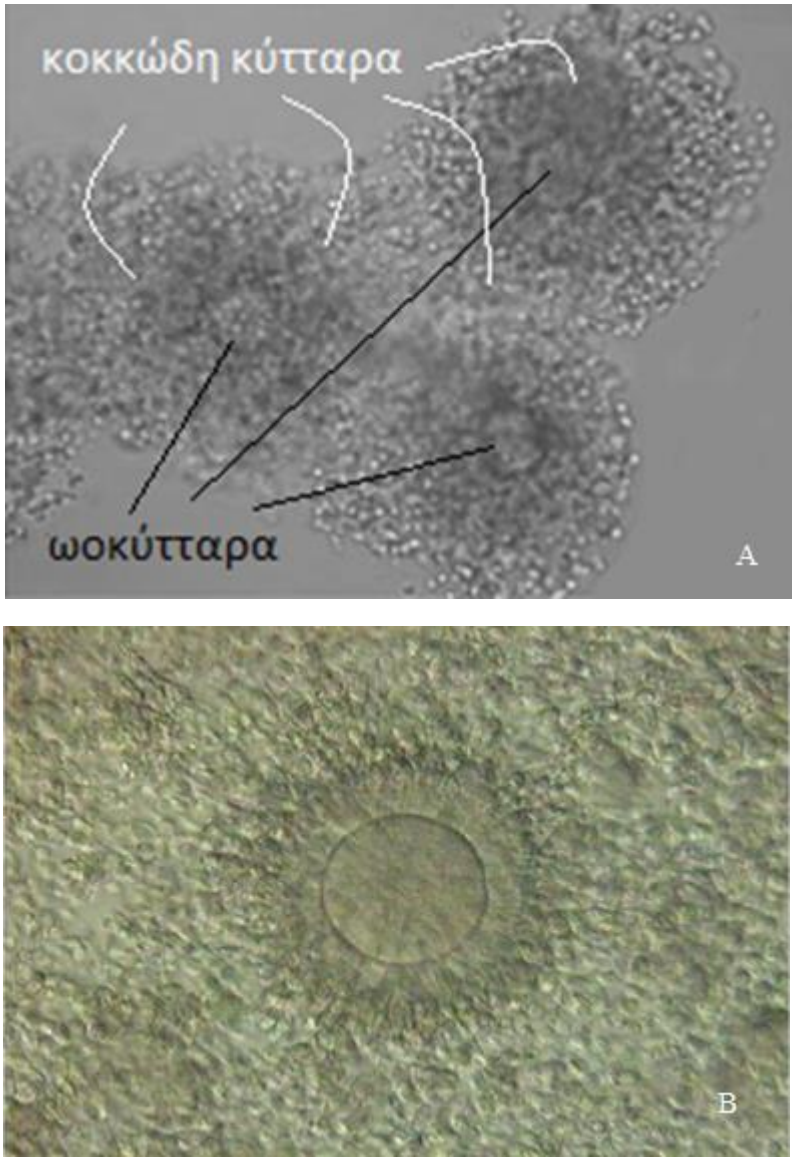
- Υποστηρίζει την ωρίμανση του ωοκυττάρου πριν την ωοθυλακιορρηξία.
- Καθοδηγεί το ωοκύτταρο στο εσωτερικό της σάλπιγγας κατά την ωορρηξία.
- Συμμετέχει στους πολύπλοκους μηχανισμούς με τους οποίους το σπερματοζωάριο εισέρχεται στο ωοκύτταρο, σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την ωορρηξία.

4.1.Ρόλος κοκκωδών κυττάρων στην ωρίμανση του ωοκυττάρου

Η ωρίμανση του ωοκυττάρου περιλαμβάνει δυο φάσεις, την πυρηνική και την κυτταροπλασματική ωρίμανση, οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενός ωαρίου με δυναμικό γονιμοποίησης. Η πυρηνική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την επανέναρξη και την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, την πρόοδο στην δεύτερη μειωτική διαίρεση και την καθήλωση στη μετάφαση ΙΙ. Η κυτταροπλασματική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του ωαρίου, τον σχηματισμό του προπυρήνα και την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη, εφόσον επιτευχθεί γονιμοποίηση.

Κοκκώδη Κύτταρα και Μειωτική Παύση Ωοκυττάρου (Προ-ωοθυλακιορρικτική φάση)

Ως **σύμπλοκο κοκκωδών-ωοκυττάρου** (**COC, cumulus-oocyte complex**) ορίζεται το σύμπλοκο που συνιστούν ένα ωοκύτταρο και τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν. Τα κοκκώδη αυτά επικοινωνούν στενά με το ωοκύτταρο, το τροφοδοτούν με τα απαραίτητα για την ανάπτυξή του συστατικά (ιόντα και μόρια μικρού μοριακού βάρους) και απομακρύνουν από αυτό τα άχρηστα παραπροϊόντα. Η επικοινωνία επιτυγχάνεται, όπως προαναφέρθηκε, χάρη στην ύπαρξη χασμοδυνδέσμων που εντοπίζονται μεταξύ των κοκκωδών, αλλά και μεταξύ κοκκωδών- ωοκυττάρου και είναι αμφίδρομη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να εκκρίνονται στο ωοκύτταρο διαλυτοί αυξητικοί παράγοντες απαραίτητοι για την διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των



***Εικόνα 38. Α και Β**: Σύμπλοκα ωοκυττάρων- κοκκωδών κυττάρων.*

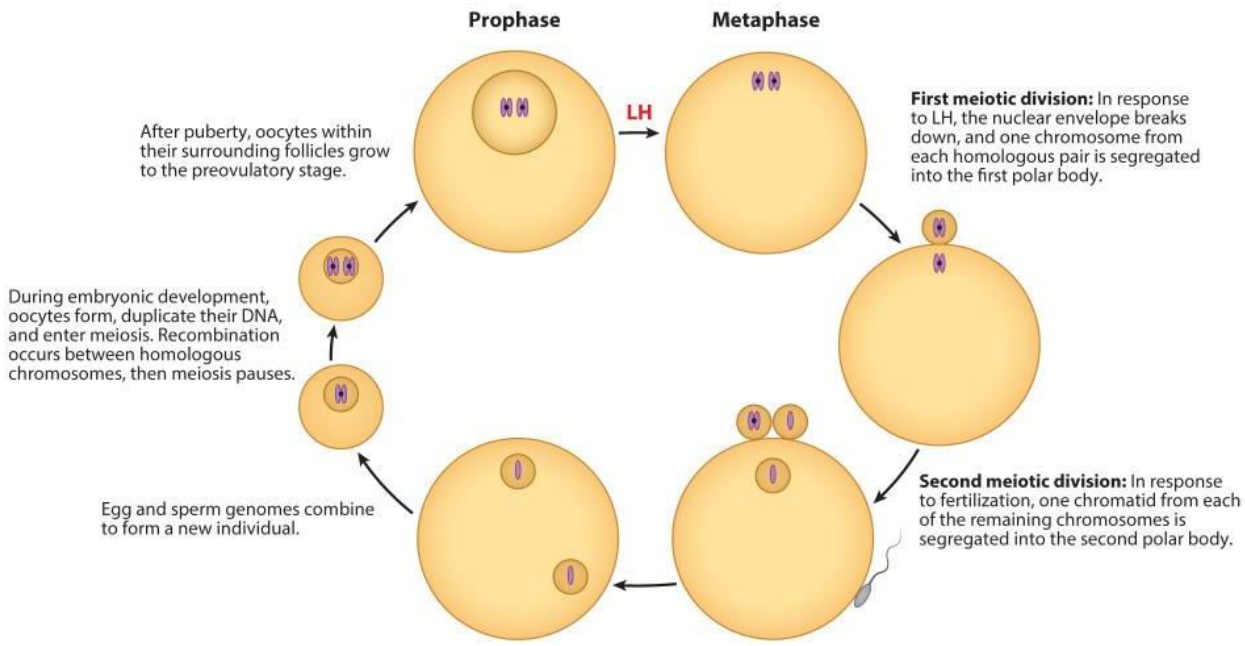
κοκκωδών κυττάρων, αλλά και για την καθήλωση του ωοκυττάρου σε μειωτική παύση.

Τα κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells) φαίνεται να έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης του ωοκυττάρου μέσω:

1. Διατήρησης του ωοκυττάρου σε μειωτική παύση.
2. Συμμετοχής στην επανέναρξη και ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης πριν την ωοθυλακιορρηξία.
3. Υποστήριξης της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης του ωοκυττάρου.

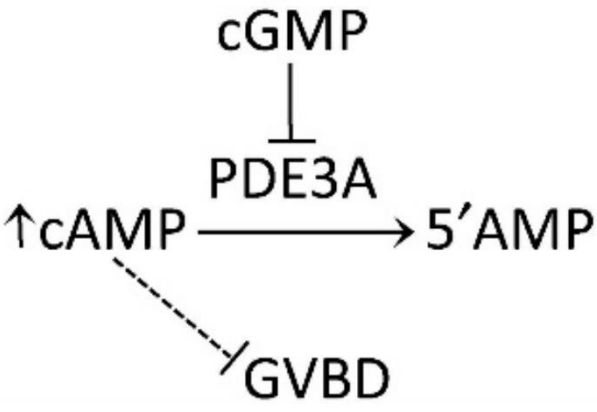
Ένα κρίσιμο γεγονός για την ωρίμανση ενός ωοκυττάρου με δυναμικό γονιμοποίησης είναι η **ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσής του** που πραγματοποιείται κατά την ωοθυλακιορρηξία. Η μείωση ξεκινά, όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά την $11^{η}$-$12^{η}$ εβδομάδα την εμβρυϊκής ανάπτυξης, όπου τα ωοκύτταρα εισέρχονται στην πρόφαση της $1^{ης}$ μειωτικής διαίρεσης και σταματούν στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης Ι. Σε αυτή τη φάση τα ωοκύτταρα είναι πρωτογενή και περιβάλλονται από μια σειρά αποπλατυσμένων πρόδρομων κοκκωδών κυττάρων, συνιστώντας έτσι τα αρχέγονα ωοθυλάκια, δηλαδή το αναπαραγωγικό δυναμικό μιας γυναίκας. Ο αριθμός των ωοθυλακίων αγγίζει τη μέγιστη τιμή του στην $20^{η}$ εβδομάδα της κύησης και από εκεί και έπειτα μειώνεται συνεχώς εξαιτίας της ατρησίας την οποία υφίστανται τα ωοθυλάκια. Τα ωοθυλάκια παραμένουν καθηλωμένα για χρόνια και τελικά στρατολογούνται και αναπτύσσονται περαιτέρω από την εφηβεία και έπειτα, φυσικά υπό την δράση των γοναδοτροπινών. Μόνο ένα -συνήθως- ωοκύτταρο αναπτύσσεται πλήρως και απελευθερώνεται από το ωοθυλάκιό του κατά την ωορρηξία, που ακολουθεί την αιχμή της LH. Το ωοκύτταρο αυτό ολοκληρώνει την $1^{η}$ μειωτική διαίρεση, εισέρχεται στην $2^{η}$ και παραμένει καθηλωμένο στην μετάφαση ΙΙ μέχρι την γονιμοποίηση οπότε ολοκληρώνει και την μείωση ΙΙ.

Οι Pinctus και Enzmann απέδειξαν μέσω των πειραμάτων τους το 1935 ότι τα ωοκύτταρα των θηλαστικών, όταν απομονωθούν από το ωοθυλακικό τους περιβάλλον, αυτόματα ολοκληρώνουν την μείωση Ι. Το εύρημα αυτό, οδήγησε στην υπόθεση ότι στα θηλαστικά, συγκεκριμένοι παράγοντες προερχόμενοι από το ωοθυλακικό υγρό ή/και από τα κοκκώδη κύτταρα παρεμποδίζουν την ωρίμανση των ωοκυττάρων και τα διατηρούν καθηλωμένα στην πρόφαση Ι. Ως εκ τούτου, διαπιστώθηκε ότι η επικοινωνία και η μεταφορά ουσιών μεταξύ κοκκωδών κυττάρων και ωοκυττάρου είναι ζωτικής σημασίας σε πολλά είδη θηλαστικών για τη **διατήρηση της μειωτικής παύσης** κα την **παρεμπόδιση της καταστροφής της πυρηνικής μεμβράνης (GVBD, germinal vesicle breakdown**). (Z. Huang and Wells 2010) (Tanghe et al. 2002; Pincus and Enzmann 1935)



Εικόνα 39. *Ο κύκλος ζωής του ωοκυττάρου.*

Η μειωτική παύση ενός ωοκυττάρου εξαρτάται, κατ' αρχας, από τα **υψηλά επίπεδα cAMP (cyclic adenosine 3′,5′-mono-phosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη ή κυκλικό AMP)** στο ωοκύτταρο.(DiLuigi et al. 2008) Το cAMP συντίθεται από ATP μέσω της αδενυλικής κυκλάσης και διατηρεί το ωοκύτταρο σε μειωτική παύση απενεργοποιώντας τον παράγοντα προώθησης της ωρίμανσης, **MPF (maturation promoting factor)**. Ο MPF είναι ένα σύμπλεγμα κυκλίνης-κινάσης που ενεργοποιεί τη μετάβαση του ωοκυττάρου από τη φάση G2 στη φάση M. Τα υψηλά επίπεδα του cAMP στο ωοκύτταρο διασφαλίζονται από την παρουσία του **cGMP (cyclic guanosine 3′,5′-monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη ή κυκλικό GMP).** Το cGMP παράγεται από τα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου, διαχέεται στο ωοκύτταρο μέσω χασμοσυνδέσμων και παρεμποδίζει την υδρόλυση του cAMP από την φωσφοδιεστεράση PDE3A.(Gilchrist et al. 2016)



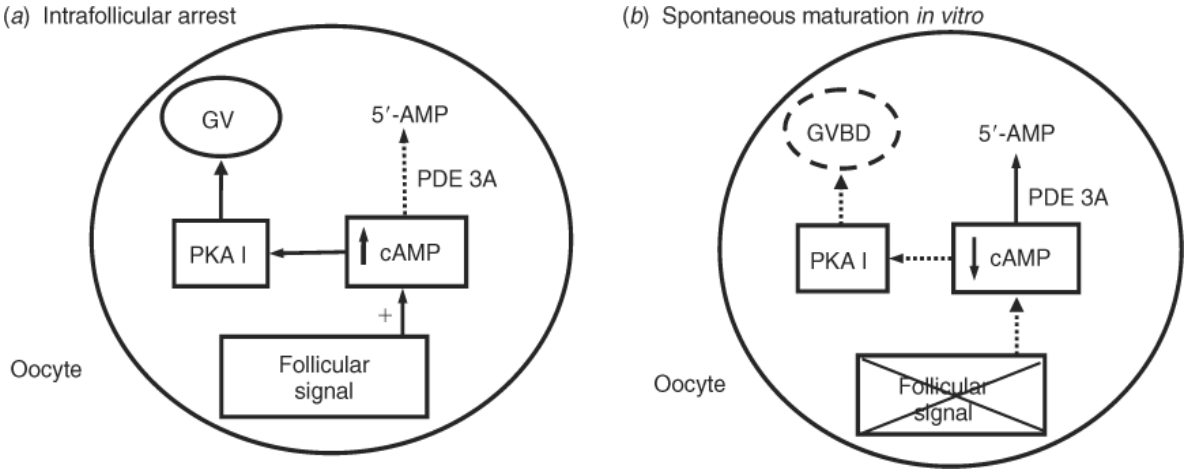
Διάγραμμα 5*. Συνεργασία cAMP και cGMP στην ρύθμιση της μειωτικής παύσης.*

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την μειωτική παύση στα ανθρώπινα ωοκύτταρα δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως εξαιτίας του περιορισμένου βιολογικού υλικού που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του περιορισμένου αριθμού μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί υποδεικνύουν ότι η μειωτική παύση των ανθρώπινων

ωοκυττάρων ρυθμίζεται με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που ισχύει στα ωοκύτταρα τρωκτικών. (DiLuigi et al. 2008)

Ως αποτέλεσμα χρόνιων μελετών, πιστεύεται ότι το απαραίτητο για την μειωτική παύση cAMP παράγεται στα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου και μεταφέρεται μέσω χασμοσυνδέσμων στο ωοκύτταρο των ποντικών. Τα τελευταία, όμως, χρόνια κερδίζει σημαντικό έδαφος η θεωρία ότι στα τρωκτικά, το κυκλικό AMP παράγεται στο ίδιο το ωοκύτταρο. Ο μηχανισμός βασίζεται στην ενεργοποίηση ενός υποδοχέα (G-protein coupled receptor) στο ωοκύτταρο που συνδέεται με μια G-πρωτεϊνη στα κοκκώδη κύτταρα, την ενεργοποιεί και επάγει την δράση της αδενυλικής κυκλάσης και ως εκ τούτου την παραγωγή κυκλικού AMP. Αν η δράση κάποιας από τις προαναφερθείσες πρωτεϊνες χαθεί, τότε αυτόματα το ωοκύτταρο που ενυπάρχει στο συγκεκριμένο ωοθυλάκιο αδυνατεί να παραμείνει καθηλωμένο στην μειωτική παύση. Με τον ίδιο μηχανισμό, τα ανθρώπινα ωοκύτταρα είναι ικανά να παράγουν cAMP. Έτσι, ωριμάζουν αυτόματα στην καλλιέργεια όταν απελευθερωθούν από το ωοθυλάκιό τους και διακοπεί η επαφή με τα κοκκώδη κύτταρά τους. (DiLuigi et al. 2008; Coticchio et al. 2015)

Οι Eppig και Downs πρότειναν το 1984 ότι στα θηλαστικά, το cAMP που παράγεται στα κοκκώδη κύτταρα (granulosa/ cumulus cells) επάγει την ενεργοποίηση ενός παράγοντα που παρεμποδίζει την ωρίμανση του ωοκυττάρου. Ο παράγοντας αυτός μεταφέρεται στο ωοκύτταρο και παραμένει ενεργός υπό την επίδραση μιας διαδικασίας καθοδηγούμενης από το κυκλικό AMP.(Tanghe et al. 2002)



Εικόνα 40. *Η μείωση στην συγκέντρωση του κυκλικού AMP στο εσωτερικό του ωοκυττάρου οδηγεί στη διάλυση του βλαστικού κυστιδίου και την επακόλουθη ωρίμανση του ωοκυττάρου.*

Ωστόσο, μια βασική διαφορά που παρουσιάζουν τα ανθρώπινα ωοκύτταρα σε σχέση με τα ωοκύτταρα των τρωκτικών είναι η διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Στον άνθρωπο, ένα ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση και αποκτά το μέγιστο μέγεθός του κατά τη διάρκεια ενός έμμηνου κύκλου που κατά κανόνα διαρκεί 28 ημέρες. Το ίδιο

συμβαίνει και σε ένα ωοκύτταρο τρωκτικού, με την ειδοποιό διαφορά ότι ο έμμηνος κύκλος του διαρκεί περίπου 4-5 ημέρες. Το χρονικό διάστημα, λοιπόν, που ένα ανθρώπινο ωοκύτταρο πρέπει να παραμείνει καθηλωμένο στην πρόφαση Ι είναι πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό που ένα ωοκύτταρο τρωκτικού απαιτεί. Ως εκ τούτου, είναι πιθανόν να δρουν επιπρόσθετοι μηχανισμοί, ώστε τα ανθρώπινα ωοκύτταρα να παραμένουν σε μειωτική παύση μέχρι την αιχμή της LH.(DiLuigi et al. 2008)

Είναι, επομένως, σαφές ότι τα κοκκώδη κύτταρα κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Η καθήλωση του ωοκυττάρου στην μειωτική παύση εξαρτάται άμεσα από τη διατήρηση του συμπλέγματος κοκκωδών κυττάρων- ωοκυττάρου (COC), το οποίο διασφαλίζει είτε την συνεχή ροή του cAMP στο ωοκύτταρο από τα σωματικά κύτταρα, είτε την παραγωγή του από το ίδιο το ωοκύτταρο. Τα cAMP και cGMP παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μείωσης και επακόλουθα στην πυρηνική ωρίμανση του ωοκυττάρου. Στα ανθρώπινα ωοκύτταρα η μειωτική παύση και η άρση της, καθώς και ο ακριβής τρόπος με τον οποίο τα κοκκώδη κύτταρα εμπλέκονται στην πυρηνική ωρίμανση αποτελούν πεδίο που δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, φαίνεται να ακολουθούν το πρότυπο των υπόλοιπων θηλαστικών, αλλά χρήζει περαιτέρω έρευνας και μελέτης (DiLuigi et al. 2008; Dekel 1988)

Κοκκώδη κύτταρα και ολοκλήρωση 1ης μειωτικής διαίρεσης (Φάση πριν και μετά την ωοθυλακιορρηξία)

Μελέτες σε ζωικά, αλλά και σε ανθρώπινα ωοκύτταρα καταδεικνύουν ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι απαραίτητη για την άρση της μειωτικής παύσης, την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, τη μετάβαση στο στάδιο της μετάφασης ΙΙ και την καθήλωση στο στάδιο αυτό ως την γονιμοποίηση. Η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης οδηγεί σε αποτυχία ενεργοποίησης του MPF (maturation promoting factor: παράγοντας προώθησης της ωρίμανσης).

Τα ωοκύτταρα δεν διαθέτουν, όπως είναι ευρέως γνωστό, υποδοχείς LH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η επαγωγή της ολοκλήρωσης της πρώτης μειωτικής να ρυθμίζεται από τα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου, δηλαδή από τα μεμβρανικά κοκκώδη και τα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου (granulosa cells, cumulus cells). Οι γοναδοτροπίνες επηρεάζουν, λοιπόν, την τύχη του ωοκυττάρου, ασκώντας όμως την επιρροή τους έμμεσα και συγκεκριμένα μέσω των κοκκωδών κυττάρων.(Tanghe et al. 2002) Τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου λοφιδίου (cumulus cells) λειτουργούν ως συνδετικός κρίκος του ωοκυττάρου με το ωοθυλακικό του περιβάλλον. Εν ολίγοις, «διαβάζουν» μέσω των υποδοχέων που διαθέτουν το σήμα αιχμής της LH και το μεταβιβάζουν στο ωοκύτταρο μέσω ενός δεύτερου σήματος.(Hillier 1994)

Ο τρόπος με τον οποίο οι γοναδοτροπίνες επάγουν την ολοκλήρωση της 1ης μειωτικής διαίρεσης αποτελεί πεδίο εκτενούς και χρόνιας έρευνας που έχει πραγματοποιηθεί κατά

βάσην σε πειραματόζωα, χάρη στην αφθονία του διαθέσιμου προς έρευνα βιολογικού υλικού.

Πρόσφατα, οι Mattioli και Barboni πρότειναν ότι μόλις η LH αγγίξει την μέγιστη τιμή της στο εσωτερικό του ωοθυλακίου, στο σύμπλεγμα κοκκωδών-ωοκυττάρου επάγονται συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης. Στα μονοπάτια αυτά, κεντρικοί διαμεσολαβητές είναι το cAMP, τα κατιόντα ασβεστείου (Ca^{2+}) και το δυναμικό των μεμβρανών.(Mattioli and Barboni 2000)

A. cAMP

Αμέσως μετά την αιχμή της LH, παρατηρείται στο εσωτερικό των σωματικών κυττάρων και του ωοκυττάρου μια παροδική αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP. Το παράδοξο σχετικά με το cAMP είναι ότι τα υψηλά επίπεδά του διατηρούν τη μειωτική παύση μέχρι το στάδιο πριν την ωορρηξία. Στην προωοθυλακιορρηκτική, όμως, φάση η αυξημένη του συγκέντρωση επάγει την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης. (Dekel 1988)

Αμέσως μετά τη διάλυση του πυρηνικού φακέλου (GVBD) τα επίπεδα του cAMP πέφτουν και ενεργοποιείται ο παράγοντας ωρίμανσης MPF. Τα επίπεδα του κυκλικού cAMP μειώνονται μέσω:

- Μείωσης των επιπέδων cGMP και επακόλουθης αύξησης της δράσης της φωσφοδιεστεράσης PDE3A.
- Απώλειας της δράσης των χασμοσυνδέσμων και επακόλουθη παρεμπόδιση της ροής του cAMP στο ωοκύτταρο.

B. Κατιόντα ασβεστίου (Ca^{2+})

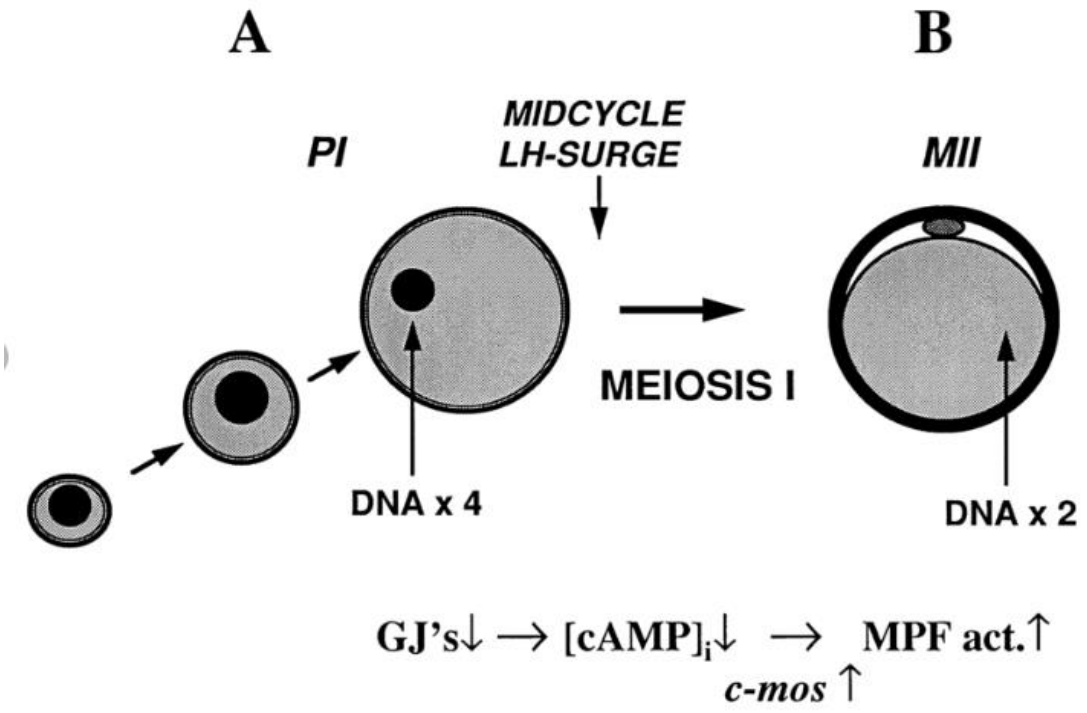
Η αιχμή της LH επάγει μια άμεση αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου στα κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells), η οποία σε σύντομο χρονικό διάστημα (5 λεπτών) ακολουθείται από αντίστοιχη αύξηση στο εσωτερικό του ωοκυττάρου. Το ωοκύτταρο, δηλαδή, «πληροφορείται» αμέσως για την επερχόμενη ωρίμανσή του, καθώς το σήμα της ωρίμανσης -τα κατιόντα ασβεστίου (Ca^{2+})- διαχέονται προς αυτό μέσω των χασμοσυνδέσμων.

Λίγες μόνο ώρες μετά την αιχμή της LH ακολουθεί και μια δεύτερη αύξηση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε αλλαγές στο δυναμικό των πλασματικών μεμβρανών των κοκκωδών κυττάρων και οδηγεί στη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης και στην ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Γ. Αλλαγές στο δυναμικό και στη δομή των μεμβρανών

Λίγες μόνο ώρες μετά την έκθεση στα αυξημένα επίπεδα της LH, η πολικότητα των πλασματικών μεμβρανών των κοκκωδών κυττάρων αλλάζει (αποπόλωση κυτταρικών μεμβρανών). Λόγω της άμεσης επαφής των μεμβρανών στο σύμπλεγμα κοκκωδών-ωοκυττάρου και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας που αυτή συνεπάγεται, σύντομα αλλάζει και η πολικότητα της μεμβράνης του ωοκυττάρου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διάλυση του πυρηνικού φακέλου (GVBD) και σε μια δεύτερη αύξηση της συγκέντρωσης των Ca^{2+} στο εσωτερικό του ωοκυττάρου (χοίρων).(Eppig 1982)

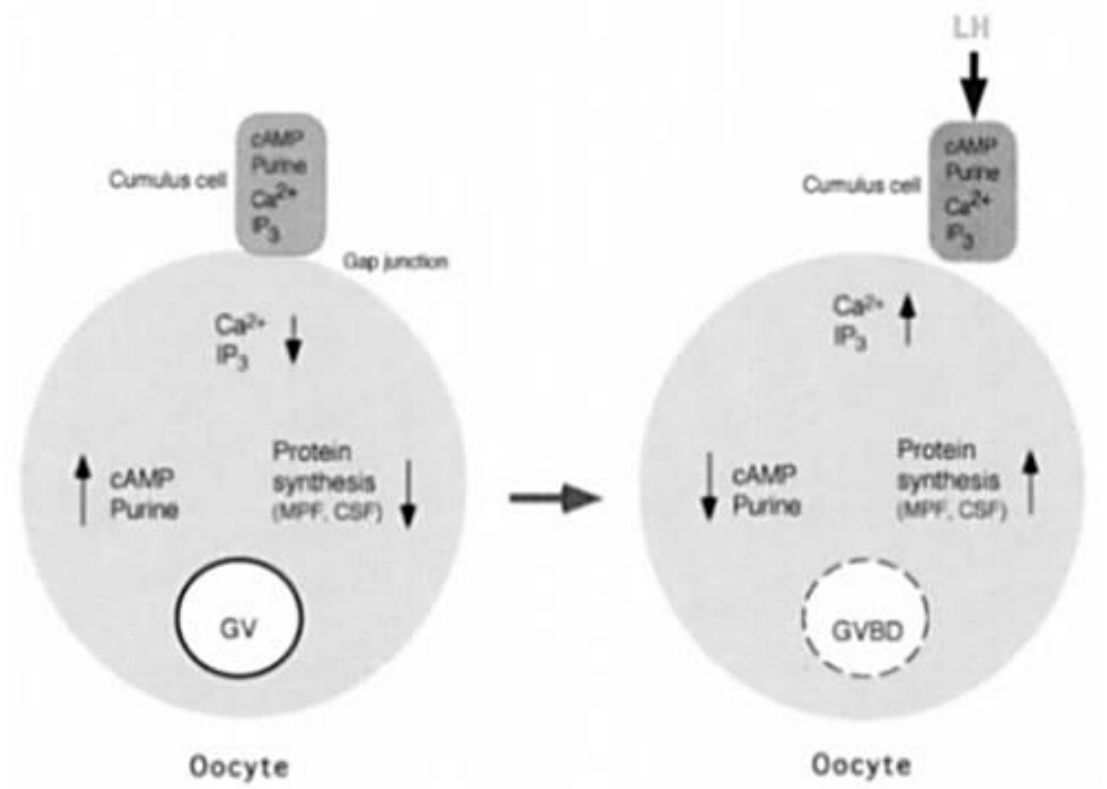
Ιδιαίτερα σημαντική καθίσταται και η αλλαγή στην διαπερατότητα των χασμοσυνδέσμων που ακολουθεί την αιχμή της LH. Για την ακρίβεια, η δράση των χασμοσυνδέσμων χάνεται ταχύτατα μετά την αιχμή. Η απώλεια της διαπερατότητας των χασμοσυνδέσμων στα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου οδηγεί σε απώλεια επικοινωνίας κοκκωδών- ωοκυττάρου και παρεμπόδιση της ροής του cAMP στο ωοκύτταρο. Ενεργοποιείται, έτσι, ο MPF, άρεται η μειωτική παύση και εν τέλει ολοκληρώνεται η μείωση I.(DiLuigi et al. 2008; Dekel 1988)



Εικόνα 41. *Ωρίμανση ωοκυττάρου in vivo. Κυτταροπλασματική (A) και πυρηνική (B).*

Η μειωμένη δράση των χασμοσυνδέσμων αποτελεί προαπαιτούμενο για την έναρξη της διεύρυνσης του ωοφόρου λοφιδίου. Αμέσως πριν την ωοθυλακιορρηξία παρατηρείται πέραν της αιχμής της LH και μια μέγιστη τιμή στα επίπεδα της FSH. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση της FSH προάγει την παραγωγή υαλουρονικού οξέος από τα κοκκώδη κύτταρα. Το υαλουρονικό οξύ προσδένεται με τη σειρά του στα κοκκώδη και διευρύνει τα μεσοκυττάρια

διαστήματα, δημιουργώντας εν τέλει ένα βλεννώδες πλέγμα. Το φαινόμενο αυτό καλείται **διεύρυνση ωοφόρου λοφιδίου (cumulus expansion)** και αποτελεί μέρος της διαδικασίας ωρίμανσης. Ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ωοθυλακιορρηξία, καθώς η έλλειψη της σύνθεσης υαλουρονικού οξέος και της δημιουργίας του βλεννώδους πλέγματος μειώνει σημαντικά τα ποσοστά ωοθυλακιορρηξίας και γονιμοποίησης. (Z. Huang and Wells 2010; Tanghe et al. 2002; Mattioli and Barboni 2000)



Εικόνα 42. Αλλαγές στα επίπεδα ασβεστίου, cAMP, MPF πριν και μετά την αιχμή της LH.

Σύντομα μετά την αιχμή της LH, στα κοκκώδη κύτταρα επάγεται από τον παράγοντα GDF9 η έκφραση της προσταγλαδίνης Ptgs2. Το γεγονός αυτό είναι απαραίτητο για την επακόλουθη ωορρηξία, που δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς προσταγλαδίνες. Αμέσως μετά την ωοθυλακιορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα παραμένουν συνδεδεμένα με το ωοκύτταρο και διευκολύνουν την κίνησή του στην σάλπιγγα. Επιπλέον, το πλέγμα κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλει το ωοκύτταρο συμμετέχει στην γονιμοποίησή του, επηρεάζοντας την πρόσδεση και την διείσδυση των σπερματοζωαρίων στο σύμπλοκο κοκκωδών- ωοκυττάρου (COC). (Z. Huang and Wells 2010)

Ρόλος κοκκωδών κυττάρων στην κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου

Η πυρηνική ωρίμανση του ωοκυττάρου, όταν αυτή δεν συνοδεύεται από την κυτταροπλασματική του ωρίμανση, δεν είναι δυνατόν να καθορίσει την ποιότητα και το δυναμικό γονιμοποίησης ενός ωοκυττάρου. Για την ακρίβεια, οι δύο αυτές φάσεις ωρίμανσης πρέπει να πραγματοποιηθούν εξίσου και μάλιστα με τρόπο τέτοιο, ώστε να διασφαλιστούν οι ιδεατές συνθήκες για την επακόλουθη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου.

Η κυτταροπλασματική ωρίμανση περιλαμβάνει όλα εκείνα τα γεγονότα που δημιουργούν συνθήκες κατάλληλες, ώστε να επιτευχθεί πυρηνική ωρίμανση στο ωοκύτταρο, γονιμοποίηση και πρώιμη εμβρυογένεση. Για το λόγο αυτό, καθίσταται αναγακαία για την εμφύτευση του εμβρύου και την φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωοκυττάρου δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι η κυταροπλασματική ωρίμανση περιλαμβάνει την επαναδιάταξη των οργανιδίων στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος και την συσσώρευση mRNA (αγγελιοφόρο ριβονουκλεικό οξύ), πρωτεϊνών, υποστρωμάτων και θρεπτικών συστατικών απαραίτητων για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Η συσσώρευση ουσιών καθίσταται αναγκαία, καθώς είναι αυτή που θα υποστηρίξει την ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου μέχρι το στάδιο εκείνο που το εμβρυϊκό γονιδίωμα θα είναι πλέον μεταγραφικά ενεργό.(Watson 2007)

Μελέτες σε θηλαστικά υπογραμμίζουν τη μεγάλη σημασία της ύπαρξης του ωοφόρου δίσκου στην ολοκλήρωση της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης. Τα κοκκώδη κύτταρα ωοκυττάρων βοοειδών συμμετέχουν στην ωρίμανση των ωαρίων αυτών είτε εκκρίνοντας διαλυτούς παράγοντες απαραίτητους για την αναπτυξιακή διαδικασία, είτε απομακρύνοντας από το περιβάλλον του ωοκυττάρου παράγοντες που εμποδίζουν την ωρίμανσή του. Συγκεκριμένα, μετατρέπουν την κυστίνη σε κυστεϊνη επάγοντας, έτσι, την αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης στο εσωτερικό του ωοκυττάρου. Βάσει ερευνών, σταθερά επίπεδα γλουταθειόνης σε ώριμα ωοκύτταρα οδηγούν σε αυξημένο αριθμό γονιμοποιημένων ωαρίων που εξελίσσονται σε έμβρυα σταδίου βλαστοκύστης. Επιπλέον, τα κοκκώδη κύτταρα μεταβολίζουν τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό οξύ ή αλλά ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs που το ωοκύτταρο δύναται να μεταβολίσει και χρειάζεται για την ωρίμανσή του.(Tanghe et al. 2002)

4.2.Ρόλος κοκκωδών κυττάρων στην γονιμοποίηση

Προκειμένου να επιτευχθεί γονιμοποίηση, πρέπει πρώτα το ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο να διαπεράσει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix) που έχει σχηματίσει ο ωοφόρος δίσκος. Αυτό συμβαίνει με διάσπαση την μακρομοριακής δομής της θεμέλιας ουσίας, η οποία πραγματοποιείται χάρη στην υαλουρονιδάση που υπάρχει στην πλασματική μεμβράνη των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Στα περισσότερα θηλαστικά, ο ωοφόρος δίσκος διατηρείται μέχρι και την γονιμοποίηση στην σάπλιγγα.(Tanghe et al. 2002)

Σε περιστατικά τεχνητής γονιμοποίησης, τα ωάρια απαλάσσονται από την πλειοψηφία των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου με ενζυμική κατεργασία με υαλουρονιδάση. Ωστόσο, μελέτες σε βοοειδή καταδεικνύουν ότι η αφαίρεση των κοκκωδών οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης. Η παρουσία του ωοφόρου δίσκου βελτιώνει τα ποσοστά γονιμοποίησης με ποικίλλους τρόπους:

- Αυξάνει, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων με δυναμικό γονιμοποίησης, τα οποία προσεγγίζουν το ωοκύτταρο. Ο τρόπος με τον οποίο τα σπερματοζωάρια προσελκύονται αποδίδεται, πιθανόν, στην χημειοταξία.

- Δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον ευνοϊκό για την ενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου, την ακροσωμική αντίδραση και την διείσδυσή του στο ωοκύτταρο. Συγκεκριμένα, ανθρώπινα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου παράγουν προγεστερόνη, η οποία αποτελεί έναν πιθανό επαγωγέα της ακροσωμικής αντίδρασης. Η προγεστερόνη προσδένεται στην μεμβράνη του σπερματοζωαρίου και προκαλέι μια δραματική αύξηση στην συγκέντρωση Ca^{2+}, οδηγώντας σε σύντηξη των μεμβρανών ωοκυττάρου- σπερματοζωαρίου, απελευθέρωση λεκιθικών κοκκίων στον υποζωνιαίο χώρο (perivitelline space) και σκλήρυνση της διαφανούς ζώνης.

- Εμποδίζει στο ωοκύτταρο αλλαγές που θα επηρέαζαν αρνητικά την πιθανότητα γονιμοποιήσής του. Έχει βρεθεί, ότι αφαίρεση του ωοφόρου δίσκου από ωοκύτταρα ποντικών οδηγεί σε πρόωρη σκλήρυνση της διαφανούς μεμβράνης, γεγονός που δυσχεραίνει την διείσδυση σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο και ως εκ τούτο μειώνει δραστικά την πιθανότητα γονιμοποίησης.(Tanghe et al. 2002)

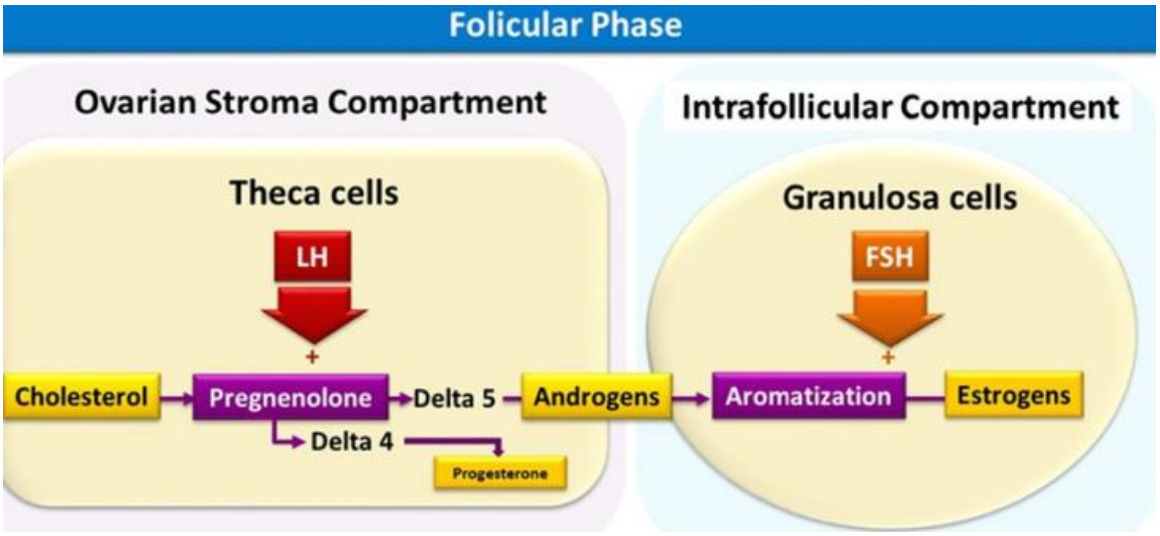
Συμπερασματικά, η πλήρης κατανόηση όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ωοκυττάρων διαφορετικών ειδών ζώων είναι ιδιαιτέρως δύσκολη και σχεδόν ακατόρθωτη όταν αφορά ανθρώπινα ωοκύτταρα. Με βάση την πλειοψηφία των βιβλιογραφικών δεδομένων η σημασία του ωοφόρου δίσκου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ωοκυττάρου, αλλά και αμέσως μετά την ωορρηξία, είναι αδιαμφισβήτητη. Τα κοκκώδη κύτταρα έχουν κεντρικό ρόλο στην διατήρηση της μειωτικής παύσης, στην άρση της και στην ολοκλήρωση της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης του ωοκυττάρου και δημιουργούν, πιθανόν, τις κατάλληλες συνθήκες στο μικροπεριβάλλον, ώστε να επιτευχθεί γονιμοποίηση. (Coticchio et al. 2015)

4.3. Ρόλος Κοκκωδών Κυττάρων Στη Στεροειδογένεση - Υπόθεση «Δυο κυττάρων-Δυο γοναδοτροπινών»

Οι φυλετικές στεροειδείς ορμόνες συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών ιστών και είναι απαραίτητες κατά τη διαδικασία της αναπαραγωγής. Οι ορμόνες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι: η **τεστοστερόνη** που παράγεται από τους όρχεις, η **οιστραδιόλη** που παράγεται από τα ωοθυλάκια των ωοθηκών και η **προγεστερόνη** που παράγεται από το ωχρό σωμάτιο. Όλες συντίθενται με υποστρώματα την χοληστερόλη, τις προγεστίνες, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα. Όπως είναι σαφές, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη αφορούν τα θηλυκά άτομα. Η βιοσύνθεση της οιστραδιόλης στην ωοθήκη βασίζεται στην υπόθεση «Δυο κυττάρων- Δυο γοναδοτροπινών» και προϋποθέτει τη συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων με τα κύτταρα της θήκης υπό τον έλεγχο των γοναδοτροπινών, LH και FSH.

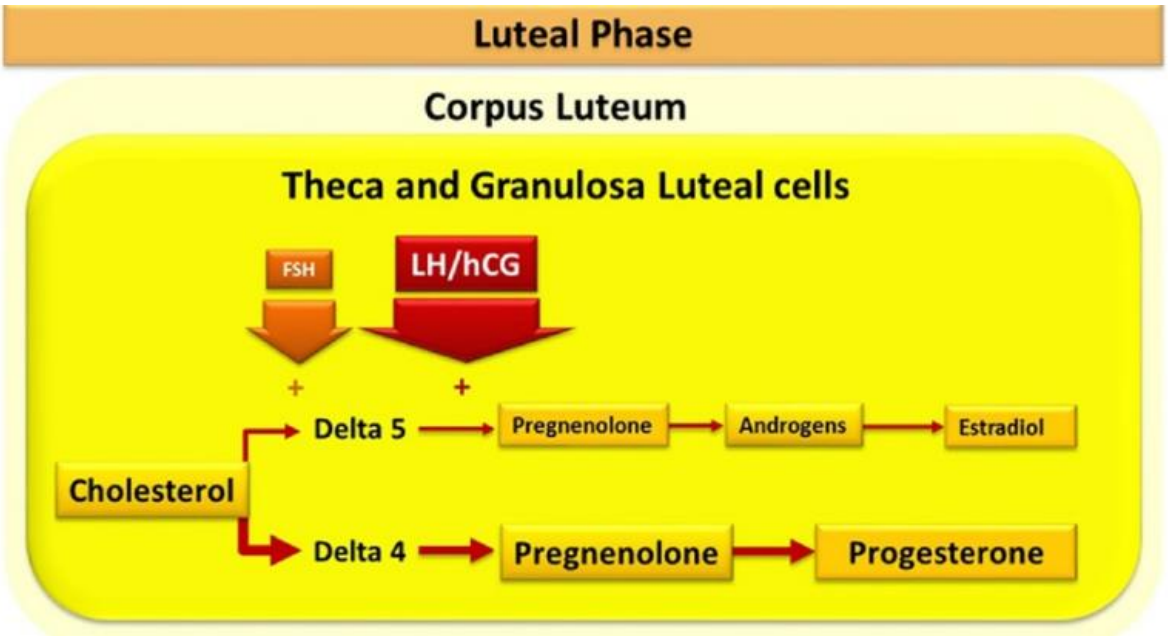
Η πρόδρομος ουσία για την παραγωγή των οιστρογόνων είναι τα ανδρογόνα, τα οποία όμως δεν παράγονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε ένα **προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο**, οι υποδοχείς της LH και το ένζυμο CYP17 που μετατρέπει την πρεγνενολόνη και την προγεστερόνη σε διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA, dehydroepiandrosterone) και ανδροστενεδιόνη αντίστοιχα, εκφράζονται αρχικά στα κύτταρα της θήκης και όχι στα κοκκώδη κύτταρα. Από τη άλλη μεριά, οι υποδοχείς της FSH και η αρωματάση που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα. (Andersen and Ezcurra 2014)

Η LH επιδρά στα κύτταρα της θήκης και επάγει τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή προγεστερόνης και ανδρογόνων από χοληστερόλη. Τα παραγόμενα ανδρογόνα, τεστοστερόνη και ανδροστενδιόνη διαχέονται σε γειτονικά κοκκώδη κύτταρα, όπου αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση οιστρογόνων. Στα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπονται σε οιστραδιόλη μεσω της δράσης της αρωματάσης CYP19 και της 17β-HSD που ευνοεί τη μετατροπή της οιστρόνης σε οιστραδιόλη .



***Εικόνα 43**. Αλληλεπίδραση κοκκωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης υπό τη δράση των γοναδοτροπινών για την παραγωγή οιστρογόνων στο προ-ωθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.*

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωοθυλάκιο περνά στην ωχρινική φάση και μετατρέπεται σε μια σημαντική ενδοκρινική δομή, το **ωχρό σωμάτιο**. Τα εναπομείναντα στο ωοθυλάκιο κοκκώδη κύτταρα, αλλά και τα κύτταρα της θήκης μετατρέπονται υπό την επίδραση της LH σε ωχρινικά και συνιστούν το ωχρό σωμάτιο, το οποίο παράγει μεγάλα ποσά προγεστερόνης.



***Εικόνα 44**. Υπόθεση "δυο κυττάρων-δυο γοναδοτροπινών" στο ωχρό σωμάτιο.*

Στο στάδιο αυτό παρατηρείται αυξημένη έκφραση των ενζύμων της στεροεϊδογένεσης, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης με πρόδρομο ουσία τα ανδρογόνα που παράγονται στα ωχρινοποιημένα κύτταρα της θήκης. Τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα είναι ικανά να συνθέτουν πρεγνενολόνη και κυρίως προγεστερόνη από χοληστερόλη. Κύρια δράση της παραγόμενης προγεστερόνης είναι η προετοιμασία του ενδομητρίου για την υποδοχή και την επιτυχημένη εμφύτευση του εμβρύου. Η αυξημένη σύνθεση προγεστερόνης ακολουθείται από την μειωμένη παραγωγή γοναδοτροπινών. Η μειωμένη συγκέντρωση της LH έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση στην συγκέντρωση της αρωματάσης και ως εκ τούτου την ελαττωμένη σύνδεση οιστραδιόλης.

4.4. Αλληλεπίδραση κοκκωδών κυττάρων – κυττάρων θήκης

Τα κοκκώδη κύτταρα συναποτελούν με τα κύτταρα της θήκης τα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου. Η συνεργασία των σωματικών κυττάρων καθίσταται αναγκαία στη διαδικασία της στεροειδογένεσης και όχι μόνο. Η επικοινωνία κοκκωδών- κυττάρων θήκης πραγματοποιείται με τη βοήθεια παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης που εκκρίνονται και από τους δυο τύπους κυττάρων και εξυπηρετούν την ωοθυλακική ανάτπυξη. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποιοι μόνο από τους πολλούς εκκρινόμενους παράγοντες που συμμετέχουν στην επικοινωνία.

Σε προκοιλοτικά ωοθυλάκια, τα κύτταρα της θήκης αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε έσω και έξω κύτταρα θήκης. Στα ωοθυλάκια αυτά, κύριοι εκκρινόμενοι παράγοντες των κυττάρων της θήκης είναι τα μέλη της υπερ- οικογένειας TGF-β, που στέλνουν σήμα στα κοκκώδη ότι τα κύτταρα της θήκης είναι έτοιμα να ξεκινήσουν την βιοσύνθεση ανδρογόνων. Το παρακρινικό σύστημα Ινχιμπίνης- Ανασταλτίνης/Ακτιβίνης ενεργοποιείται στα κοκκώδη και οι εκκρινόμενοι παράγοντες ελέγχουν την ποσότητα των παραγόμενων από τα κύτταρα της θήκης ανδρογόνων. Ο παρακρινής αυτός μηχανισμός είναι απαραίτητος, καθώς η υπερβολική συγκέντρωση ανδρογόνων σχετίζεται με την υπογονιμότητα και την παρεμπόδιση της ωοθυλακικής ανάπτυξης.(Hillier 1994)

Ένα ακόμη μονοπάτι όπου διαφαίνεται η επικοινωνία κοκκωδών- κυττάρων θήκης είναι το nodal/activin σύμφωνα με το οποίο ο αποπτωτικός παράγοντας nodal εκκρίνεται από τα κύττρα της θήκης και επάγει την αποπτωτική διαδικασία στα γειτονικά κοκκώδη κύτταρα.

Στο στάδιο του επικρατούντος ωοθυλακίου τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνουν τον παράγοντα IGF-1 (Insulin-like Growth Factor I, αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης I), ενώ ταυτόχρονα τα κύτταρα της θήκης διαθέτουν υποδοχείς για τον παράγοντα αυτό. Παρότι, ο μηχανισμός δεν έχει ακόμη διατυπωθεί ακριβώς έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα της θήκης επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων αυξάνοντας την παραγωγή του παράγοντα IGF-1.

Τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνουν, επιπλέον, τον ανθρώπινο βλαστικό παράγοντα (SCF/kit ligand), ο οποίος προσδένεται στον υποδοχέα του στα κύτταρα της θήκης επικρατούντων ωοθυλακίων. Ο SCF συμμετέχει στη διαφοροποίηση των κυττάρων της θήκης και στην ενεργοποίησή τους ως στεροειδο-παραγωγικά κύτταρα. Τα κύτταρα της θήκης ρυθμίζουν την έκφραση του SCF εκκρίνοντας διαφορετικούς παράγοντες (KGF: κερατονικός αυξητικός παράγοντας, LIF:ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας, HGF: ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας). Οι παράγοντες αυτοί επάγουν την περαιτέρω παραγωγή SCF από τα κοκκώδη, ανατροφοδοτώτας θετικά το προαναφερθέν μονοπάτι.

4.5. Επίδραση κοκκωδών κυττάρων στην ποιότητα του ωοκυττάρου και στην επίτευξη γονιμοποίησης

Τα κοκκώδη κύτταρα έχουν αποτελέσει και συνεχίζουν να αποτελούν πεδίο συνεχούς έρευνας, καθώς αλληλεπιδρούν στενά με το ωοκύτταρο, μοιράζονται το ίδιο μικροπεριβάλλον και πιθανόν φέρουν το αποτύπωμα των συνθηκών που επικρατούν κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου εντός του ωοθυλακίου. Με κατάλληλες μεθόδους είναι δυνατό να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών, αλλά και να ανιχνευθούν μοριακές αλλαγές στα κύτταρα αυτά κατά την αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον του ωοθυλακίου, που συνδέεται άμεσα και με το ωοκύτταρο.(Z. Huang and Wells 2010) Είναι σαφές, ότι μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό ή τον αποπτωτικό θάνατο των κοκκωδών κυττάρων έχουν προγνωστική σημασία για την ποιότητα και την τύχη του ωοκυττάρου. Αυτό εξηγείται από το ότι ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού και τα επίπεδα απόπτωσης των κυττάρων αυτών έχουν συσχετισθεί με την ωρίμανση των ανθρώπινων ωοκυττάρων, την γονιμοποίησή τους, αλλά και την πιθανότητα να φθάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης και να εμφυτευθούν επιτυχώς σε προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης.(Høst et al. 2002)

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν έναν ακόμη σημαντικό ρόλο των κοκκωδών κυττάρων στη βιωσιμότητα του ωοκυττάρου. Συγκεκριμένα, τα κοκκώδη κύτταρα (mural and cumulus cells) παράγουν με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, superoxide dismutases) αντιοξειδωτικά, τα οποία προστατεύουν το ωοκύτταρο από το οξειδωτικό στρες που υπάρχει στο ωοθυλακικό περιβάλλον. Έτσι, υψηλότερα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD παρατηρούνται σε ηλικιακά νεότερες γυναίκες και σχετίζονται με πιο επιτυχημένα αποτελέσματα σε προσπάθειες τεχνητής γονιμοποίησης. Τα κοκκώδη κύτταρα καθορίζουν, λοιπόν, και με αυτόν τον τρόπο την τύχη των ωοκυττάρων, καθώς τα ένζυμα SOD που παράγουν θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτη με προγνωστική σημασία για την βιωσιμότητα των ωοκυττάρων.(Matos et al. 2009)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου εξυπηρετούν μια ιδιαιτέρως σημαντική λειτουργία: την επικοινωνία με το ωοκύτταρο και την προσληψη αλλά και την μεταγωγή σημάτων που αυτή συνεπάγεται. Ένα βασικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος είναι το μονοπάτι WNT/b-CATENIN, το οποίο συμμετέχει σε πολλαπλές αναπτυξιακές διαδικασίες και φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην ωοθυλακιογένεση στον άνθρωπο. Μια πρόσφατη μελέτη του Wang και των συνεργατών του καταδεικνύει την έκφραση πολλών πρωτεϊνών- μελών του μονοπατιού στα κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells), συμπεριλαμβανομένων της β-κατενίνης και των πρωτεϊνών WNT2 και FDZ9. Επομένως, η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών στα κοκκώδη, διασφαλίζει την λειτουργία του μονοπατιού που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και διεύρυνση του ωοφόρου δίσκου, επιτυχή επικοινωνία κοκκωδών-ωοκυττάρου και ως εκ τούτου υποστήριξη της ανάπτυξης τυ ωοκυττάρου.(Wang, Tekpetey, and Kidder 2009)

Ένα ακόμη γονίδιο σημαντικό για την ωοθυλακική ανάπτυξη είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεϊνη MATER (Maternal Antigen That Embryos Require). Η MATER

εκφράζεται στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου, αλλά όχι στα μεμβρανικά κοκκώδη. Πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν ότι η πρωτεϊνη αυτή αλληλεπιδρά στα ανθρώπινα κοκκώδη με την πρωτεϊνική κινάση C epsilon (PKCε). Η PKCε φαίνεται να δρα σαν μια αντι-αποπτωτική πρωτεϊνη και το σύμπλοκο MATER-PKCε φαίνεται να δρα συνεργιστικά με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως τα Ras/Raf/ERK, PI-3-K και Akt που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ως εκ τούτου, η κατάλληλη έκφραση της MATER στα κοκκώδη κύτταρα κατά την ωοθυλακική ωρίμανση θα μπορούσε να αποτελεί ένα ισχυρό και σημαντικό αποπτωτικό σήμα.(Maraldi et al. 2009)

4.6. Γονιδιακή έκφραση κοκκωδών κυττάρων- Γονίδια με προγνωστική σημασία για την τύχη του ωοκυττάρου

Πολυάριθμες πρόσφατες μελέτες μελετούν την γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων. Οι Gasca et al προσπάθησαν να ταυτοποιήσουν πιθανούς ρυθμιστές και γονίδια βιο-δείκτες που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, ελέγχοντας με microarrays την γονιδιακή έκφραση σε ωοκύτταρα και κοκκώδη κύτταρα. Η μελέτη αυτή οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός πάνελ γονιδίων (BARD1, RBL2, RBBP7, BUB3 and BUB1B) που πιθανόν εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στην επιδιόρθωση του DNA. Κατάλληλη έκφραση των γονιδίων αυτών έχει πιθανόν σχέση με την ποιότητα των ωοκυττάρων. (Gasca et al. 2008) Αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων έχουν σχετιστεί με μορφολογικά ανώμαλα έμβρυα και επανειλλημένες αποτυχημένες προσπάθειες γονιμοποίησης.

Μελέτες πραγματοποιούνται και για τα γονίδια PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase, κυκλοοξυγενάση), HAS2 (hyaluronic acid synthase 2) and GREM1 (gremlin 1) και καταλήγουν πως τα γονίδια αυτά είναι πιθανοί δείκτες του αναπτυξιακού δυναμικού του ωοκυττάρου. Συγκεκριμένα, κοκκώδη κύτταρα που απομονώθηκαν από ωοκύτταρα, τα οποία γονιμοποιήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε καλής ποιότητας έμβρυα τρίτης ημέρας, φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό μεταγράφων για τα γονίδια αυτά από κοκκώδη ωοκυττάρων που εξελίχθηκαν σε χαμηλής ποιότητας έμβρυα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από άλλες ερευνητικές ομάδες και οδηγούν στη διαπίστωση ότι οι μετρήσεις των μεταγράφων των γονιδίων αυτών στα κοκκώδη θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στην μορφολογική αξιολόγηση των εμβρύων και στην επιλογή των ωοκυττάρων με την μεγαλύτερη πιθανότητα γονιμοποίησης και ανάπτυξης in vitro.(McKenzie et al. 2004; Cillo et al. 2007)

Οι Assou et al κατέληξαν το 2008, μετά από μια σειρά πειραμάτων, στην ταυτοποίηση μιας ομάδας τριών γονιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν προγνωστικοί δείκτες για την επίτευξη εγκυμοσύνης. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται στα κοκκώδη κύταρα (cumulus cells) με συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης και σχετίζονται με τη μορφολογία του εμβρύου και το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα, στην ομάδα περιλαμβάνονται το BCL2LII που εμπλέκεται στην απόπτωση, το PCKI που εμπλέκεται στην

γλυκονεογένεση και το NFIB που αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα. (Said Assou et al. 2006)

Ένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι επιστήμονες στην προσπάθειά τους να ταυτοποιήσουν στα κοκκώδη κύτταρα νέους δείκτες για την ποιότητα των ωοκυττάρων και των εμβρύων είναι η δυσκολία στον ορισμό ενός μέτρρου της βιωσιμότητας των προαναφερθέντων. Παρότι κάποιες παράμετροι αξιολόγησης της μορφολογίας των εμβρύων, όπως η έγκαιρη και σωστή αυλάκωση, σχετίζονται με υψηλό δυναμικό εμφύτευσης, αυτές οι συσχετίσεις είναι γενικώς αδύναμες και σίγουρα δεν μπορούν να δώσουν μια βέβαιη απάντηση για το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης. Παράλληλα, το γεγονός ότι τα έμβρυα καλλιεργούνται σε ομάδες (group embryo culture) και συνήθως μεταφέρονται ανά δύο ή ανά τρία (group embryo transfer), δυσκολεύει την απόδοση της εγκυμοσύνης, που πιθανόν θα προκύψει ,σε ένα από τα έμβρυα τηης ομάδας. Τα ανευπλοϊδικά έμβρυα δε, που δεν διαφέρουν σε τίποτα μορφολικά από τα ευπλοϊδικά, οδηγούν κάποιες φορές σε εγκυμοσύνη ή και σε γέννηση πάσχοντος μωρού περιπλέκοντας ακόμη περισσότερο τα πράγματα. Ιδανική τεχνική, λοιπόν, για μελέτη της επίδρασης γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκώδη στην ποιότητα και το δυναμικό γονιμοποίησης του ωοκυττάρου, καθώς και στην ποιότητα και το δυναμικό εμφύτευσης του εμβρύου είναι η καλλιέργεια των ωοκυττάρων και των εμβρύων ανά ένα (individual oocyte/embryo culture), αλλά και η εμβρυομεταφορά ενός μόνο εμβρύου κάθε φορά (single embryo transfer).

Παρότι οι μελέτες που αφορούν στην έκφραση των γονιδίων είναι πολλές, ο όγκος των δεδομένων που έχουν συλλεχθεί για διαφορετικά γονίδια είναι εντυπωσιακά μεγάλος και έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια με πιθανή προγνωστική αξία για την ποιότητα και την τύχη των ωοκυττάρων, η έρευνα βρίσκεται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο όσον αφορά την πλήρη διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων κοκκωδών-ωοκυττάρου μέσα στο ωοθυλάκιο. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ακριβείς εξηγήσεις για τον μηχανισμό με τον οποίο διαφορές στην γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων προκαλούν (ή προκαλούνται από) διαφορετική ποιότητα ωοκυττάρου. Είναι, ωστόσο, αδιαμφισβήτητο ότι η βιωσιμότητα και η τύχη ενός ωοκυττάρου εξαρτάται από μια λεπτή ισορροπία πολλαπλών μονοπατιών και πολλαπλών κυτταρικών τυπων που συνυπάρχουν στο ωοθυλάκιο.

4.7. Κοκκώδη κύτταρα και απόπτωση

Έχει παρατηρηθεί ότι σε ανθρώπινα ωοκύτταρα, τα ποσοστά απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων είναι σημαντικά υψηλότερα σε μορφολογικά ανώμαλα, από ότι σε μορφολογικά ομαλά ωοκύτταρα. (Yang, Zhang, and Li 2009) Επιπλέον, μελέτες καταδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του σταδίου ωριμότητας του ωοκυττάρου και του ποσοστού απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι κοκκώδη κύτταρα με αυξημένα ποσοστά απόπτωσης περιβάλλουν ανώριμα ωοκύτταρα (στάδιο GV ή στάδιο μετάφασης I). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ότι σε ώριμα ωοκύτταρα τα κοκκώδη κύτταρα του συμπλέγματος COC δεν αποπίπτουν με τόσο ταχείς ρυθμούς και η διαφορά αυτή φαίνετααι να επηρεάζει θετικά τα ποσοστά γονιμοποίησης μετά τη διενέργεια μικρογονιμοποίησης (ICSI) σε εργαστήρια εξωσωματικής. (Høst et al. 2002)

Δεν είναι ακόμη σαφές εάν ανώμαλα ή φτωχά σε ποιότητα ωοκύτταρα επάγουν αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα ή αν συμβαίνει το αντίστροφο, εάν, δηλαδή, κοκκώδη που αποπίπτουν με ταχείς ρυθμούς οδηγούν εν τέλει στη δημιουργία ωοκυττάρων χαμηλής ποιότητας. Ωστόσο, η σχέση αλληλεξάρτησης των κοκκωδών κυττάρων με το ωοκύτταρο δεν μπορεί να αμφισβητηθεί. Λειτουργικά κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την πλήρη ωρίμανση του ωοκυττάρου, καθώς και για την επίτευξη του αναπαραγωγικού του σκοπού.(Tanghe et al. 2002) Το γονιδιακό προφίλ και η βιοχημική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων είναι πιθανόν να επηρεάζονται από το ωοκύτταρο, το περιβάλλον στο εσωτερικό του ωοθυλακίου, αλλά και από το περιβάλλον στο εσωτερικό της ωοθήκης.(Z. Huang and Wells 2010)

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογικής ζωής των ιστών, κατά το οποίο τα κύτταρα σταματούν να εκτελούν τις απαραίτητες για τη διαβίωσή τους διεργασίες. Μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της γήρανσης των κυττάρων και της αντικατάστασής τους από νέα κύτταρα ή ως αποτέλεσμα κάποιας ασθένειας, τραυματισμού ή θανάτου του οργανισμού στον οποίο αυτά ανήκουν. Ο **προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος** (**Programmed Cell Death, PCD**) προκύπτει ως αποτέλεσμα κυτταρικού προγραμματισμού και πρόκειται για μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία. Η **απόπτωση** (κυτταρικός θάνατος τύπου Ι) και η **αυτοφαγία** (κυτταρικός θάνατος τύπου ΙΙ) αποτελούν τους δυο τύπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ η **νέκρωση** αφορά τον κυτταρικό θάνατο που προκύπτει ως αποτέλεσμα μόλυνσης ή τραυματισμού.

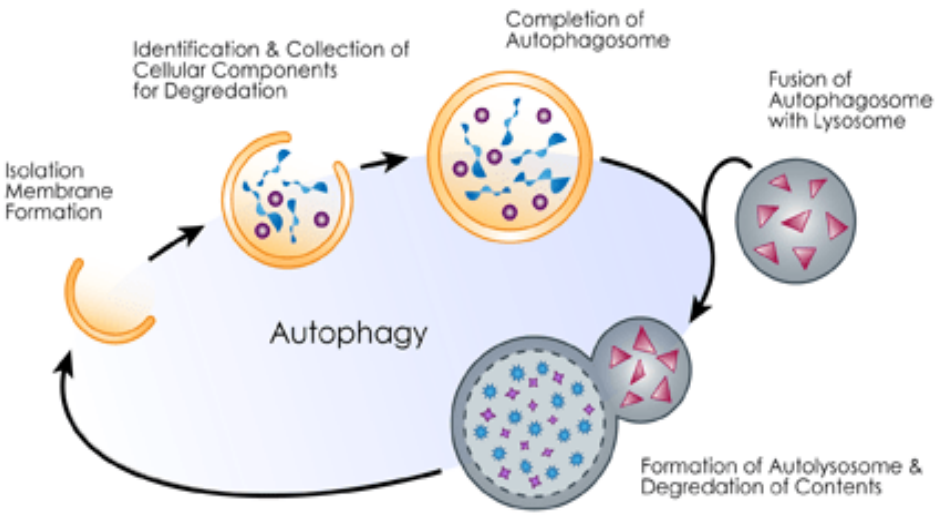
Η **νέκρωση** προκαλείται από παράγοντες εκτός του κυττάρου ή του ιστού και είναι αποτέλεσμα μολύνσεων, τραυματισμών, έκθεσης σε τοξίνες και ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (ακραίες μεταβολές στη θερμοκρασία, παντελή έλλειψη θρεπτικών συστατικών). Καθορίζεται μορφολογικά από αποδόμηση του DNA, κυτταροπλασματική διόγκωση και διαστολή των οργανιδίων, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και τελικά προφλεγμονώδη διαρροή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Θεωρείται, γενικά, παθητική διαδικασία καθώς δεν απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, έχει ελάχιστες ενεργειακές απαιτήσεις και δεν ρυθμίζεται από οποιασδήποτε μορφής ομοιοστατικό μηχανισμό. Αρκετές νευροεκφυλιστικές νόσοι, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington, η νόσος του Parkinson και η επιληψία περιλαμβάνουν νέκρωση κυττάρων.(Syntichaki and Tavernarakis 2002)

Ο όρος νέκρωση, λοιπόν, χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον μη προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Κατά τους Manjo και Jorris, η χρήση του όρου είναι λανθασμένη, διότι η νέκρωση δεν αποτελεί μορφή κυτταρικού θανάτου, αλλά περιγράφει τις αλλαγές που ακολουθούν μετά τον κυτταρικό θάνατο, με οποιοδήποτε μηχανισμό και αν αυτός προήλθε. Για το λόγο αυτό προτείνεται ο όρος **όγκωση (oncosis)**, που περιγράφει τη διαδικασία μέσω της οποίας με λύση της μεμβράνης και προφλεγμονώδη διαρροή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου, τα κύτταρα οδηγούνται σε νέκρωση.(Elmore 2007)

5.1. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος - Αυτοφαγία

Η **αυτοφαγία** αποτελεί έναν τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με ιδιαίτερη σημασία στη ρύθμιση των ενεργειακών αποθεμάτων και στην απόκριση του κυττάρου στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών (nutrient stress). Επιπρόσθετος ρόλος της είναι η απομόνωση ενδοκυτταρικών παθογόνων και η απομάκρυνση κατεστραμμένων οργανιδίων από το κύτταρο. Δικαίως, λοιπόν, χαρακτηρίζεται ως *«μηχανισμός επιβίωσης».* Ο μηχανισμός δράσης της αυτοφαγίας περιλαμβάνει μια μαζική συσσώρευση κενοτοπίων με διπλή μεμβράνη, τα αυτοφαγοσώματα, τα οποία ενθυλακώνουν κυτταροπλασματικό υλικό. Τα αυτοφαγοσώματα στη συνέχεια συντήκονται με λυσοσώματα σχηματίζοντας τα αυτολυσοσώματα, τα οποία αποικοδομούν το κυτταροπλασματικό υλικό που είχε αρχικά ενθυλακωθεί. Υπό φυσιολογικές, λοιπόν, συνθήκες η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός

επιβίωσης, η υπερβολική όμως αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.(Glick, Barth, and Macleod 2010)



Εικόνα 45. *Μηχανισμός δράσης αυτοφαγίας.*

5.2. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος - Απόπτωση

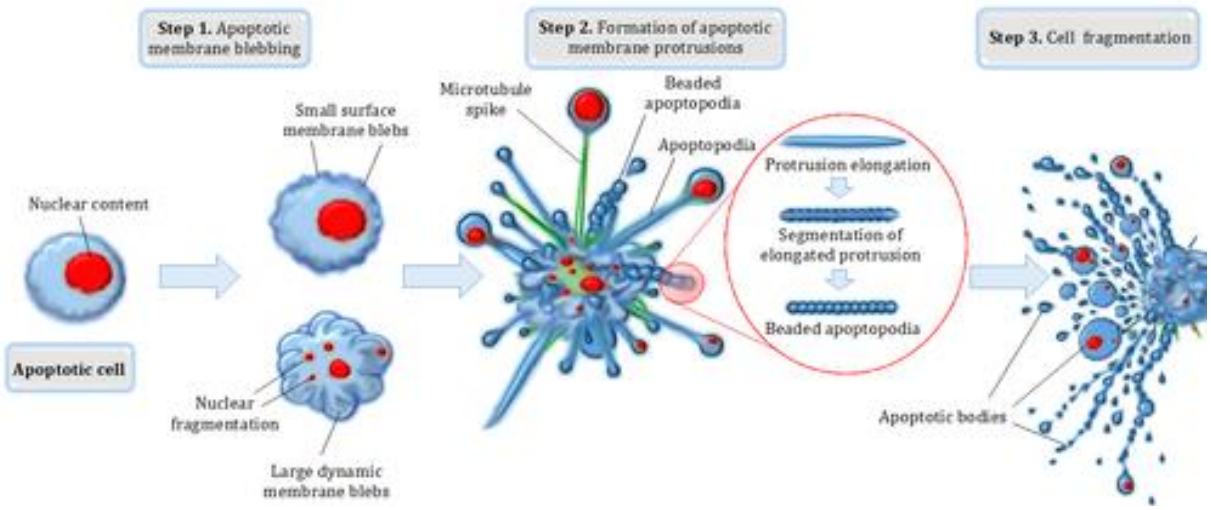
Η **απόπτωση** είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη οδός που περιλαμβάνει πλήθος ενδοκυτταρικών σημάτων, μονοπατιών και εμπλεκόμενων γονιδίων. Ο όρος απόπτωση (a-po-toe-sis) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Kerr, Wyllie, και Currie το 1972 για να περιγράψει μια μορφολογικά διακριτή μορφή κυτταρικού θανάτου, παρότι τα χαρακτηριστικά της είχαν περιγραφεί με σαφήνεια πολλά χρόνια πριν. Η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης σε κύτταρα θηλαστικών ξεκίνησε από την έρευνα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*. Στον οργανισμό αυτό υπάρχουν ακριβώς 1.090 σωματικά κύτταρα που παράγονται κατά την ανάπτυξή του μέχρι το σχηματισμό του ενήλικου σκουληκιού, εκ των οποίων 131 από αυτά τα κύτταρα υφίστανται «προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο». Αυτά τα 131 κύτταρα πεθαίνουν σε συγκεκριμένα σημεία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης, η οποία είναι ουσιαστικά αμετάβλητη μεταξύ των διαφορετικών ατόμων, καταδεικνύοντας την αξιοσημείωτη ακρίβεια με την οποία λειτουργεί το σύστημα αυτό. Η απόπτωση έκτοτε έχει αναγνωριστεί και έγινε αποδεκτή ως διακριτή και σημαντική λειτουργία «προγραμματισμένου» κυτταρικού θανάτου, η οποία περιλαμβάνει τη γενετικά καθορισμένη εξάλειψη των κυττάρων.(Elmore 2007)

Ο βαθμός συμμετοχής της απόπτωσης στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού γίνεται πιο εύκολα αντιληπτός γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα που αποπίπτουν κάθε μέρα στους ενήλικες υπολογίζονται σε περίπου πενήντα δισεκατομμύρια. Επιπλέον, η

συνολική μάζα των κυττάρων που αποπίπτουν και ανανεώνονται κάθε χρόνο σε έναν ενήλικα είναι στα επίπεδα του βάρους του σώματός του, με το μεγαλύτερο μέρος να επικεντρώνεται στους ιστούς που ανανεώνονται συνεχώς, όπως ο μυελός των οστών, η επιδερμίδα και το εντερικό επιθήλιο.(J. C. Reed 1999)

Η απόπτωση ενεργοποιείται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης. Δρα ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός που διατηρεί σταθερό τον κυτταρικό πληθυσμό των ιστών, αλλά και ως μηχανισμός άμυνας σε ανοσολογικές αντιδράσεις ή σε κατεστραμμένα από ασθένεια κύτταρα. Αν και υπάρχει μια ευρεία ποικιλία ερεθισμάτων και συνθηκών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών, ικανών να επάγουν απόπτωση, είναι γεγονός ότι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι αντιδρούν διαφορετικά παρουσία του ίδιου ερεθίσματος. Κατά συνέπεια, ένα ερέθισμα είναι δυνατόν να επάγει την απόπτωση σε έναν συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και την ίδια χρονική στιγμή να μην έχει καμία επίπτωση σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα, ακτινοβολία ή φάρμακα χημειοθεραπείας οδηγούν σε βλάβες στο γενετικό υλικό ορισμένων μόνο κυττάρων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αποπτωτικό θάνατο.

Οι **μορφολογικές μεταβολές** που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουν ταυτοποιηθεί με τη βοήθεια της οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Περιλαμβάνουν συνοπτικά κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνική πύκνωση, συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA, καταστροφή του κυτταροσκελετού και τελικά δημιουργία αποπτοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική συρρίκνωση και η πύκνωση, βασικά και ευδιάκριτα με το οπτικό μικροσκόπιο χαρακτηριστικά της απόπτωσης, παρατηρούνται στα αρχικά στάδια της διαδικασίας. Με τη συρρίκνωση των κυττάρων, το μέγεθός του μικραίνει, το κυτταρόπλασμα είναι πυκνότερο και τα οργανίδια είναι διατεταγμένα λιγότερο χαλαρά. Η πύκνωση είναι το αποτέλεσμα της συμπύκνωσης της χρωματίνης και αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο της απόπτωσης. Σε ιστολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, το αποπτωτικό κύτταρο έχει τη μορφή μιας στρογγυλής ή οβάλ μάζας με σκούρο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και πυκνά μωβ θραύσματα πυρηνικής χρωματίνης. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία δίνει τη δυνατότητα για πιο λεπτομερή προσδιορισμό των υποκυτταρικών αλλαγών. Νωρίς κατά τη φάση της συμπύκνωσης της χρωματίνης, το πυκνό πυρηνικό υλικό μετακινείται περιφερειακά, στην περιοχή υπό την πυρηνική μεμβράνη.(Elmore 2007)



***Εικόνα 46**. Στάδια αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.*

Στις μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την απόπτωση περιλαμβάνεται και το φαινόμενο της «εκβλάστησης» Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται εκτεταμένη διόγκωση της πλασματικής μεμβράνης, εμφάνιση κυτταροπλασματικών φυσαλιδόμορφων προεκβολών (membrane blebbing) δημιουργία οπών (διαύλων-πόρων) μεγάλης διαμέτρου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και τελικά κατάτμηση του πυρήνα και διαχωρισμός των κυτταρικών και πυρηνικών θραυσμάτων σε αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωσώματα αποτελούνται από κυτταρόπλασμα, σφιχτά «πακεταρισμένα» οργανίδια, τα οποία διατηρούνται ακέραια και ενδεχομένως από πυρηνικά υπολείμματα. Τα σωμάτια αυτά φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα, παρεγχυματικά κύτταρα ή νεοπλασματικά κύτταρα και τελικά αποδομούνται μέσα σε φαγολυσοσώματα.

Κατά την διάρκεια της απόπτωσης *δεν δημιουργείται φλεγμονώδης αντίδραση*, καθώς τα αποπτωτικά κύτταρα:

- δεν απελευθερώνουν τα κυτταρικά τους συστατικά στον περιβάλλοντα διάμεσο ιστό.
- φαγοκυτταρώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η δευτερογενής νέκρωση.
- εγκολπώνονται από φαγοκύτταρα, τα οποία δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες.(Elmore 2007)

Μοριακοί μηχανισμοί απόπτωσης

Η σημασία επίτευξης της απόπτωσης είναι μεγάλη και η μεγαλύτερη απόδειξη αυτού διαφαίνεται στην σχέση της με την εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου. Η μειωμένη ρύθμιση ή η παντελής απώλεια ρύθμισης αυτής της μορφής κυτταρικού θανάτου συνδέεται με μη ελεγχόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πρόοδο του καρκίνου και ενίσχυση της αντίστασής του σε θεραπευτικά σχήματα. Για το λόγο αυτό, η απορρύθμιση της απόπτωσης θεωρείται ως ένα από τα βασικά σημάδια-σφραγίδες του καρκίνου. Η εύρυθμη λειτουργία των ρυθμιστικών της μηχανισμών καθίσταται αναγκαία στους υγιείς οργανισμούς.

Πολλά από τα ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης έχουν ταυτοποιηθεί και οι μοριακοί μηχανισμοί που περιγράφουν τα επιμέρους μονοπάτια της φαίνεται να έχουν διατηρηθεί εξελικτικά. Οι μοριακοί αυτοί μηχανισμοί είναι ιδιαιτέρως πολύπλοκοι και έχουν αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων που μέχρι σήμερα ισχύουν, η απόπτωση περιλαμβάνει δυο βασικά και διακριτά μεταξύ τους μονοπάτια:

1. **το εξωτερικό μονοπάτι ή μονοπάτι υποδοχέα θανάτου (extrinsic or death receptor pathway)** και
2. **το εσωτερικό μονοπάτι ή μιτοχονδριακό (intrinsic or mitochondrial pathway)**

Στο εξωτερικό μονοπάτι συμμετέχουν μόρια-συνδέτες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Τα μόρια αυτά συνδέονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων που καλούνται «υποδοχείς θανάτου» (death receptors). Αυτά τα μόρια είναι είτε διαλυτοί παράγοντες είτε μόρια κυτταρικών επιφανειών, όπως τα Τ λεμφοκύτταρα. Στο εσωτερικό μονοπάτι συμμετέχουν μόρια που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου και

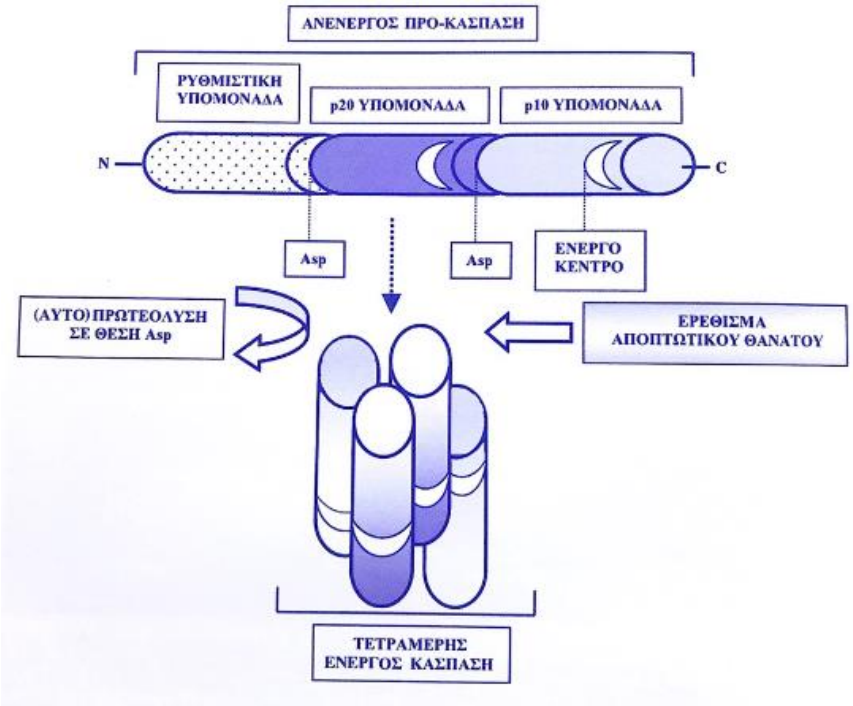
ενεργοποιούν την απόπτωση εμπλέκοντας και τα μιτοχόνδρια στη διαδικασία.(Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015) Και τα δυο μονοπάτια καταλήγουν στην ενεργοποίηση των **κασπασών**, μέσω των οποίων επιτελούνται και όλες οι τελικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που υφίσταται ένα κύτταρο που αποπίπτει. Συνήθως, η ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών αποτελεί το σημείο κλειδί στην επίτευξη ή όχι της απόπτωσης. (Pistritto et al. 2016)

Κασπάσες

Οι κασπάσες (Cysteine Aspartate Specific Proteases, Caspases) αποτελούν μια εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια πρωτεασών, αναγκαίων για την απόπτωση. Όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, είναι κυστεϊνο-ενδοπεπτιδάσες, έχουν δηλαδή στο ενεργό κέντρο τους ένα κατάλοιπο κυστεΐνης και υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς μετά από ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος. Στην οικογένεια των κασπασών ανήκουν 14 ένζυμα που χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Εναρκτήριες κασπάσες που εμπλέκονται στην έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας (κασπάσες 2, 8, 9 και 10).
- Κασπάσες-τελεστές της απόπτωσης που εμπλέκονται στην τελική διάσπαση των κυτταρικών συστατικών (κασπάσες 3, 6 και 7).
- Κασπάσες που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη αντίδραση (κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12 και 13).

Οι κασπάσες συντίθεντα αρχικά ως ανενεργά ζυμογόνα που ονομάζονται προ-κασπάσες (με μόλις ~1% της ενζυμικής δραστηριότητάς τους). Ενεργοποιούνται με αυτό-πρωτεόλυση μετά από αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα ρυθμιστικά μόρια και προκύπτουν μια ανενεργή αμινοτελική υπομονάδα και δύο καταλυτικές υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερές. Για την πλήρη ενεργοποίησή τους απαιτείται ο σχηματισμός ενός ετεροτετραμερούς με δύο μεγάλες και δύο μικρές υπομονάδες. Μόλις ενεργοποιηθούν οι εναρκτήριες κασπάσες ενεργοποιούν μέσω διαδοχικών πρωτεολυτικών γεγονότων τις



***Εικόνα 47**. Μηχανισμός ενεργοποίησης κασπασών.*

κασπάσες-τελεστές, οι οποίες με τη σειρά τους προχωρούν σε υδρόλυση συγκεκριμένων κυτταρικών υποστρωμάτων. Η διαδικασία εν τέλει καταλήγει στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.(Pistritto et al. 2016)

Η δράση των κασπασών ευθύνεται για τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, δηλαδή την συμπύκωση της χρωματίνης, τη διόγκωση της πλασματικής μεμβράνης και τη δημιουργία κυτταροπλασματικών φυσαλιδόμορφων προεκβολών (membrane blebbing) σε αυτήν. Η πρωτεολυτική δράση των κασπασών-τελεστών είναι εκτενής και μη αναστρέψιμη και αποτελεί το τελικό βήμα τόσο του εξωτερικού, όσο και του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης. (Pistritto et al. 2016)

Αξίζει να αναφερθεί, ότι η δράση των κασπασών έχει σχετιστεί και με μη αποπτωτικές λειτουργείες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και ωρίμανση. Είναι, επομένως, κατανοητό ότι συγκεκριμένα βήματα του καταρράκτη των κασπασών μπορούν να ενεργοποιηθούν αυτόματα χωρίς απαραίτητα να επάγουν την απόπτωση.

Εξωτερικό μονοπάτι (extrinsic or death receptor pathway) απόπτωσης

Το εξωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι ρυθμίζεται από μια ποικιλία μορίων-συνδετών (death inducing ligands) και από την αλληλεπίδρασή τους με του υποδοχείς θανάτου (death receptors). Τα ευρύτερα μελετημένα συστήματα επαγωγής της απόπτωσης μέσω του εξωτερικού μονοπατιού περιλαμβάνουν τα TNFR1-TNFα, Fas-FasL, TRAILR1-TRAIL, TRAILR2-TRAIL. Συγκεκριμένα, τα μόρια TNF-α, TRAIL και Fas συνδέονται στους μεμβρανικούς υποδοχείς τους και σε ελάχιστα δευτερόλεπτα ενεργοποιούν τον καταρράκτη των κασπασών και την μετάδοση του αποπτωτικού σήματος. Οι υποδοχείς θανάτου χαρακτηρίζονται δομικά από την ύπαρξη μιας ενδοκυτταρικής περιοχής αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που ονομάζεται περιοχή θανάτου (death domain, DD) και συμμετέχει καθοριστικά στην επαγωγή του αποπτωτικού σήματος. Η σύνδεση του μορίου-σήματος στον υποδοχέα, προκαλεί δραστικές αλλαγές στη δομή του με σημαντικότερη την εμφάνιση της ενδοκυτταρικής περιοχής θανάτου. Η DD στρατολογεί στον υποδοχέα μια σειρά πρωτεϊνών (FADD/TRADD), οι οποίες προσελκύουν τις προκασπάσες 8 ή/και 10 σχηματίζοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται DISC (death-inducing signaling complex) και η ύπαρξή του για την ενεργοποίηση των κασπασών και την επαγωγή του αποπτωτικού σήματος καθίσταται αναγκαία. Η ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών ακολουθείται από την ενεργοποίηση των κασπασών- τελεστών και συνηθέστερα της κασπάσης 3, που ευθύνονται για την αποδόμηση κυτταρικών μακρομορίων και υποστρωμάτων απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυττάρου και οδηγούν τελικά στον κυτταρικό θάνατο.(Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Pistritto et al. 2016)

Σε ορισμένα κύτταρα η σηματοδότηση της απόπτωσης ξεκινά με το εξωτερικό μονοπάτι, αλλά ολοκληρώνεται σε συνδυασμό με το εσωτερικό, μιτοχονδριακό μονοπάτι. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις αυτές, η κασπάση 8 δρα πρωτεολυτικά στην BH3-only πρωτεΐνη Bid (προ-αποπτωτική πρωτεΐνη) ενεργοποιώντας της. Το ενεργοποιημένο τμήμα t-Bid ενεργοποιεί με τη σειρά του αποπτωτικές πρωτεϊνες που επάγουν την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), καταλήγοντας τελικά στο εσωτερικό μονοπάτι σηματοδότησης της απόπτωσης.(Pistritto et al. 2016)

Εσωτερικό μονοπάτι (intrinsic or mitochondrial pathway) απόπτωσης

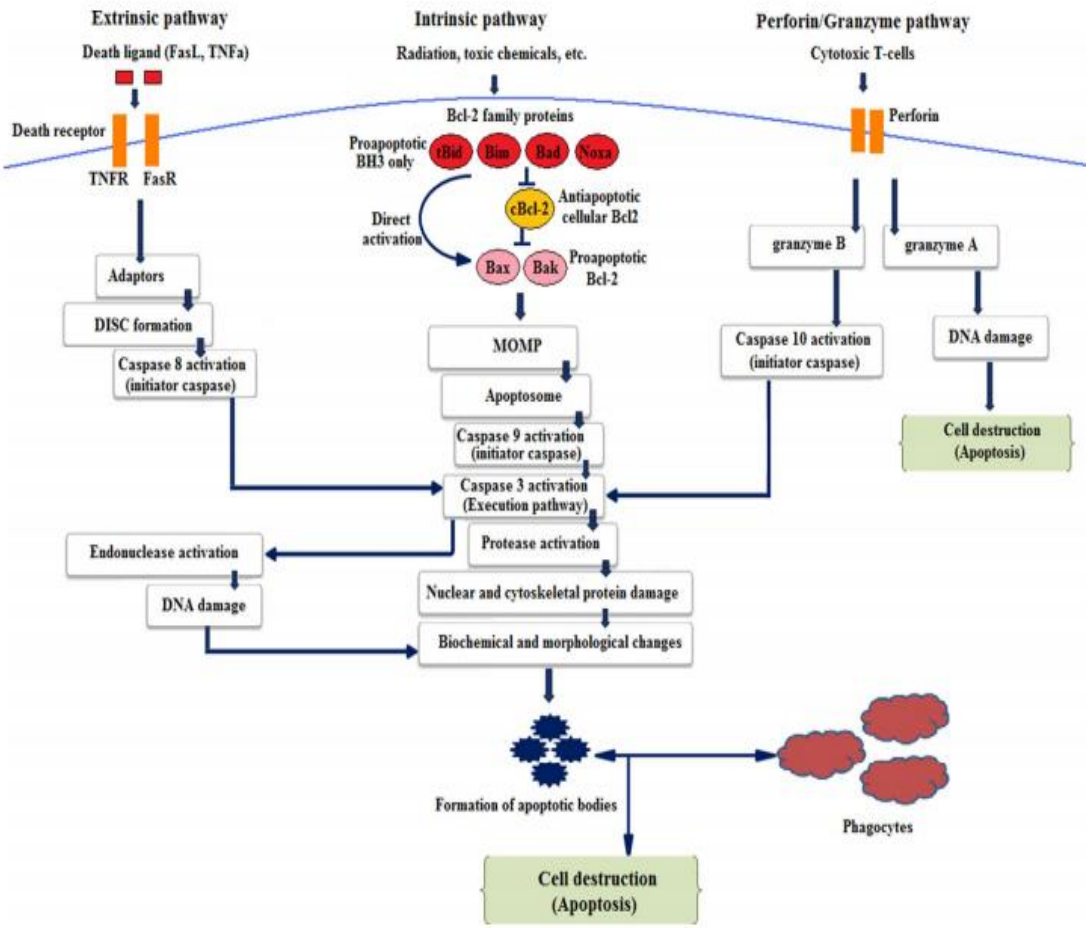
Το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι ρυθμίζεται κατά βάσιν από τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πολλές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως οι Smac/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with a low PI), AIF (apoptosis-inducing factor) και το κυτόχρωμα c. Ως αποτέλεσμα αποπτωτικών ενδοκυτταρικών σημάτων (έντονο οξειδωτικό στρες, εξάλειψη αυξητικών παραγόντων, υποξία, μη επιδιορθώσιμες βλάβες στο γενετικό υλικό, πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κυτοσολικού ασβεστίου) ενεργοποιούνται προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες- μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (B cell lymphoma-2). Οι πρωτεϊνες αυτές μπλοκάρουν την δράση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-xL, και Mcl-1, οδηγώντας σε λύση της συνέχειας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και αυξάνοντας την διαπερατότητά της (mitochondrial outer membrane permeability, MOMP). Έτσι, πρωτεΐνες που φυσιολογικά εντοπίζονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, όπως το κυτόχρωμα c, απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο. Το κυτόχρωμα c προσδένεται στον κυτοσολικό παράγοντα Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1) και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το οποίο ονομάζεται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα, στη συνέχεια, «προσελκύει» την προ-κασπάση 9, η οποία προσδένεται στην CARD (caspase recruitment domain) περιοχή του και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη, πλέον κασπάση 9, ενεργοποιεί την κασπάση 3 (ή 6 ή 7) επάγοντας τελικά την αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.(Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Pistritto et al. 2016)

Το εσωτερικό μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι ελέγχεται και ρυθμίζεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών, την Bcl-2 οικογένεια. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν 25 διαφορετικοί τύποι Bcl-2 πρωτεϊνών- μελών, εκ των οποίων κάποιες είναι προ-αποπτωτικές (Bcl-10, Bak, Bax, Bid, Bim, Bik and Blk), ενώ άλλες είναι αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bax-XL, Bax-X, Bcl-XS, Bcl-w, BAG). Η ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ρυθμίζει την ευαισθησία των κυττάρων στα αποπτωτικά σήματα. Έτσι, περίσσεια προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στα αποπτωτικά σήματα, ενώ περίσσεια αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών τα καθιστά ανεκτικά στα σήματα αυτά. Προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες εντοπίζονται συνήθως στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που τοποθετούνται στην επιφάνεια των κυττάρων. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015)

Τόσο το εξωτερικό όσο και το εξωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι καταλήγουν στο μονοπάτι «εκτέλεσης». Το μονοπάτι αυτό ξεκινά με την ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών 3,6,7, οι οποίες ενεργοποιούν κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες, αποδομούν τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και τελικά προκαλούν ποικίλες μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές στα αποπτωτικά κύτταρα.

Perforin/ Granzyme αποπτωτικό μονοπάτι

Ένα τρίτο αποπτωτικό μονοπάτι που αξίζει να αναφερθεί ελέγχεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα, περιλαμβάνει τη συμμετοχή της περφορίνης και των πρωτεασών σερίνης "granzymes" . Υπάρχουν 2 τύποι πρωτεασών (granzyme A και B) και επακόλουθα δυο τρόποι να εξελιχθεί το μονοπάτι: είτε ενεργοποιώντας των καταρράκτη των κασπασών, είτε ανεξάρτητα από τις κασπάσες. Στο μονοπάτι που εμπλέκεται η πρωτεάση granzyme B, όπως και στο εξωτερικό και στο εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι, οι κασπάσες έχουν τον τελικό-καταστροφικό για τα αποπτωτικά κύτταρα- ρόλο. Έτσι, στο μονοπάτι περφορίνη/granzyme B τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν την "granzyme B", η οποία αμέσως ενεργοποιεί συγκεκριμένες κασπάσες όπως οι κασπάσες 3,7,8 και 10. Οι κασπάσες, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιούν DNAασες και διασπούν το χρωμοσωμικό DNA, παρεμποδίζουν την δράση επιδιορθωτικών ενζύμων και διασπούν πυρηνικές πρωτεΐνες. Τελικά, τα κύτταρα υφίστανται πλήθος μορφολογικών αλλαγών, φαγοκυτταρώνται και απομακρύνονται γρήγορα από την περιοχή χωρίς να επηρεάσουν τα γειτονικά τους κύτταρα. Αντίθετα, το μονοπάτι περφορίνη/ granzyme A δρα ανεξάρτητα από τις κασπάσες και οδηγεί στην απόπτωση μέσω καταστροφής μονόκλωνου DNA.



Διάγραμμα 6. *Σχηματική αναπαράσταση των τριών αποπτωτικών μονοπατιών. Κάθε μονοπάτι ξεκινά με ένα συγκεκριμένο αποπτωτικό σήμα, ακολουθεί η ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών και έπειτα η ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών. Οι κασπάσες τελεστές οδηγούν στην δημιουργία των αποπτωτικών σωμάτων, τα οποία τελικά φαγοκυτταρώνονται και απομακρύνονται από το σημείο..Το μονοπάτι που εμπλέκεται η πρωτεάση granzyme A είναι το μοναδικό ανεξάρτητο των κασπασών.*

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η έκφραση δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 σε κοκκώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων Bcl-2 (αντι-αποπτωτικό) και Bax (προ-αποπτωτικό). Επομένως, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες και η οικογένεια Bcl-2 εν γένει θα αναλυθεί εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα.

Απόπτωση και γυναικεία γονιμότητα

Η πρώτη καταγεγραμμένη παρατήρηση της απόπτωσης στην ωοθήκη, που αποτελεί και μια από τις πρώτες περιγραφές φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου σε ιστό, πραγματοποιήθηκε το 1885. Ήταν αποτέλεσμα σειράς ερευνών που καταδείκνυαν μορφολογικές διαφορές στα μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα μεταξύ υγιών ωοθυλακίων και ωοθυλακίων που υφίστανται εκφυλισμό σε ωοθήκη λαγού. Παρότι για περίπου μια δεκαετία, ο κυτταρικός θάνατος στην ωοθήκη δεν αποτέλεσε κεντρικό πεδίο ενδιαφέροντος για τους επιστήμονες, η απόπτωση συνέχιζε να συνδέεται με πολλαπλές διαδικασίες που εμπλέκονται στην φυσιολογική και στην μη φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία, συμπεριλαμβανομένου του φαινομένου εξάντλησης των ωογονίων και των πρωτογενών ωοκυττάρων.(Kim and Tilly 2004)

Όπως έχει προαναφερθεί, ο αριθμός των πρωτογενών ωοκυττάρων αγγίζει τις 10 χιλιάδες κατά την 7^{η} εβδομάδα της κύησης ενώ μεταξύ 16^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας, τα κύτταρα αυτά φθάνουν στο μέγιστο αριθμό τους, που προσεγγίζει τα 6-7 εκατομμύρια και στις δύο ωοθήκες. Τότε, ο πολλαπλασιασμός τους σταματά και ξεκινά ο αποπτωτικός τους θάνατος. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος των ωογονίων χαρακτηρίζεται ως **ατρησία** και ευθύνεται για την σημαντική μείωση του αριθμού τους που ξεκινά από την 20^{η} εβδομάδα της εμβρυικής ανάπτυξης. Κατά τη γέννηση, οι ωοθήκες ενός θήλεος περιέχουν έναν πεπερασμένο αριθμό πρωτογενών ωοκυττάρων (περίπου 1 εκατομμύριο) που δεν είναι δυνατόν να υποστεί αύξηση με βάση τα όσα μέχρι σήμερα ισχύουν. Στην εφηβεία, ο αριθμός των πρωτογενών ωοκυττάρων που έχουν απομείνει στην ωοθήκη υπολογίζεται στις 300-400 χιλιάδες. Μετά τα 37 έτη η πτώση του αριθμού των ωογονίων είναι κατακόρυφη και ο ρυθμός ατρησίας τους πολύ πιο έντονος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα πρωτογενή ωοκύτταρα είναι δυνατό να παραμείνουν αδρανή και καθηλωμένα στην πρόφαση Ι έως και 50 περίπου χρόνια, οπότε σηματοδοτείται η ολοκλήρωση της αναπαραγωγικής ηλικίας και η μετάβαση στην εμμηνόπαυση.(McGee and Hsueh 2000)

Στα αρχέγονα ωοθυλάκια, καθώς και στα πρωτογενή προ-κοιλοτικά, ο αποπτωτικός θάνατος του πρωτογενούς ωοκυττάρου φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την ενδεχόμενη ατρησία του ωοθυλακίου. Αντίθετα, όταν τα ωοθυλάκια αναπτυχθούν και διαφοροποιηθούν αρκετά ώστε να φθάσουν στο στάδιο στρατολόγησης και επιλογής για ωοθυλακιορρηξία (τριτογενή κοιλοτικά ωοθυλάκια), υπεύθυνος για την ατρησία που υφίσταται το ωοθυλάκιο αυτού του σταδίου φαίνεται να είναι ο αποπτωτικός θάνατος των κοκκωδών κυττάρων. Έτσι, παρότι η ατρησία υπάρχει σε όλα τα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης, ήδη από την εμβρυϊκή ζωή, ο κυτταρικός τύπος που φαίνεται να ευθύνεται για

τη σηματοδότησή της αλλάζει με βάση το αναπτυξιακό στάδιο του ωοθυλακίου. Ο τρόπος με τον οποίο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι σηματοδοτούν την απόπτωση έχει αποτελέσει τομέα με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. (Kim and Tilly 2004)

Στην προσπάθεια εξήγησης του φαινομένου της εξάντλησης των γεννητικών κυττάρων και των ωοθυλακίων έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές υποθέσεις. Η ανεπαρκής υποστήριξη των γειτονικών σωματικών κυττάρων, τα οποία δεν παράγουν επαρκείς αυξητικούς παράγοντες, απαραίτητους για την επιβίωση και τη διατήρηση του όγκου των γεννητικών κυττάρων, αποτελεί μια πιθανή αιτία-εξήγηση του φαινομένου. Επιπλέον, θα μπορούσε να ευθύνεται ένα πρόγραμμα αυστηρού ποιοτικού ελέγχου και επιτήρησης των γεννητικών κυττάρων. Μόνο τα ικανά και κατάλληλα να ωριμάσουν ωογόνια επιβιώνουν και η πλειοψηφία των γεννητικών κυττάρων, χωρίς δυναμικό ανάπτυξης και ωρίμανσης, αποπίπτουν φυσιολογικά. Ερευνητικές μελέτες καταδεικνύουν, παράλληλα, την ύπαρξη πολλαπλών περιβαλλοντικών παραγόντων και κλινικών θεραπειών (αντικαρκινική θεραπεία) με τραγικές επιπτώσεις στην ωοθήκη και στην γονιμότητα εν γένει. Για παράδειγμα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που απελευθερώνονται από την ατελή καύση ορυκτών καυσίμων και από το κάπνισμα επιταχύνουν την διαδικασία εξάντλησης της φαρέτρας των ωοκυττάρων, επάγοντας την απόπτωσή τους. Επιπλέον, οι χημειοθεραπείες και οι ακτινοβολίες που συμπεριλαμβάνονται στην αντικαρκινική θεραπεία προκαλούν μαζική απόπτωση των ωοκυττάρων και σημαντική επιβάρυνση της γονιμότητας της γυναίκας.(Kim and Tilly 2004)

Συμπερασματικά, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί μια φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Η επιρροή του στη γυναικεία γονιμότητα είναι ιδιαιτέρως σημαντική, μιας και η ατρησία των ωοκυττάρων/ ωοθυλακίων αποτελεί τη βασική αιτία του πεπερασμένου χρονικού διαστήματος στο οποίο η γυναίκα είναι αναπαραγωγικά ενεργή.

ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ
BCL-2
BAX

6. Γονίδια προς μελέτη

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η έκφραση δυο γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, τα Bcl-2 και Bax. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά, κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μέλη (Bcl-2 και Bax αντίστοιχα) της οικογένειας Bcl-2, η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στην σηματοδότηση και τον έλεγχο της απόπτωσης.

6.1. Ιστορική αναδρομή

Η έρευνα στον τομέα του κυτταρικού θανάτου, παρότι σύγχρονο και καθ' όλα επίκαιρο θέμα, αποτελεί πεδίο με έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον εδώ και 150 χρόνια. Στις μέρες μας, είναι χωρίς αμφιβολία ένας από τους εκτενέστερα και εντατικότερα μελετημένους τομείς. Ετησίως, δημοσιεύονται περισσότερα από 20.000 νέα επιστημονικά άρθρα που αφορούν την απόπτωση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

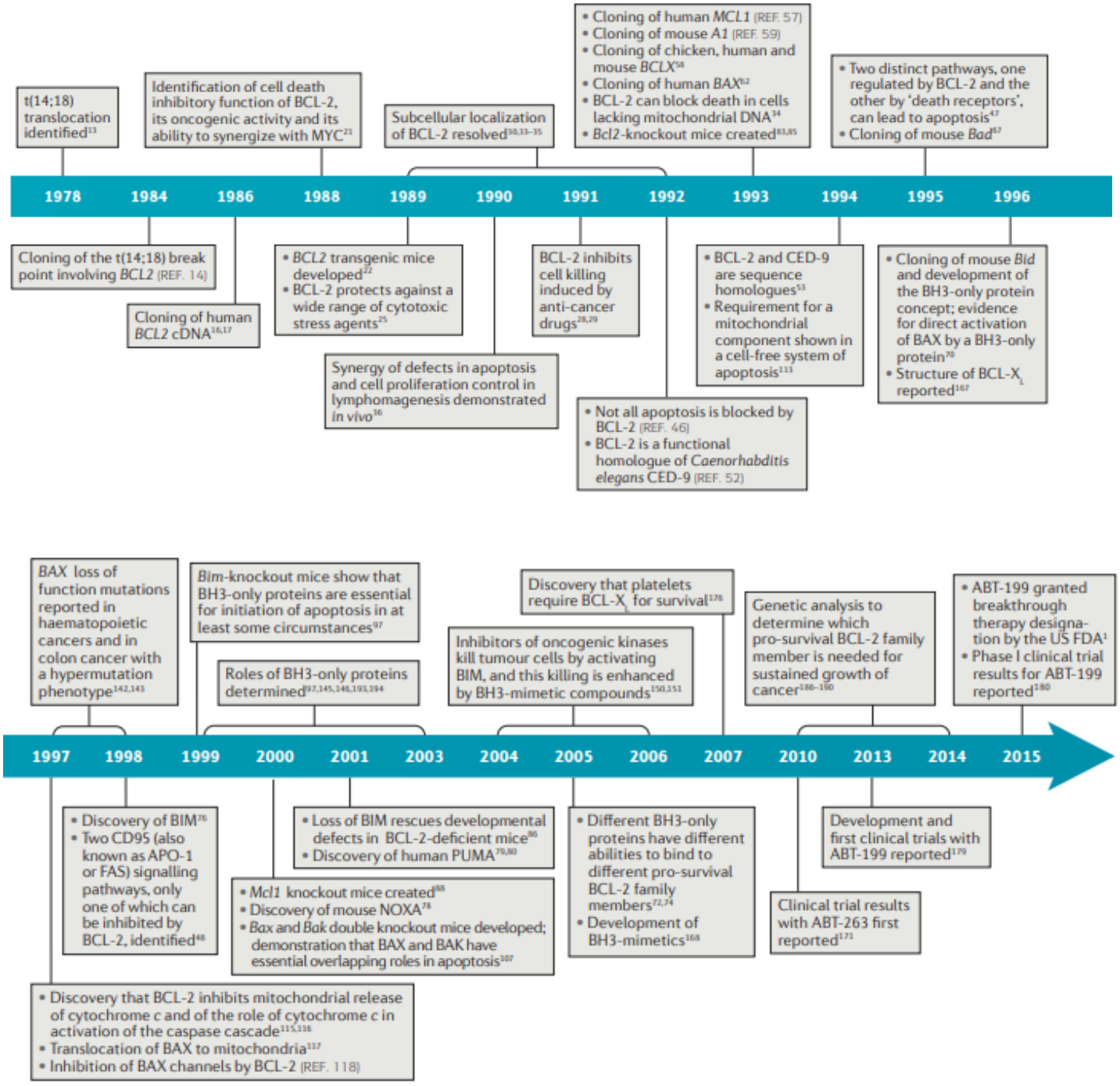
Η έκρηξη του ενδιαφέροντος πυροδοτήθηκε από την έρευνα σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, την Bcl-2, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά περί το 1980. Το υπεύθυνο γονίδιο για την κωδικοποίησή της, ταυτοποιήθηκε από τους Fukuhara και Rowley αρχικά σε κύτταρα ασθενών με λέμφωμα και μετατόπιση στα χρωμοσώματα 14 και 18. Στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης. Ήδη το 1984 κλωνοποιήθηκε το cDNA του γονιδίου αυτού, το οποίο ονομάστηκε **bcl-2 (B cell leukaemia or lymphoma gene number 2)** από τον Tsujimoto και τους συνεργάτες του και βρέθηκε ότι εδράζεται στο χρωμόσωμα 18. Μελέτες που ακολούθησαν κατέδειξαν ότι η Bcl-2 συνεισέφερε στην ανάπτυξη και την εξέλιξη όγκων, κρατώντας τα κύτταρά τους ζωντανά και δρώντας κατ' αυτόν τον τρόπο συνεργιστικά με τα ογκογονίδια που καθοδηγούσαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Delbridge et al. 2016)

Η διαπίστωση ότι η BCL-2 δρούσε παρεμποδίζοντας τον κυτταρικό θάνατο ήταν γεγονός και η πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε τότε ως το πρώτο μόριο που συμμετέχει καθοριστικά σε μηχανισμό κυτταρικού θανάτου και στον καρκίνο. Τα επόμενα χρόνια, οι Monaghan, Jacobson, Lithgow και ο συνεργάτες αυτών απέδειξαν ότι η BCL-2 εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και στον πυρηνικό φάκελο, με το κύριο μέρος της πρωτεΐνης να αποκαλύπτεται στο κυτταρόπλασμα σε κάθε περίπτωση. Στα πειράματα που ακολούθησαν κατέστη σαφές ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης BCL-2 παρεμποδίζει την απόπτωση των κυττάρων, αλλά δεν συμμετέχει στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό τους. Επιπλέον βρέθηκε, ότι συμμετέχει καθοριστικά στην απόπτωση, αλλά δεν ελέγχει όλα τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου.(Delbridge et al. 2016)

Μέχρι τον χαρακτηρισμό της BCL-2 ως αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης, η έρευνα στο γενετικό προφίλ του κυτταρικού θανάτου των θηλαστικών βρισκόταν ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο και εστιαζόταν κατά βάση στην μελέτη του νηματώδους *C. elegans*. Το 1992 μελετήθηκε η έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης BCL-2 στον *C. elegans* και διαπιστώθηκε ότι επηρεάζει και πάλι τον μηχανισμό της απόπτωσης.(Delbridge et al. 2016)

Η ταυτοποίηση της ακριβούς αλληλουχίας του γονιδίου bcl-2 οδήγησε στη διαπίστωση ότι αρκετοί ιοί φέρουν στο γονιδίωμά τους περιοχές ομόλογες με το bcl-2. Τα πρώτα μη ιικά αντι-αποπτωτικά γονίδια που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα MCL1 (myeloid cell leukaemia 1),

Bclx (γνωστό και ως Bcl2l1) και A1 (γνωστό και ως Bcl2a1 και BFL1). Το 1993 ταυτοποιήθηκε και η πρωτεΐνη BAX, η οποία παρότι διέθετε ομόλογες περιοχές με την BCL-2 βρέθηκε να έχει προ-αποπτωτικό ρόλο και επομένως να προωθεί την απόπτωση.



***Διάγραμμα 7**. Χρονοδιάγραμμα των ανακαλύψεων- σταθμών στην ανακάλυψη της οικογένειας BCL-2.*

Στα επόμενα χρόνια ακολούθησε ταχύτατη ταυτοποίηση πρωτεϊνών που παρουσίαζαν ομόλογες περιοχές με την BCL-2. Όλες μαζί συνιστούν μια ομάδα πρωτεϊνών με αντι-αποπτωτικό ή προ-αποπτωτικό ρόλο, η αλληλεπίδραση των οποίων ρυθμίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.(Delbridge et al. 2016; Birkinshaw and Czabotar 2017) Σήμερα, η οικογένεια Bcl-2 συνεχίζει να αποτελεί ερευνητικό πεδίο εξαιρετικής σημασίας και επιστημονικού ενδιαφέροντος. Ο ρόλος τους στη ρύθμιση και στον έλεγχο της απόπτωσης είναι κεντρικός και η σημασία τους στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για ιδιαιτέρως σοβαρές ασθένειες αδιαμφισβήτητη.

6.2. Οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Η Bcl-2 οικογένεια αποτελείται από εξελικτικά συντηρημένες πρωτεΐνες-μέλη. Τα τελευταία τριάντα χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 25 πρωτεΐνες που εντάσσονται στην οικογένεια. Κάθε μια περιέχει μια τουλάχιστον ομόλογη περιοχή BH (Bcl-2 homology region). Συνολικά, υπάρχουν 4 περιοχές BH, αριθμημένες με βάση την σειρά ανακάλυψής τους. Τόσο στους ανθρώπους, όσο και στα ποντίκια οι πρωτεΐνες-μέλη χωρίζονται σε τρεις διακριτές ομάδες, με βάση τον αριθμό των ομόλογων περιοχών των πρωτεϊνών:

- **Αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες με πολλαπλές ομόλογες περιοχές (pro-survival/ anti-apoptotic multi-domain proteins)**: Κάθε πρωτεΐνη-μέλος περιέχει 4 BH ομόλογες περιοχές, οι οποίες αριθμούνται BH1 έως BH4, αλλά και μια καρβοξυτελική υδρόφοβη περιοχή TM (Transmembrane domain). Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι Bcl-2, Bcl-X_L, MCL-1, BFL-1, BCL-W, BCL2L10 κ.α. Βασικός τους ρόλος είναι η διατήρηση της συνέχειας και της ακεραιότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και επιτυγχάνεται μέσω παρεμπόδισης της δράσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

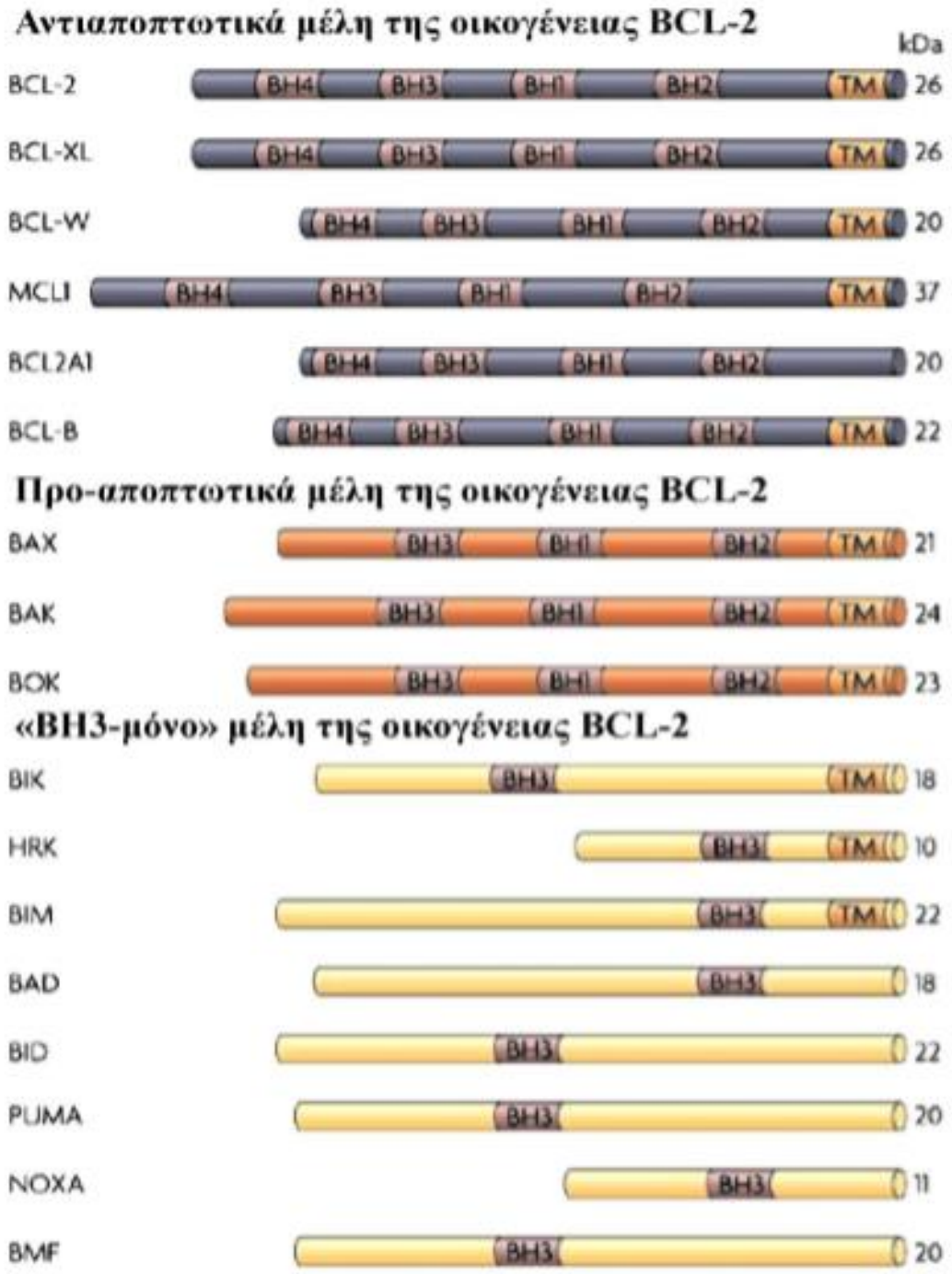
- **Προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες με πολλαπλές ομόλογες περιοχές (pro-apoptotic multi-domain proteins)**: Κάθε πρωτεΐνη-μέλος περιέχει 3 BH ομόλογες περιοχές, (BH1-BH3). Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι BAK, BAX, BOK κ.α.

- **Προ-αποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες**: Αποτελεί την κατηγορία με τον μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών-μελών. Κάθε πρωτεΐνη περιέχει, όπως υποδεικνύει και το όνομα της κατηγορίας, μια μόνο BH ομόλογη περιοχή. Στην ομάδα ανήκουν οι BID, BIM (γνωστή και ως BCL2L11), PUMA (γνωστή και ως BBC3), NOXA κ.α. (Delbridge et al. 2016; Levine, Sinha, and Kroemer 2008)

Η περιοχή BH3 περιέχεται σε όλες σχεδόν τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, αλλά είναι δυνατόν να μην περιέχεται στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας. Αντίστοιχα, η BH4 περιοχή περιέχεται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας εκτός των BH3-only μελών.(Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015)

Διαφορετικοί συνδυασμοί πρωτεϊνών της οικογένειας εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης. Οι πρωτεΐνες αυτές, αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες και η αναλογία τους στο κύτταρο καθορίζει την τάση του να υποκύψει σε ένα αποπτωτικό σήμα. Εν ολίγοις,

όταν οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες υπερτερούν, η διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c, να ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών και τελικά το κύτταρο να οδηγείται στο θάνατο.



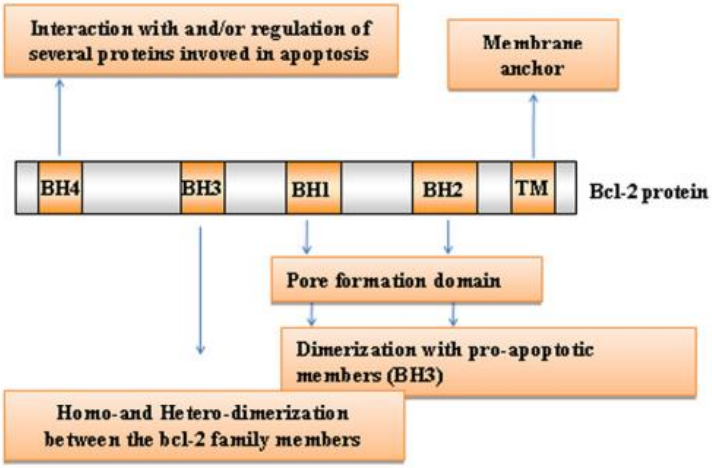
Εικόνα 48*. Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών.*

6.3. Δομή Bcl-2 πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας Bcl-2 χαρακτηρίζονται από μια γενική τρισδιάστατη δομή, σύμφωνα με την οποία δυο κεντρικές υδρόφοβες α-έλικες περιβάλλονται από έξι ή επτά αμφίφιλες α-έλικες ποικίλου μήκους. Μεταξύ των δυο πρώτων περιφεριακών α-ελίκων εντοπίζεται ένας βρόγχος. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015) (Petros, Olejniczak, and Fesik 2004)

Οι **ομόλογες BH1 και BH2** περιέχονται σε όλα τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας. Η απόσταση μεταξύ των περιοχών αυτών είναι περίπου 30 αμινοξέα και η παρουσία τους είναι υποχρεωτική για την αντι-αποπτωτική δράση των μελών της συγκεκριμένης υπο-ομάδας. Πειράματα απομάκρυνσης των περιοχών αυτών από τα μόρια BCL-2 και BCL-XL, είχαν ως αποτέλεσμα την παύση της αντι-αποπτωτικής τους δράσης και της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με τα προ-αποπτωτικά μέλη, όπως είναι η BAX και η BAK.(Kawatani and Imoto 2003)

Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας αλληλεπιδρούν και μέσω της αλληλεπίδρασής τους ρυθμίζουν αποπτωτικά μονοπάτια. Η συντηρημένη **περιοχή BH3** κατέχει κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή, καθώς αποτελεί το κυρίαρχο δραστικό τμήμα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη της περιοχής BH3 αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόσδεση μιας προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης σε μια αντι-αποπτωτική και τον σχηματισμό ετεροδιμερούς. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιέχουν στην επιφάνεια τους μια υδρόβοφη αύλακα, η οποία σχηματίζεται από τα μοτίβα BH1, BH2, BH3. Η αύλακα αυτή αποτελεί <u>σημείο πρόσδεσης</u> για πεπτίδια που μιμούνται τη δομή BH3 των προ-αποπτωτικών περιοχών. Κατά την πρόσδεσή της, η BH3 περιοχή του πεπτιδίου δρα σαν μια αμφίφιλη έλικα που προσδένεται μέσω ισχυρών συνδέσεων στην υδρόφοβη αύλακα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης. *Ως εκ τούτου, όλες οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες που περιέχουν το BH3 μοτίβο μπορούν να προσδεθούν σε αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και να σχηματίσουν σύμπλοκα.*(Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015) (Petros, Olejniczak, and Fesik 2004)



***Εικόνα 49**. Δομικά χαρακτηριστικά BCL2 πρωτεϊνών και η λειτουργία τους.*

Τέλος, η **BH4 ομόλογη περιοχή**, λείπει από όλα τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας και ως εκ τούτου αποτελεί βασικό παράγοντα για την αντι-αποπτωτική

δραστηριότητα. Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελείται από 26 αμινοξέα και η δομή της δείχνει έναν αμφιπαθή χαρακτήρα κατά την αλληλεπίδρασή της με τις μεμβράνες. Η δευτεροταγής δομή της περιοχής BH4 στο νερό συνίσταται από μια α-ελικοειδή δομή, κατάλληλη ώστε να αλληλεπιδρά ευνοϊκά με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες.(Khemtémourian et al. 2006) Παρότι σε κάποια προ-αποπτωτικά μέλη έχουν εντοπιστεί περιοχές που μοιάζουν με την BH4 των αντι-αποπτωτικών μελών, οι αλληλουχίες των αμινοξέων των περιοχών αυτών έχουν σημαντικά μικρότερη ομολογία σε σύγκριση με την ομολογία που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι αντίστοιχες περιοχές BH4 των ανι-αποπτωτικών μελών.(Inohara et al. 1998) Μάλιστα, η αντικατάσταση της BH4 «αυθεντικής» περιοχής της BCL-2 πρωτεΐνης από την αντίστοιχη περιοχή της BAX πρωτεΐνης είχε σαν συνέπεια την απώλεια της αντι-αποπτωτικής δράσης της πρώτης.(D. C. Huang, Adams, and Cory 1998)

Εκτός από τις BH περιοχές, βασικό δομικό χαρακτηριστικό της πλειοψηφίας των μελών της οικογένειας Bcl-2 αποτελεί μια **καρβοξυ-τελική υδρόφοβη περιοχή, TM (Transmembrane domain)**, χάρη στην οποία τα πεπτίδια προσδένονται σε μεμβράνες. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των πεπτιδίων διαφέρει, καθώς αντι-αποπτωτικά πεπτίδια όπως η Bcl-2 εντοπίζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ακεραιότητάς της, ενώ προ-αποπτωτικά πεπτίδια, όπως η Bax, εντοπίζονται κατά βάσιν στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου κατά την επίδραση ενός αποπτωτικού σήματος.(Petros, Olejniczak, and Fesik 2004)

Παρότι η τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας μοιάζει πολύ, η αμινοξική τους ακολουθία και φυσικά η λειτουργία τους διαφέρουν σημαντικά. Οι πρωτεΐνες εντοπίζονται κυρίως εκτός της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ωστόσο η ακριβής εισαγωγή τους και ο σχηματισμός συμπλόκων δεν είναι καλά κατανοητός. Η BCL-2 εντοπίζεται μόνιμα στις μεμβράνες, ενώ οι BCL-XL και BCL-W συνδέονται με τη μεμβράνη μετά από κάποιο κυτταροτοξικό σήμα. (Tzifi et al. 2012)

6.4. Μηχανισμός δράσης BCL2 πρωτεϊνών

Για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τον οποίον δρουν και αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 έχουν προταθεί τέσσερα μοντέλα: 1)Μοντέλο άμεσης ενεργοποίησης (direct activation), 2)Μοντέλο μετατόπισης (displacement), 3)Ενσωματωμένο μοντέλο (embedded together) και 4) Ενοποιημένα μοντέλα (unified models).

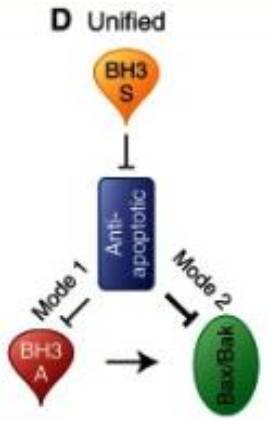
- **Direct activation Model**: Στο συγκεκριμένο μοντέλο, μια ομάδα BH3-only πρωτεϊνών, προσδένεται στις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες BAX και BAK, τις ενεργοποιεί και επάγει την απόπτωση. Οι πρωτεΐνες BH3-only ομαδοποιούνται στους <u>ενεργοποιητές (activators)</u> και στους <u>ευαισθητοποιητές (sensitizers).</u> Οι ευαισθητοποιητές, Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk, and Bnip3, προσδένονται μόνο στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Οι ενεργοποιητές, tBid, Bim, and Puma, μπορούν να προσδεθούν τόσο στις αντι- όσο και στις προ-

αποπτωτικές πρωτεΐνες BCL2. Έτσι, οι ενεργοποιητές προσδένονται στις BAX και BAK, οι οποίες ενεργοποιούνται, ολιγομερίζονται και σχηματίζουν κανάλια στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOMP) πυροδοτώντας τον αποπτωτικό μηχανισμό. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που επίσης συνδέονται με τους ενεργοποιητές, παρεμποδίζουν τη σύνδεση με τις BAX και BAK, προστατεύοντας την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ταυτόχρονα, οι ευαισθητοποιητές ανταγωνίζονται για πρόσδεση στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και όντας προσδεδεμένοι σε αυτές, επιτρέπουν στους ενεργοποιητές να προσδεθούν κανονικά στις BAD και BAX και να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Το μοντέλο αυτό, λοιπόν, προτείνει ότι ένα κύτταρο αποφεύγει την απόπτωση εξ' αίτιας της πρόσδεσης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στους ενεργοποιητές των BAX/BAK. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Shamas-Din et al. 2013)

- **Displacement Model**: Στο συγκεκριμένο μοντέλο οι BAX/ BAK είναι διαρκώς ενεργοποιημένες, ολιγομερίζονται, σχηματίζουν κανάλια στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και επάγουν την απόπτωση. Η δράση τους αυτή παρεμποδίζεται από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτές σχηματίζοντας ετεροδιμερή. Οι BH3 πρωτεΐνες δεν συνδέονται άμεσα με τις BAK/BAX, αλλά λόγω της ικανότητάς τους να προσδένονται στις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, έμμεσα «εκτοπίζουν» τις BAX/BAK από τα ετεροδιμερή και τους επιτρέπουν να δρουν επάγοντας την απόπτωση. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Shamas-Din et al. 2013)

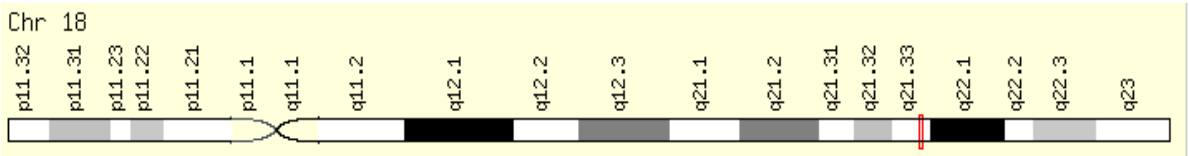
- **Embedded together Model**: Με βάση το μοντέλο αυτό η μιτοχονδριακή μεμβράνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των BAX/BAK και την επαγωγή της απόπτωσης. Όλες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών είναι αντιστρεπτές και οι ισορροπίες εξαρτώνται από τη συγγένεια πρόσδεσης των πρωτεϊνών και τις συγκεντρώσεις τους που μεταβάλλονται σε κάθε περιοχή της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με την μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλεί σημαντικές μορφολογικές μεταβολές που καθορίζουν την συγγένεια με την οποία προσδένονται σε άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας ή στην ίδια τη μεμβράνη. Έτσι, η επίτευξη ή όχι της απόπτωσης εξαρτάται από τον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι προ- και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες ανά περιοχή της μιτοχονδριακής μεμβράνης και από το εάν η αλληλεπίδραση αυτή καταλήγει ή όχι σε ενεργοποίηση των BAX/BAK. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Shamas-Din et al. 2013)

- **Unified models**: Το μοντέλο αυτό αποτελεί μια επέκταση του embedded together μοντέλου, καθώς ουσιαστικά διαχωρίζει την αλληλεπίδραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεινων με τους ενεργοποιητές BH3 ως mode 1 μονοπάτι και την αλληλεπίδραση με τις BAX/BAK ως mode 2 μονοπάτι. Και τα δυο αυτά μονοπάτια παρεμποδίζουν την απόπτωση με τη διαφορά ότι το μονοπάτι mode 1 είναι λιγότερο αποδοτικό και μπορεί ευκολότερα να παρεμποδιστεί από τους ευαισθητοποιητές BH3. (Siddiqui, Ahad, and Ahsan 2015; Shamas-Din et al. 2013)



6.5. Γονίδιο Bcl-2 (B-cell lymphoma gene number 2)

Το γονίδιο Bcl-2 (B-cell lymphoma gene number 2), που αποτελεί και το ένα από τα δυο γονίδια στα οποία η παρούσα μελέτη εστιάζει το ενδιαφέρον της, είναι το υπεύθυνο γονίδιο για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης BCL-2. Δεδομένου ότι κωδικοποιεί μια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, παρέχει στο κύτταρο προστασία έναντι του αποπτωτικού θανάτου. Το μήκος του εκτείνεται στα 196.783 ζεύγη βάσεων και έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 18 και συγκεκριμένα στη θέση 21.33 του μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος (18q21.33).



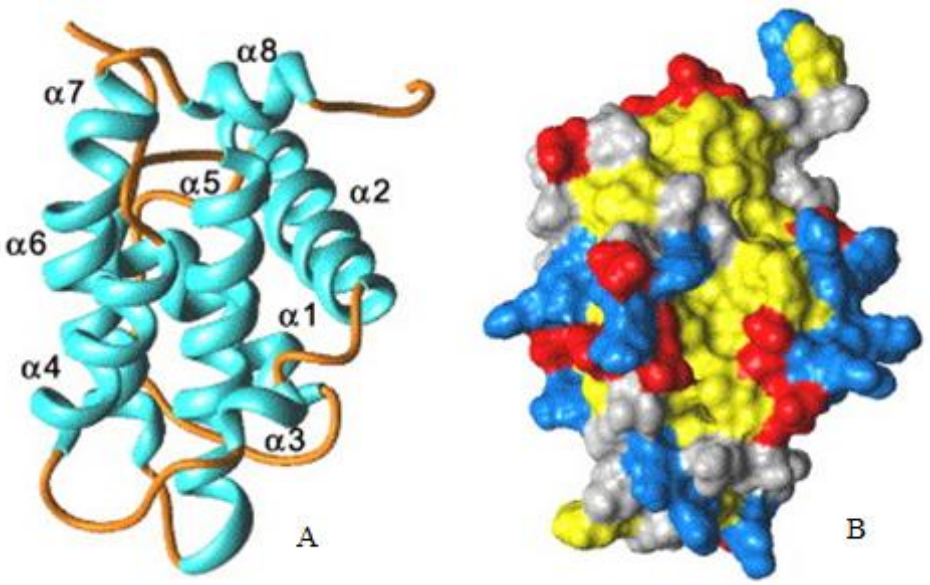
Εναλλακτικά το γονίδιο Bcl-2 ονομάζεται PPP1R50. Σχεδόν όλα τα μετάγραφα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα. Τα πολλαπλά μετάγραφα που προκύπτουν ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος δυσκολεύουν ακόμη περισσότερο την κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών της απόπτωσης. Έτσι, και το πρόδρομο μετάγραφο του γονιδίου Bcl-2, υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα και εν τέλει προκύπτουν δυο ισομορφές ώριμου mRNA, Bcl-2α και Bcl-2β. Οι ισομορφές αυτές κωδικοποιούν 2 πρωτεΐνες που διαφέρουν μόνο στην αλληλουχία των καρβοξυτελικών άκρων τους. Η πρωτεΐνη Bcl-2α διαθέτει στο καρβοξυτελικό της άκρο μια υδρόφοβη περιοχή που την καθιστά ικανή να προσδένεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και να συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης, προστατεύοντας το κύτταρο από το θάνατο. Η πρωτεΐνη Bcl-2β, αντίθετα, δεν περιέχει αντίστοιχη περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο και ως εκ τούτου δεν προσδένεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Εντοπίζεται κατά βάσιν στο κυτταρόπλασμα και δεν φαίνεται να έχει αντι-αποπτωτικό, αλλά ούτε και προ-αποπτωτικό ρόλο. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η έκφραση της ισομορφής Bcl-2α, η οποία χάριν συντομίας θα καλείται Bcl-2. (Akgul, Moulding, and Edwards 2004)

Gene	Alternative splice Variants[a]	Amino acid residues	Protein size (kDa)[b]	BH, TM domains[c]	Protein activity[d]	Subcellular localisation[e]
Bcl-2	Bcl-2*α*	239	26	BH1, 2, 3, 4, TM	AA	mitochondria
	Bcl-2*β*	205	22	BH1, 2, 3, 4	?	cytoplasm

Πίνακας 1. *Χαρακτηριστικά των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του μεταγράφου του Bcl-2.*

Η Bcl-2 αμινοξική αλληλουχία αποτελείται από 239 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 26266 Da. Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης έχει προσδιοριστεί βάσει κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και NMR φασματοσκοπίας (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy). Συνίσταται από 8 α-έλικες που σχηματίζουν μια υδρόφοβη αύλακα στην επιφάνειά της. Η θέση, το μέγεθος και ο ηλεκτροχημικός χαρακτήρας της αύλακας καθορίζουν ποια πεπτίδια θα προσδεθούν στην Bcl-2, καθιστώντας έτσι την πρόσδεση ειδική.

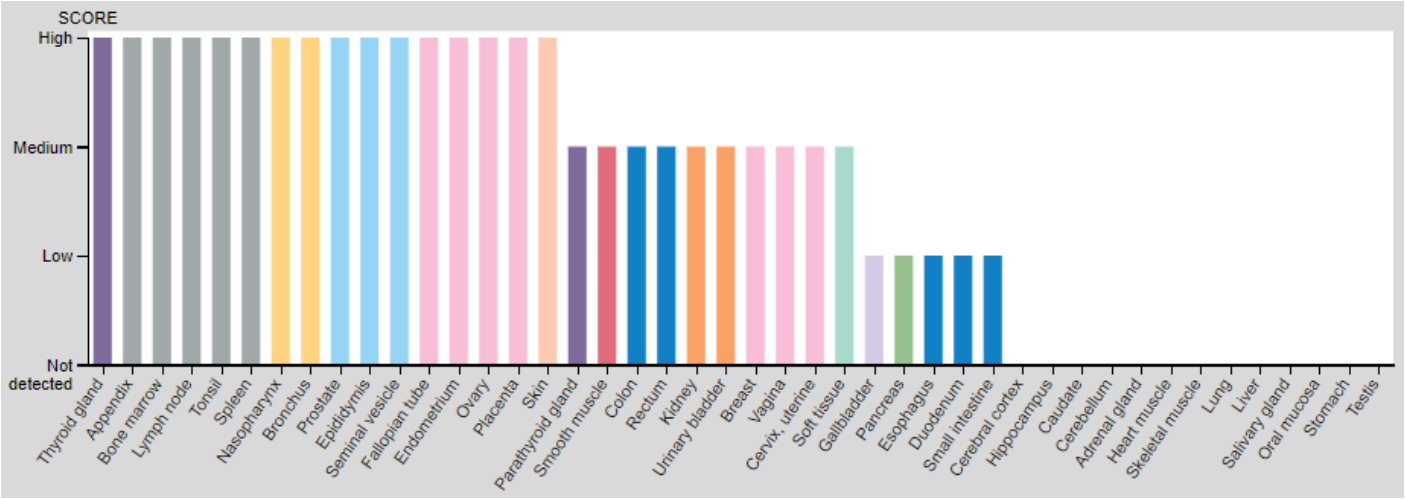


Εικόνα 50*. Τρισδιάστατη σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης Bcl-2. A. Ribbon Diagram B. Στην τρισδιάστατη δομή με κίτρινο χρώμα αναπαριστάται η υδρόφοβη αύλακα της πρωτεΐνης.*

Το γονίδιο Bcl2 εκφράζεται ευρύτατα σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα στον ανθρώπινο οργανισμό και τα επίπεδα έκφρασής του διαφοροποιούνται με βάση τον ιστό ή το όργανο αντίστοιχα.

Η έκφραση του γονιδίου στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας και συγκεκριμένα στην ωοθήκη είναι ιδιαιτέρως αυξημένη, όπως εύκολα παρατηρεί κανείς στα παρακείμενα διαγράμματα.

***Εικόνα 51**. Έκφραση mRNA Bcl2 και πρωτεΐνης ανά ιστό.*



***Διάγραμμα 8.** Έκφραση πρωτεΐνης BCL2 ανά όργανο.*

Ρόλος BCL-2 πρωτεΐνης

Η BCL-2 όπως προαναφέρθηκε, κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, συνδέεται μέσω της υδρόφοβης καρβοξυτελικής της περιοχής στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOM) και διατηρεί την ακεραιότητα της μεμβράνης αυτής αναστέλλοντας, έτσι, την απόπτωση. Παράλληλα, ετεροδιμερίζεται με την BAX και άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα που απενεργοποιούν την αποπτωτική δράση των δεύτερων και αναστέλλουν την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού με τρόπο που θα περιγραφεί στη συνέχεια. Αποτρέπει τον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών BAX και BAK, ο οποίος διαφορετικά θα οδηγούσε στην απελευθέρωση αποπτωγενών μορίων από το μιτοχόνδριο προκαλώντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τέλος, μπορεί να ρυθμίζει την ενεργοποίηση διαφόρων κασπασών όπως της κασπάσης-2, που δρουν ανοδικά ή/και ανεξάρτητα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και αναστέλλει άμεσα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των APAF-1 και κασπάσης-9. (Tzifi et al. 2012)

Η BCL-2 δεν έχει εντοπιστεί μόνο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αλλά και στον πυρηνικό φάκελο και στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Στην τελευταία, ρυθμίζει την αποθήκευση του ασβεστίου, του οποίου τα ενδοκυτταρικά επίπεδα έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την απόπτωση. Και στο ενδοπλασματικό δίκτυο δρα ανταγωνιστικά με τις BAX και BAK , που ασκούν τον αποπτωτικό τους ρόλο ελέγχοντας επίσης τα επίπεδα ασβεστίου, και ρυθμίζει τη δραστικότητα των πρωτεϊνών αυτών. Η σχετιζόμενη με το ενδοπλασματικό δίκτυο BCL-2 είναι σε θέση να προστατεύσει από την απόπτωση που επάγεται από διάφορους παράγοντες. Είναι πιθανό ότι η αντιαποπτωτική δράση της BCL-2 μετατρέπεται σε προ-αποπτωτική όταν η πρωτεΐνη διασπάται από τις κασπάσες μετά την έναρξη της απόπτωσης. (Tzifi et al. 2012)

Η αντι-αποπτωτική δράση της BCL-2 παρεμποδίζεται, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, από ορισμένες BH3-only πρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες ευαισθητοποιητές (sensitizers). Συγκεκριμένα, οι BAD και BIK επάγουν την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης παρεμποδίζοντας την δράση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η BCL-2.(Tzifi et al. 2012)

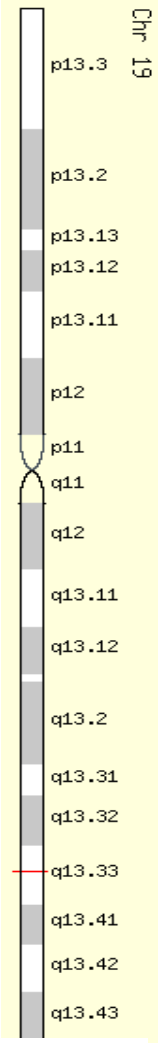
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη Bcl-2 είναι δυνατόν να υποστεί μια σειρά μετα-μεταφραστικών αλλαγών:

- **Φωσφορυλίωση/ αποφωσφορυλίωση**: Η επαγόμενη από αυξητικούς παράγοντες φωσφορυλίωση της Bcl-2 από την PKC στο κατάλοιπο της σερίνης-70 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης και την δράση της ως αντι-αποπτωτικό πεπτίδιο.
- **Πρωτεολυτική διάσπαση από κασπάσες κατά την απόπτωση**: Η Bcl-2 που έχει υποστεί την πρωτεολυτική δράση κασπασών, χάνει την περιοχή BH4 με αποτέλεσμα να αποκτά προ-αποπτωτική δράση. Επιτρέπει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιεί το καταρράκτη κασπασών.

- **Προσθήκη μορίων ουβικουιτίνης:** Όταν πραγματοποιείται από την PRKN προκαλεί αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης, ενώ όταν τα μόρια προστίθενται στην Bcl-2 από την SCF(FBXO10) η πρωτεΐνη «μαρκάρεται» για αποικοδόμηση.

6.6. Γονίδιο BAX (BCL2-associated X)

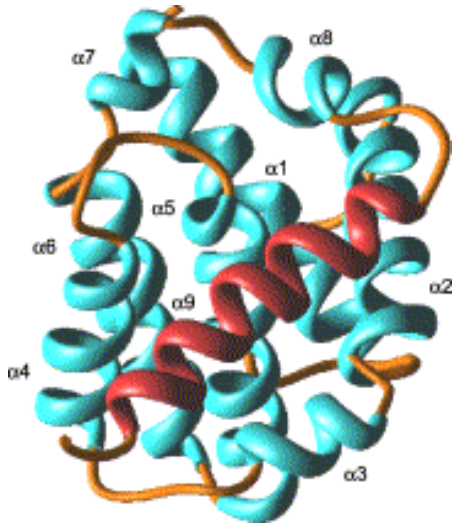


Το γονίδιο Bax (BCL2-associated X) αποτελεί το δεύτερο γονίδιο μελέτης της παρούσας εργασίας. Κωδικοποιεί την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax της Bcl-2 οικογένειας και ελέγχει στην αποπτωτική διαδικασία επάγοντάς την. Έχει μήκος 6.984 ζεύγη βάσεων και έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19 και συγκεκριμένα στη θέση 13.33 του μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος (19q13.33).

Η Bax πρωτεΐνη ήταν η πρώτη προ-αποπτωτική πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε στην οικογένεια Bcl-2. Εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και διαθέτει πολλαπλές παραλλαγές ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος του μεταγράφου του Bax γονιδίου. Συγκεκριμένα, το γονίδιο Bax μεταγράφεται και το πρόδρομο μετάγραφό του υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα από το οποίο προκύπτουν 8 διαφορετικά ώριμα μετάγραφα (Baxα, Baxβ, Baxγ, Baxδ, Baxε, Baxω, Baxσ, Baxψ) που όλα κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η Baxα είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη ισομορφή, η οποία περιέχει τις BH1, BH2, BH3 περιοχές και περιοχή TM, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και κατά τη σηματοδότηση της απόπτωσης μεταφέρεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η Baxβ εντοπίζεται επίσης στο κυτταρόπλασμα και παρότι δεν διαθέτει περιοχή πρόσδεσης στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, μπορεί να επάγει την απόπτωση. Ο ρόλος των υπόλοιπων ισομορφών στο μηχανισμό της απόπτωσης δεν έχει διασαφηνιστεί. Παρόλαυτα, οι ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.(Akgul, Moulding, and Edwards 2004)

Gene	Alternative splice Variants[a]	Amino acid residues	Protein size (kDa)[b]	BH, TM domains[c]	Protein activity[d]	Subcellular localisation[e]
Bax	Bax*α*	192	21	BH1, 2, 3, TM	PA	mitochondria
	Bax*β*	218	24	BH1, 2, 3	PA	cytosol
	Bax*γ*	41	5	–	NS	NS
	Bax*δ*	143	16	BH1, 2, TM	NS	NS
	Bax*ε*	164	18	BH1, 3	PA	NS
	Bax*ω*	221	24	BH1, 2, 3	PA	NS
	Bax*σ*	179	20	BH1, 2, 3, TM	PA	mitochondria
	Bax*ψ*	172	19	BH1, 2, 3, TM	PA	mitochondria

***Πίνακας 2**. Χαρακτηριστικά των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος του μεταγράφου του Bax.*



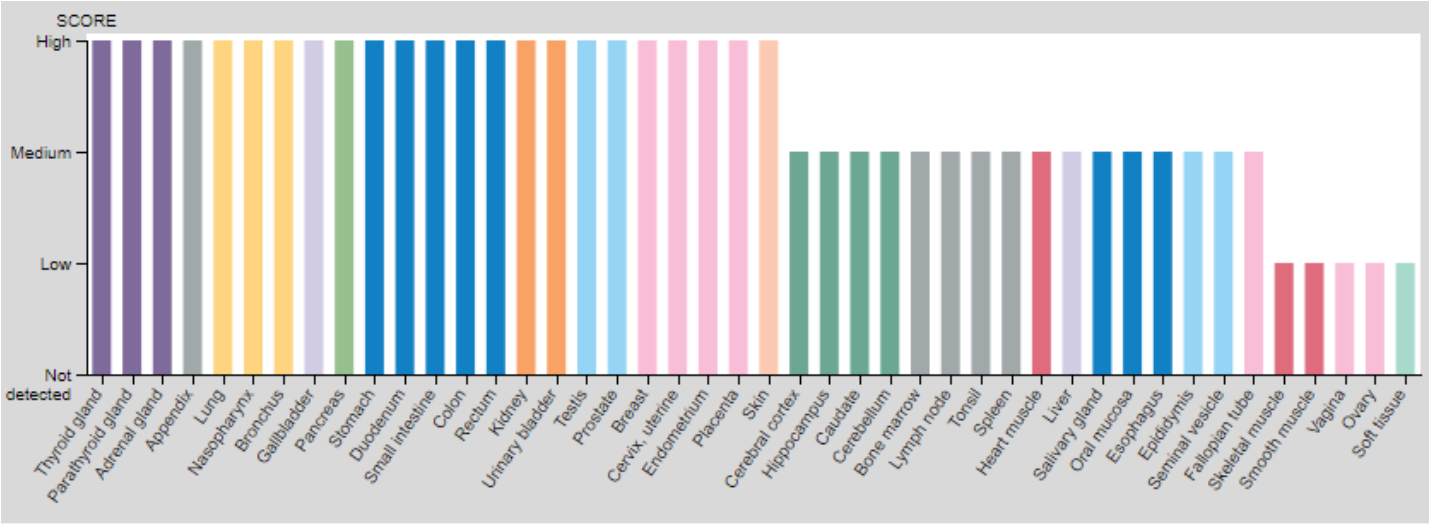
Εικόνα 52. *Τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης Bax (Ribbon Diagram).*

Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης Bax μοιάζει αρκετά με την Bcl-2. Αποτελείται από επτά αμφίφιλες α-έλικες, οι οποίες περιβάλλουν δυο κεντρικές υδρόφοβες α-έλικες. Ένας μακρύς, μη δομημένος βρόγχος συνδέει την α1 και την α2 έλικα και οι έλικες 2, 3 και 4 σχηματίζουν μια υδρόφοβη αύλακα. Η α-έλικα 9 συνδέεται με την υδρόφοβη αύλακα με τρόπο τέτοιο, ώστε η υδρόφοβη αύλακα να είναι «κρυμμένη». Το γεγονός αυτό πιθανότατα αυξάνει το βαθμό διαλυτότητας της πρωτεΐνης και ταυτόχρονα σχετίζεται με το ότι η Bax εντοπίζεται κατά βάσιν ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα και χρειάζεται την αύλακα πρόσδεσης μόνο μετά από το σήμα επαγωγής της απόπτωσης. (Petros, Olejniczak, and Fesik 2004)

Εικόνα 53*. Έκφραση mRNA Bax και πρωτεΐνης ανά ιστό.*

Όπως και η πρωτεΐνη BCL2, έτσι και η BAX έχει ευρεία έκφραση σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα. Παρουσιάζει μεγάλη έκφραση στον μυελό των οστών, στο πάγκρεας, στο συκώτι, στους πνεύμονες κλπ.

Η BAX εκφράζεται στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, αλλά συγκριτικά με την BCL2 τα επίπεδα έκφρασή της στην ωοθήκη είναι μικρότερα.



Διάγραμμα 9*.Έκφραση πρωτεΐνης BAX ανά όργανο.*

Ρόλος πρωτεΐνης BAX

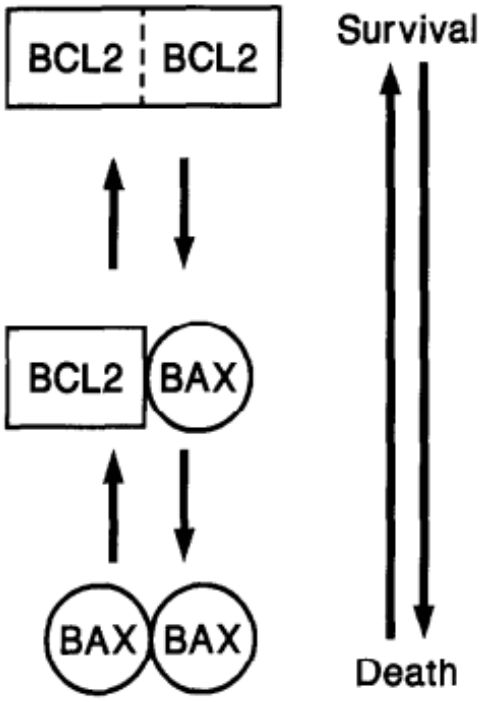
Η BAX αποτελείται από μια μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και παρουσία αποπτωτικού ερεθίσματος μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια. Εκεί, υφίσταται δομικές μεταβολές, ολιγομερίζεται χάρη στην παρουσία της BH3 περιοχής της και ενσωματώνεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου σχηματίζοντας κανάλια. Δεν είναι γνωστός ο ακριβής αριθμός των ολιγομερών BAX που απαιτούνται για τον σχηματισμό ενός καναλιού, αλλά είναι βέβαιο πως τα κανάλια διακόπτουν την συνέχεια της εξωτερική μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) και επιτρέπουν την απελευθέρωση παραγόντων που επάγουν την απόπτωση (λόγου χάρη κυτόχρωμα c) και την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Παρότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη ενεργοποίηση του παράγοντα APAF-1 και του καταρράκτη των κασπασών, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση των BAX και BAK είναι συνήθως αρκετή, ώστε το κύτταρο να οδηγηθεί στον θάνατο, ακόμη και αν στα κύτταρα δεν εντοπίζονται κασπάσες και APAF-1. Για το λόγο αυτό, στα κύτταρα των θηλαστικών, η ενεργοποίηση των BAX και BAK αποτελεί μονόδρομο προς τον αποπτωτικό θάνατο και ο καταρράκτης των κασπασών χρησιμεύει στην ολοκληρωτική καταστροφή του κυττάρου. (Delbridge et al. 2016) (Tzifi et al. 2012) (Birkinshaw and Czabotar 2017)

Η πρωτεΐνη είναι παρούσα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου ελέγχει την απόπτωση μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του ασβεστίου, δρώντας συνεργιστικά με την BAK και ανταγωνιστικά της BCL-2. Ο εντοπισμός της BCL-2 στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου υποστηρίζει την ιδέα ότι ρυθμίζει τη δραστικότητα των όμορων BAX και BAK. Επίσης, η P53 μπορεί να ενεργοποιήσει την BAX, ενώ κατά τη διάρκεια φάρμακο-επαγόμενης απόπτωσης η BAX διασπάται από κασπάσες και ενεργοποιημένες καλπαΐνες.(Tzifi et al. 2012)

Η δράση των πρωτεϊνών BAX και BAK ελέγχεται, όπως έχει προαναφερθεί και από μια ομάδα BH3-only πρωτεινών, οι οποίες καλούνται ενεργοποιητές (activators). Οι πρωτεΐνες BIM και BID, ανήκουν στην ομάδα αυτή και επάγουν τη δράση των BAX/BAK οδηγώντας στην αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης.(Tzifi et al. 2012)

Ετεροδιμερή BAX-BCL2

Η πρωτεΐνη BAX, λοιπόν, ομοδιμερίζεται, και σχηματίζει κανάλια στην επιφάνεια της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Παράλληλα όμως, έχει την ικανότητα να σχηματίζει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη BCL2 in vivo. Οι παρόμοιες δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών επιτρέπουν τον ετεροδιμερισμό τους και το σχηματισμό ενός συμπλόκου που προσδένεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ο σχηματισμός των ομοδιμερών BAX-BAX ευνοείται συγκριτικά με τον σχηματισμό συμπλόκων BAX-BCL2. Ωστόσο, η υπερέκφραση της BCL2 ανταγωνίζεται τον ομοδιμερισμό των BAX πρωτεϊνών και οδηγεί στον σχηματισμό ετεροδιμερών BCL2-BAX. Η προ-αποπτωτική δράση του Bax «εξουδετερώνεται» κατά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς, καθώς η πρωτεΐνη BAX δεν είναι πια ελεύθερη και ικανή να ομοδιμεριστεί, να σχηματίσει κανάλια στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και να επιτρέψει την απελευθέρωση αποπτωγενών μορίων στο κυτταρόπλασμα που θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες και θα επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Έτσι, ενώ η BAX δρα σαν ένα μόριο που επάγει το θάνατο, η BCL2 έχει δράση ανταγωνιστική και επάγει την επιβίωση τόσο μέσω της διατήρησης της ακεραιότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όσο και μέσω «εξουδετέρωσης» της προ-αποπτωτικής δράσης της BAX.



Διάγραμμα 10. *Η αλληλεπίδραση των BCL2 και BAX και ο τρόπος που επηρεάζει τη ροπή του θανάτου προς την επιβίωση ή τον θάνατο.*

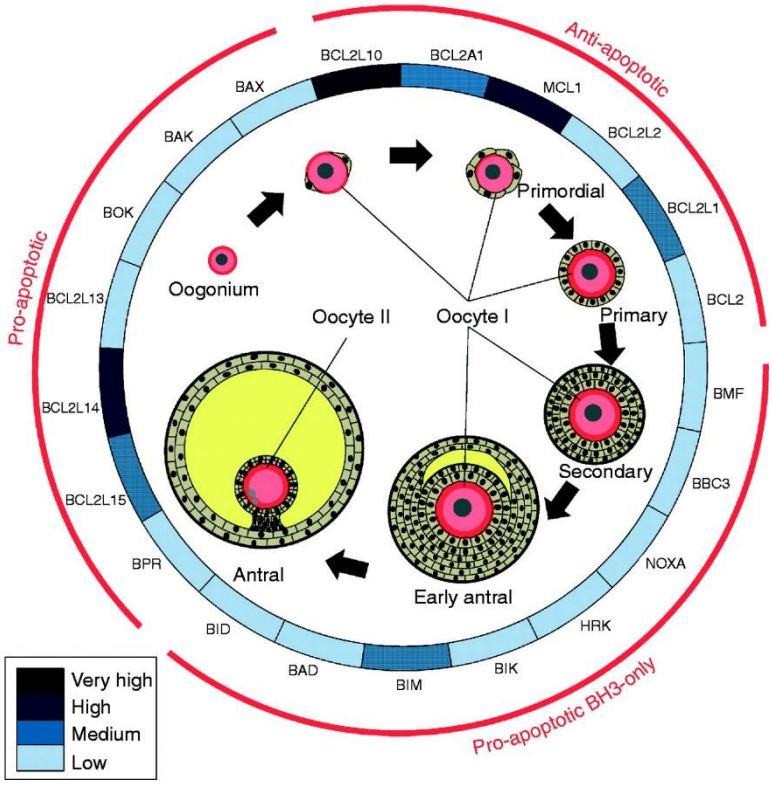
Συμπερασματικά, ο λόγος των επιπέδων έκφρασης της BCL2 προς τα επίπεδα έκφρασης της BAX έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η αύξησή του εκφράζει την ροπή του κυττάρου προς τη ζωή, ενώ η μείωσή του τη ροπή του κυττάρου προς το θάνατο.(Oltval, Milliman, and Korsmeyer 1993)

6.7. Έκφραση πρωτεϊνών BCL2 και BAX στο ωοκύτταρο και στο έμβρυο

Ορισμένες πρωτεΐνες- μέλη της οικογένειας BCL2 εκφράζονται στα ωοκύτταρα και στα αρχικά στάδια εμβρυογένεσης των θηλαστικών. Πρόσφατες μελέτες παρέχουν μια ευρεία εικόνα των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων των πρωτεϊνών αυτών, παρόλαυτα δεν επαρκούν για την πλήρη κατανόηση των ρυθμιστικών λειτουργιών των πρωτεϊνών. Το ωοκύτταρο και -σε μικρότερη έκταση- τα βλαστομερίδια του εκάστοτε εμβρύου ανήκουν στα μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρα ενός οργανισμού και για το λόγο αυτό πιθανόν απαιτείται ένας ξεχωριστός σχεδιασμός του αποπτωτικού μηχανισμού. Σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, ορισμένα μέλη της οικογένειας BCL2 εκφράζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και της πρώιμης εμβρυογένεσης. (Boumela et al. 2011)

Στο **ωοκύτταρο**, το πρωτεϊνικό μέλος με την ευρύτερη έκφραση είναι η BCL2L10 τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ποντίκια. Ο ρόλος της πρωτεΐνης BCL2 στη ρύθμιση της επιβίωσης του ωοκυττάρου έχει μελετηθεί ευρύτατα, καθώς η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το «ιδρυτικό» μέλος της οικογένειας. Παρόλαυτα, *τα επίπεδα έκφρασής της στα ανθρώπινα ωοκύτταρα, αλλά και στα ωοκύτταρα ποντικών παρουσιάζονται ιδιαιτέρως χαμηλά*. Ωοκύτταρα Bcl2 knockout ποντικών φαίνεται να περιέχουν μειωμένο αριθμό αρχέγονων ωοθυλακίων και η μείωση οφείλεται στον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης στα κοκκώδη κύτταρα που αποτρέπει τον σχηματισμό ωοθυλακίου και παρεμποδίζει την επιβίωση του ωοκυττάρου. Υπερέκφραση της BCL2 σε ωοκύτταρα ποντικών, οδήγησε σε γέννηση ποντικών με αυξημένο απόθεμα αρχέγονων ωοθυλακίων. Παράλληλα, υπερέκφραση της BCL2 στα σωματικά κύτταρα (κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα θήκης, κύτταρα στρώματος) ποντικών οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά αυτόματης ωορρηξίας. (Boumela et al. 2011)

Το προ-αποπτωτικό μέλος BAX εκφράζεται τόσο στα ανθρώπινα ωοκύτταρα, όσο και στα ωοκύτταρα ποντικών. Ανοσοχημικές αναλύσεις σε ανθρώπινα ωοκύτταρα κατέδειξαν ότι η πρωτεΐνη BAX ενεργοποιείται μετά την χορήγηση φαρμάκων που καταστρέφουν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων, αλλά και μετά από παρατεταμένες περιόδους καλλιέργειας. Σε Bax knockout ποντίκια παρατηρήθηκε κατά τη γέννηση τρεις φορές μεγαλύτερο απόθεμα ωοκυττάρων σε σχέση με τα ποντίκια που εξέφραζαν την πρωτεΐνη φυσιολογικά. Αυτή η περίσσεια ωοκυττάρων διατηρήθηκε μέχρι την ενήλικη φάση των πειραματόζωων οδηγώντας σε παράταση της αναπαραγωγικά ενεργής ζωής των ποντικών. Παράλληλα, πολλές μελέτες υπογραμμίζουν τη συμμετοχή της BAX στο επαγόμενο από εξωτερικά ερεθίσματα θάνατο των θηλυκών γαμετών. Συγκεκριμένα, μειωμένα επίπεδα BAX σε ωοκύτταρα ποντικών συνεπάγονται αυξημένη αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο που πυροδοτείται από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και τοξικά χημικά. (Boumela et al. 2011)

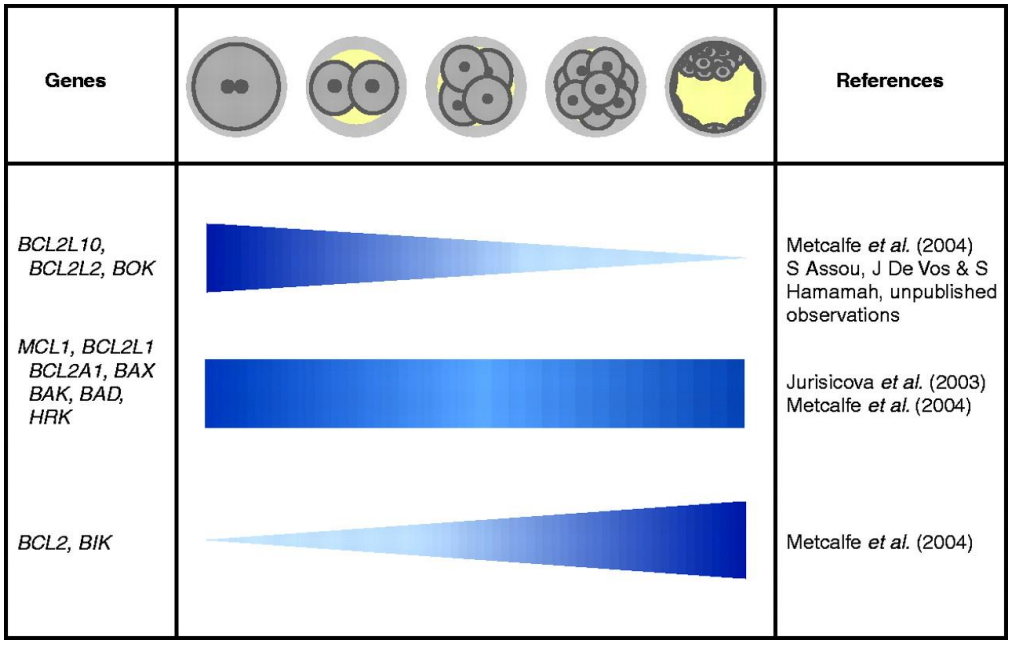


Εικόνα 54*. Έκφραση των μελών της οικογένειας BCL2 κατά τη διάρκεια της ωογένεσης στον άνθρωπο. Τόσο το BCL2 όσο και το BAX εκφράζονται στο πρωτογενές ωοκύτταρο.*

Στα **αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης** που προηγούνται της ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος, οι εμβρυϊκές λειτουργίες επιτελούνται σε μεγάλο βαθμό από μητρικά mRNAs, πρωτεΐνες και άλλα μόρια. Η έκφραση των πρωτεϊνών μελών της οικογένειας BCL2 μεταβάλλεται, καθώς κάποιες πρωτεΐνες εκφράζονται κατά βάσιν πριν την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (άρα είναι μητρικής προέλευσης), άλλες μετά την ενεργοποίησή του (εμβρυϊκής προέλευσης) και άλλες καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης πριν και μετά την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος.

Τα υψηλά επίπεδα των μεταγράφων BCL2L10 των ωοκυττάρων μειώνονται δραστικά μετά την γονιμοποίηση και έπειτα από το στάδιο των δυο κυττάρων. Η δραστική αυτή μείωση καταδεικνύει την πιθανότητα η BCL2L10 να παίζει κεντρικό ρόλο κατά την γονιμοποίηση και στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης και έπειτα η λειτουργία της να μην είναι πια χρήσιμη για το έμβρυο. (Boumela et al. 2011)

Το προ-αποπτωτικό γονίδιο BAX εκφράζεται μαζί με μια ομάδα άλλων πρωτεινών-μελών *(*MCL1, BCL2L1, BCL2A1*(*BFL1*)*, BAX, BAK, BAD *and* HRK) καθ' όλη τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυογένεσης μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης στον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημασία των πρωτεϊνών αυτών για τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL2 αυξάνονται δραστικά μετά το στάδιο τεσσάρων-οκτώ κυττάρων στα ανθρώπινα έμβρυα. (Boumela et al. 2011)



Εικόνα 55*. Το προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας BCL2 κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.*

Όπως είναι, λοιπόν, σαφές ο προ-αποπτωτικός παράγοντας BAX παρουσιάζει μια συνεχή έκφραση και επομένως αποτελεί μια συνεχή απειλή αποπτωτικού θανάτου τόσο για τα ωοκύτταρα όσο και για τα έμβρυα αρχικού σταδίου.

6.8. BCL2, BAX και Γονιμότητα – Έκφραση στα κοκκώδη κύτταρα

Σε προηγούμενο κεφάλαιο αναλύθηκε η κεντρική θέση που κατέχει ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στο απόθεμα ωοκυττάρων και ωοθυλακίων της γυναίκας. Το φαινόμενο εξάντλησης των ωοκυττάρων/ ωοθυλακίων από την 20^{η} εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής του θήλεος μέχρι και το τέλος της αναπαραγωγικής του ζωής είναι υπαρκτό και οφείλεται στον αποπτωτικό θάνατο των γεννητικών κυττάρων/ ωοθυλακίων, που καλείται ατρησία.

Η οικογένεια BCL2 ρυθμίζει τον αποπτωτικό μηχανισμό μέσω ρύθμισης του εσωτερικού μιτοχονδριακού μονοπατιού. Προφανώς, οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ενεργοποίηση και την παρεμπόδιση της απόπτωσης στις γυναικείες γονάδες είναι πολλοί και ιδιαιτέρως πολύπλοκοι και δεν εξαρτώνται αποκλειστικά από τη δράση της BCL2 οικογένειας. Έτσι, μπορεί οι BCL-2 πρωτεΐνες να συμμετέχουν ποικιλοτρόπως στον πολύπλοκο αποπτωτικό μηχανισμό, αλλά αποτελούν ένα συστατικό αυτού, το οποίο αλληλεπιδρά, συνεργάζεται και ανταγωνίζεται άλλα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά σήματα.

Το αναπτυξιακό δυναμικό του ωοκυττάρου, η ικανότητά του δηλαδή να ωριμάσει, να γονιμοποιηθεί και να υποστηρίξει τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αποτελεί έναν παράγοντα καθοριστικό για την όποια προσπάθεια τεκνοποίησης, είτε αυτή συμβαίνει

φυσικά, είτε σε ένα εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης. Όπως έχει ήδη αναλυθεί, η ποιότητα ενός ωοκυττάρου και το αναπτυξιακό του δυναμικό επηρεάζονται δραστικά από τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν (cumulus cells). Τα κύτταρα αυτά κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταροπλασματικής και της πυρηνικής ωρίμανσης του ωαρίου που θα το καταστίσουν εν τέλει ικανό να απελευθερωθεί από το ωοθυλάκιο και να γονιμοποιηθεί. Έτσι, η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα κέρδισε εύκολα το ερευνητικό ενδιαφέρον. Απώτερος στόχος της είναι συγκεκριμένα γονίδια να χρησιμοποιηθούν ως γονίδια-δείκτες της ποιότητας και του αναπτυξιακού δυναμικού του ωοκυττάρου.

Η έκφραση των γονιδίων BCL2 και BAX στα κοκκώδη κύτταρα έχει βρεθεί να συνδέεται με το αναπτυξιακό δυναμικό του ωοκυττάρου.

Οι αρχικές μελέτες που αφορούσαν το ρόλο που διαδραματίζει η οικογένεια BCL2 στην ρύθμιση του αποπτωτικού θανάτου στην ωοθήκη εστίασαν το ενδιαφέρον τους στην ενδογενή έκφραση των γονιδίων της οικογένειας. Η πρώτη μελέτη σε ωοκύτταρα ποντικών κατέδειξε ότι το αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των μεμβρανικών κοκκωδών κυττάρων σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου Bax, απουσία οποιασδήποτε αλλαγής στην έκφραση του Bcl2. Σε μελέτες που ακολούθησαν σε ωοκύτταρα ποντικών, πτηνών, πιθήκων, αλλά και ανθρώπων βρέθηκε ότι αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Bax -σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης- σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά θανάτου των μεμβρανικών κοκκωδών και αυξημένα ποσοστά ωοθυλακικής ατρησίας. (Kim and Tilly 2004)

Το πιο χαρακτηριστικό, ίσως, παράδειγμα για το πως η έκφραση του Bax σχετίζεται με την απόπτωση στην ωοθήκη διαφαίνεται στις μελέτες που αφορούν τον τρόπο με τον οποίο οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH) επάγουν τον αποπτωτικό θάνατο. Οι PAH απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα από την ατελή καύση των ορυκτών καυσίμων και το κάπνισμα και η αρνητική επίδρασή τους στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας έχει μελετηθεί εκτενώς. Παρότι πολλών ειδών χημικά προκαλούν βλάβες στις θηλυκές γονάδες, οι συγκεκριμένες ουσίες αναγνωρίζονται και προσδένονται σε μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, την AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση και πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το γονίδιο Bax αποτελεί μεταγραφικό της στόχο. Έτσι, μετά από πολλαπλά πειράματα σε ποντίκια διαπιστώθηκε ότι η έκθεση της ωοθήκης σε PAH επάγει την υπερέκφραση του γονιδίου Bax και επακόλουθα τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης σε αρχέγονα και πρωτογενή ωοκύτταρα.(Kim and Tilly 2004)

Η αυξημένη έκφραση, λοιπόν, του Bax αλλά και άλλων προ-αποπτωτικών γονιδίων στα ωοκύτταρα και στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται με την αυξημένη τάση των κυττάρων αυτών να υποκύπτουν στον αποπτωτικό θάνατο, καθιστώντας το Bax ένα γονίδιο με μεγάλη σημασία για την τύχη του ωοκυττάρου. Ανταγωνιστικά σε αυτήν την ροπή προς τον κυτταρικό θάνατο δρουν οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που επίσης εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και επάγουν την επιβίωση των ωοκυττάρων. Η τύχη, τελικά, οποιουδήποτε ωοθυλακίου και περιεχόμενου σε αυτό ωοκυττάρου καθορίζεται σε μεγάλο

βαθμό από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση αντι- και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2. (Kim and Tilly 2004)

Βάσει πολλών ερευνών που έχουν εκπονηθεί στο παρελθόν, ο λόγος της έκφρασης του Bcl2 προς εκείνη του Bax έχει κεντρικό ρόλο στην τύχη του κυττάρου, καθορίζοντας εάν τελικά το κύτταρο θα υποκύψει στα αποπτωτικά σήματα ή όχι. Ήδη από το 1993, ο Oltvai και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η αύξηση των επιπέδων του γονιδίου Bcl2 παρέτεινε την κυτταρική επιβίωση, ενώ η αύξηση στα επίπεδα του Bax οδηγούσε στον κυτταρικό θάνατο. Υπογράμμισαν, έτσι, τη σημασία του λόγου BCL2/BAX για την τύχη του κυττάρου. (Oltval, Milliman, and Korsmeyer 1993) Μια δεκαετία σχεδόν αργότερα, ο λόγος αυτός συσχετίστηκε με την επαγόμενη από το νιτρικό οξύ απόπτωση στην ωοθήκη. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα του Korzekwa και των συνεργατών του διαπίστωσαν ότι σε ωοθήκη βοοειδών παρουσία νιτρικού οξέος επάγεται ο αποπτωτικός θάνατος του ωχρού σωμάτιου. Ταυτόχρονα, παρουσία νιτρικού οξέος αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου Bax. Έτσι, μειώνεται ο λόγος BCL2/BAX και η μείωσή του συσχετίζεται με τον αποπτωτικό θάνατο του ωχρού σωμάτιου.(Korzekwa et al. 2006)

Το 2002 ο Host και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα κοκκώδη κύτταρα (CC) σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά ωοκυττάρων που δεν ωριμάζουν πλήρως και με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης μετά από ICSI.(Høst et al. 2002) Σε συνέχεια των πειραμάτων αυτών, μελετήθηκε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών η έκφραση διαφορετικών γονιδίων σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που εμπλέκονται στον αποπτωτικό μηχανισμό. Διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων σε συνδυασμό με την υπο-έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων είναι ενδεικτικές της ποιότητας του ωοκυττάρου και μετέπειτα του εμβρύου.(van Montfoort et al. 2008)

Σε μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα στα οποία ο αποπτωτικός θάνατος επάγεται υπό την επίδραση του cAMP, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του p53 και επακόλουθα υπερέκφραση του Bax. Η έκφραση του Bcl2 δεν υφίσταται κάποια αλλαγή με αποτέλεσμα, ο λόγος BCL2/BAX να μικραίνει και να επικρατεί η δράση των προ-αποπτωτικών γονιδίων.(Zwain, Zwain, and Amato 2001)

Η Depalo και οι συνεργάτες της μελέτησαν το φαινόμενο του αποπτωτικού θανάτου σε ανθρώπινα αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Διαπίστωσαν ότι στα αρχέγονα και στα πρωτογενή ωοθυλάκια ο αποπτωτικός μηχανισμός επιδρά αρχικά στο ωοκύτταρο και έπειτα στα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου, το οποίο εν τέλει αποπίπτει. Όσον αφορά τα ωριμάζοντα και τα πλήρως ώριμα ωοκύτταρα, παλιότερες μελέτες καταδεικνύουν ότι ο αποπτωτικός θάνατος ξεκινά στα κοκκώδη κύτταρα και καταλήγει στο ωοκύτταρο. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, τα ανώριμα ωοθυλάκια είναι ευάλωτα σε αποπτωτικά σήματα που προέρχονται από το ωοκύτταρο, ενώ τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια είναι περισσότερο ευαίσθητα στα αποπτωτικά σήματα που δέχονται μέσω των σωματικών τους κυττάρων. Παράλληλα, η ερευνητική ομάδα της Depalo διαπίστωσε ότι στα ανθρώπινα αρχέγονα ωοθυλάκια το γονίδιο Bcl2 δεν εκφράζεται στα μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα. Αντίθετα, εκφράζεται στα κοκκώδη δευτερογενών ωοθυλακίων, όπου μάλιστα παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση της αυξημένης έκφρασής του με την απουσία απόπτωσης. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτει η εξής υπόθεση: τα αρχέγονα ωοθυλάκια μόλις εισέλθουν στην φάση ανάπτυξης και ωρίμανσης οδεύοντας προς

ωορρηξία, αποκτούν αντι-αποπτωτικούς μηχανισμούς, ένας εκ των οποίων θα μπορούσε να είναι η έκφραση του Bcl2. Ως εκ τούτου, η έκφραση του γονιδίου αυτού θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη του αναπτυξιακού δυναμικού των ωοκυττάρων, δεδομένου ότι εκφράζεται στα ωοκύτταρα εκείνα που εν τέλει επιλέγονται κατά την ωορρηξία.(Depalo 2003)

Βάσει πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια έχει διαπιστωθεί ότι απουσία έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτείνης BAX, παρατηρείται βελτιωμένη γονιμότητα και αύξηση στον αριθμό των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι με μειωμένα επίπεδα BAX επιτυγχάνεται βελτιωμένη ωοθηκική λειτουργία.(Perez et al. 2007)

Η έρευνα του Assou και των συνεργατών του, ήταν η πρώτη μελέτη που συσχέτισε την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells) με την ποιότητα του εμβρύου και την έκβαση της εγκυμοσύνης. Το ένα από τα γονίδια που μελετήθηκαν, το BCL2L11 (BIM), ανήκει στην οικογένεια BCL2 και εμπλέκεται ως εκ τούτου στον αποπτωτικό μηχανισμό. Συγκεκριμένα, η BIM ανήκει στις BH3-only πρωτείνες, είναι προ-αποπτωτική, ανταγωνίζεται τη δράση της BCL2 και επάγει τη δράση της BAX. Παρά την προ-αποπτωτική δράση της BIM, η αυξημένη έκφρασή της συσχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η BCL2L11, η οποία συμμετέχει στην απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων, υπερεκφράζεται κατά την ωρίμανση των ωοκυττάρων και θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης. (S. Assou et al. 2008)

Σε πρόσφατη μελέτη τους οι Filali, Frydman και οι συνεργάτες τους ερεύνησαν την έκφραση των γονιδίων BCL2 και BAX σε κοκκώδη κύτταρα ασθενών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών και των ποσοστών ωρίμανσης των ωοκυττάρων, γονιμοποίησής τους και επακόλουθης εξέλιξης των εμβρύων. Όσον αφορά το Bcl2, βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασής του στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα (CC) σχετίζονται με την ικανότητα του ωοκυττάρου να ωριμάσει και να γονιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του Bcl2 βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στα κοκκώδη κύτταρα ώριμων ωοκυττάρων σε σύγκριση με ωοκύτταρα που δεν ολοκλήρωσαν τις μειωτικές διαιρέσεις και παρέμειναν στο στάδιο GV ή MI. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ικανότητα των ωοκυττάρων να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν σχετίζεται άμεσα με την έκφραση του Bcl2 στα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν και επομένως με το αποπτωτικό προφίλ των κυττάρων αυτών. Στην ίδια μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου με την ποιότητα των εμβρύων, εύρημα που αντιτίθεται σε αποτελέσματα άλλων ερευνών. Όσον αφορά το γονίδιο Bax, δεν βρέθηκε οποιαδήποτε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασής του με την ωρίμανση του ωοκυττάρου, τα ποσοστά γονιμοποίησης και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.(Filali et al. 2009)

Το αποτέλεσμα αυτό αναφορικά με το Bax αντιπαραβάλλεται στα αποτελέσματα πολλαπλών ερευνών που συσχετίζουν τα μειωμένα ποσοστά απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων με αυξημένα ποσοστά πλήρους ωρίμανσης και γονιμοποίησης ωοκυττάρων και καλύτερης ποιότητας έμβρυα.(van Montfoort et al. 2008; Corn et al. 2005; Almeida et al. 2018)

Η σημασία της αντι-αποπτωτικής δράσης του Bcl2 διαφαίνεται και στα πειράματα που πραγματοποίησαν ο Dhali και οι συνεργάτες του. Συγκεκριμένα, μελέτησαν τις μεταβολές στην έκφραση γονιδίων-δεικτών στα κοκκώδη κύτταρα ωοκυττάρων προβάτων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους και τον τρόπο με τον οποίο οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν την εξέλιξη των εμβρύων. Η έκφραση του Bax δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της ωοκυτταρικής ωρίμανσης, άρα δεν επηρέασε με κάποιο τρόπο τη διαδικασία αυτή. Αντίθετα, τα μειωμένα επίπεδα της BCL2 συσχετίστηκαν με την ατελή ωρίμανση των ωοκυττάρων και εν τέλει το μειωμένο δυναμικό τους να αναπτυχθούν και να γονιμοποιηθούν.(Dhali et al. 2017)

Τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών του Rocio και των συνεργατών του καταδεικνύουν ότι σε πτωχές απαντήτριες παρατηρείται αυξημένη απόπτωση στα κοκκώδη κύτταρα (granulosa και cumulus) συγκριτικά με γυναίκες που παρουσιάζουν φυσιολογική απάντηση στην ωοθηκική διέγερση. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μειωμένη άμυνα έναντι των ενεργών ριζών οξυγόνου και του οξειδωτικού στρες. Οι ερευνητές διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του Bax στα κοκκώδη κύτταρα (granulosa & cumulus) πτωχών απαντητριών συγκριτικά με τις γυναίκες που ανταποκρίθηκαν φυσιολογικά. Όσον αφορά το Bcl2 παρατήρησαν αυξημένη έκφραση μόνο στα μεμβρανικά κοκκώδη πτωχών απαντητριών. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν για άλλη μια φορά την ύπαρξη αμφίδρομης σχέσης μεταξύ ωοκυττάρου-κοκκωδών και την διαφορετική έκφραση αποπτωτικών γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στην ωοθηκική διέγερση. (Rocío 2019)

6.9. Νεότερα μέλη της οικογένειας BCL-2

Στην οικογένεια Bcl-2 εντάσσονται και νέες πρωτεΐνες-μέλη, πρόσφατα ταυτοποιημένες. Οι BCL2L10 (BOO/DIVA), BCL2L12, BCL2L13 (BCL-RAMBO), BCL2L14 (BCL-G), και MAP-1 (modulator of apoptosis-1) είναι ορισμένες από αυτές. (Tzifi et al. 2012)

Η BCL2L10 έχει αντι-αποπτωτική δράση και με τα υψηλότερα επίπεδά της να βρίσκονται συνήθως στο ήπαρ, το πάγκρεας, τα νεφρά, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί χαρτογραφείται στη θέση 15q21.2.

Το γονίδιο BCL2L12 χαρτογραφείται στη θέση 19q13.3 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCL2L12. Από το 2001 μέχρι και πολύ πρόσφατα, έχουν ανακαλυφθεί δεκατρείς παραλλαγές του αρχικού μεταγράφου του γονιδίου BCL2L12 που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Επτά από τα εναλλακτικά αυτά μετάγραφα κωδικοποιούν διακριτές ισομορφές της πρωτεΐνης BCL2L12, ενώ τα υπόλοιπα έξι είναι υποψήφια ως μη κωδικά πολυπετπιδικής αλυσίδας. Το κύριο BCL2L12 μετάγραφο παράγει την «κλασική» ισομορφή της πρωτεΐνης BCL2L12 (BCL2L12 is.1) που εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Σε αντίθεση με τα τυπικά μέλη της οικογένειας BCL-2, η BCL2L12 δεν επηρεάζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ή την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, αλλά αντ' αυτού ασκεί αντι-αποπτωτικό ρόλο μέσω πολλαπλών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Στον πυρήνα, η BCL2L12 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη

p53 και αποτρέπει την σύνδεσή της με υποκινητές των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, αναστέλλοντας έτσι τις p53κατευθυνόμενες μεταγραφικές μεταβολές μέσω βλάβης του DNA. Πολύ πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν 50 νέες παραλλαγές ματίσματος του γονιδίου, στην προσπάθεια για την αναζήτηση, τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό νέων παραλλαγών εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου BCL2L12 σε πολλές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Παρότι ο προ-αποπτωτικός ρόλος της πρωτεΐνης έχει περιγραφεί δεν είναι ξεκάθαρο εάν η δράση της είναι μόνο προ-αποπτωτική ή και αντι-αποπτωτική. Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών μετάγραφων που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου, θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα αντικρουόμενα σύγχρονα ερευνητικά αποτελέσματα για την εμπλοκή της BCL2L12 στην απόπτωση. (Adamopoulos et al. 2016)

Η BCL2L13 εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με την οικογένεια των πρωτεϊνών BCL-2, που περιέχουν και τις τέσσερις ομόλογες περιοχές BH (BH1 / BH2 / BH3 / BH4), εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και έχει προ-αποπτωτική δράση. Επάγει την απόπτωση τόσο ανεξάρτητα όσο και μέσω των κλασσικών οδών μιτοχονδριακής σηματοδότησης. (Tzifi et al. 2012)

Προ-αποπτωτική δράση φαίνεται να έχει και η BCL2L14. Το υπεύθυνο για την κωδικοποίησή της γονίδιο χαρτογραφείται στην θέση 12p12 και το πρόδρομο μετάγραφό του υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα από το οποίο προκύπτουν 3 ώριμα μετάγραφα που κωδικοποιούν όλα προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Τέλος, η πρωτεΐνη MAP-1 είναι μια BH3-only προ-αποπτωτική πρωτεΐνη, αλληλεπιδρά με τις BAX, BCL2, BCL-X_L και με το ίδιο το μόριό της, σχηματίζει διμερή in vivo και in vitro και επάγει την απόπτωση.(Tzifi et al. 2012)

6.10. Bcl-2 οικογένεια και καρκίνος

Παρότι δεν σχετίζεται με το θέμα της παρούσας εργασίας, δε θα μπορούσε να παραλειφθεί η αναφορά στο ρόλο της οικογένειας BCL2 στον καρκίνο. Το γονίδιο Bcl2 ήταν το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε να σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση και την παρεμπόδιση του κυτταρικού θανάτου. Τριάντα και πλέον χρόνια μετά την ανακάλυψή του, η ταυτοποίηση πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων που συνιστούν την οικογένεια Bcl2 και εμπλέκονται στον αποπτωτικό μηχανισμό είναι γεγονός. Το πολύπλοκο δίκτυο των αλληλεπιδράσεων των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας καθορίζει την τύχη του κυττάρου και την ικανότητά του να αντιστέκεται στον αποπτωτικό θάνατο. Υπερέκφραση της BCL2 έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις προχωρημένων και διηθητικών λεμφωμάτων Β-κυττάρων, μικρών καρκινωμάτων στον πνεύμονα, αλλά και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας. Μεταβολές στον αριθμό των επιπέδων έκφρασης και άλλων πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας (BCLX, MCL1, BOK) έχουν παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο. Ειδικότερα, η BCL-XL υπερεκφράζεται σε πλήθος καρκινικών τύπων στον άνθρωπο και φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, νευροβλαστώματος, καρκίνου του παχέος εντέρου, γαστρικού αδενώματος, καρκίνου του προστάτη κ.α.

ακόμη, μεταλλαγές στις αλληλουχίες προ-αποπτωτικών γονιδίων έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, μεταλλαγές στην αλληλουχία του BAX που προκαλούν απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση συγκεκριμένων αιμοποιητικών καρκίνων. Η προβληματική, εν ολίγοις, ρύθμιση και ο ελλιπής έλεγχος του αποπτωτικού θανάτου συμβάλλουν στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση στην εμφάνιση κακοηθειών και την ογκογένεση. (Delbridge et al. 2016)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη της αναπαραγωγικής υγείας του άντρα και της γυναίκας και συγκεκριμένα η μελέτη όλων εκείνων των παραγόντων και των διαταραχών που επηρεάζουν την φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος των ατόμων αποτελεί ένα πεδίο εκτενούς και συνεχούς διερεύνησης. Αν κανείς εστιάσει στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η γονιδιακή έκφραση των κοκκωδών κυττάρων, της πλειοψηφίας δηλαδή των κυττάρων που περιέχονται στο ωοθυλάκιο και αλληλεπιδρούν στενά με το ωοκύτταρο σε όλα τα στάδια της ωογένεσης/ ωοθυλακιογένεσης. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση γονιδίων-δεικτών που θα επιτρέπουν την επιλογή των ωοκυττάρων με το μεγαλύτερο αναπτυξιακό δυναμικό και την υψηλότερη πιθανότητα να οδηγήσουν σε έμβρυα καλής ποιότητας και επίτευξη εγκυμοσύνης είναι αναμφίβολα έντονο.

Στο πλαίσιο αυτό διαμορφώθηκε και η ερευνητική υπόθεση της παρούσας εργασίας που συνοψίζεται στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των εκφράσεων στα κοκκώδη κύτταρων δυο γονιδίων που συμμετέχουν στην ρύθμιση της απόπτωσης με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης (blastulation rate).

Τα γονίδια που επιλέχθηκαν, συγκεκριμένα είναι τα γονίδια Bcl-2 και Bax. Ήδη, από το 1993 έχει διαπιστωθεί η σημασία του λόγου των εκφράσεων των προαναφερθέντων γονιδίων, η οποία συσχετίζεται με τη ροπή που εμφανίζει ένα κύτταρο να αντισταθεί ή να υποκύψει σε ένα αποπτωτικό σήμα. Η παρούσα μελέτη, λοιπόν, σχεδιάστηκε με στόχο την **διερεύνηση της σχέσης που υπάρχει μεταξύ του λόγου των εκφράσεων Bcl-2/Bax στα κοκκώδη κύτταρα και της ηλικίας της γυναίκας, του ποσοστού γονιμοποίησης και του ποσοστού των εμβρύων που προχώρησαν στο στάδιο της βλαστοκύστης.**

Η προσπάθεια ανάλυσης του γονιδιακού προφίλ των κοκκωδών κυττάρων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο, μη επεμβατικό εργαλείο κατά τη θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η οποία θα γινόταν κατ’ αυτόν τον τρόπο πολύ πιο αποτελεσματική και ουσιαστικά εξατομικευμένη. Η μελέτη των γονιδίων Bcl-2 και Bax αποσκοπεί στην πιθανή μελλοντική χρήση αυτών ως προγνωστικών, μη-επεμβατικών δεικτών της τύχης του ωοκυττάρου

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων Bcl2 και Bax σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που υποβλήθηκαν σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε:

- Συλλογή και επεξεργασία των κοκκωδών κυττάρων.
- Εξαγωγή και απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων.
- Σύνθεση συμπληρωματικού (complementary) DNA, cDNA.
- Έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων Bcl2 και Bax με Real Time PCR στα προς μελέτη δείγματα.
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, με σκοπό τον ποιοτικό έλεγχο της ενίσχυσης αποκλειστικά των επιθυμητών προϊόντων .

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο Γ.Π.Ν. «Αλεξάνδρα» κατά τη διάρκεια των ωοληψιών 41 συνολικά γυναικών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ωοληψίας γίνεται διακολπική παρακέντηση των ωοθυλακίων με συνεχή υπερηχογραφικό έλεγχο. Το περιεχόμενο των ωοθυλακίων αναρροφάται με βελόνα παρακέντησης και τα συμπλέγματα ωοκυττάρου-κοκκωδών κυττάρων (COCs) απομονώνονται από το ωοθυλακικό υγρό και μεταφέρονται σε τρυβλία που περιέχουν καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό.

Αμέσως μετά την ωοληψία, τα ωοκύτταρα μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν, φυλάσσονται σε επωαστή με συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, αερίων και υγρασίας μέχρις ότου συμπληρωθούν 36 ώρες από την τελευταία ένεση hCG (Ovitrelle, Pregnyl). Ακολούθως, πραγματοποιείται ο καθαρισμός των ωοκυττάρων (oocyte denudation), τόσο με ενζυμική κατεργασία με την προσθήκη υαλουρονιδάσης, όσο και με μηχανική κατεργασία με τη χρήση σιφωνίων (πιπετών).

Η υαλουρονιδάση διασπά τους δεσμούς υαλουρονικού οξέος μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων αλλά και τις συνδέσεις τους με το ωοκύτταρο. Η κατεργασία με το ένζυμο αυτό σε συνδυασμό με την μηχανική δράση που ασκείται από πιπέτες με διάμετρο στομίου σταδιακά μειούμενη, διαχωρίζουν τα ωοκύτταρα από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν. Η συλλογή των κοκκωδών κυττάρων πραγματοποιήθηκε εύκολα με την χρήση ειδικής πιπέτας μετά την απομάκρυνση των ωαρίων.

Τα δείγματα των κοκκωδών κυττάρων αναμείχθηκαν με PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 1000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1ml PBS και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 1000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πάλι ,το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε πολύ μικρό όγκο PBS και ψύχθηκε άμεσα με τη χρήση υγρού αζώτου (snap freezing).

2.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση του RNA βασίζεται στην χρήση στηλών μεμβράνης πυριτίου (selective binding to silica-based membranes). Συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται επιλεκτικά και παροδικά στις μεμβράνες που έχουν ως βάση το διοξείδιο του πυριτίου, παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων αλάτων και συνθηκών pH. Σε αυξημένες συνθήκες αλατότητας, τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια ως προς τα θετικά φορτισμένα μόρια πυριτίου της μεμβράνης και δεσμεύονται σε αυτήν. Παρουσία αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος, η δέσμευση αυτή αίρεται, το νουκλεϊκό οξύ διαπερνά τη μεμβράνη της στήλης και εκλούεται.

Η διαδικασία ξεκινά με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος (RLT Buffer) που έχει την ιδιότητα να λύει τα κύτταρα. Το διάλυμα αυτό χάρις στην υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικών αλάτων που περιέχει απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες, RNases. Οι RNases είναι ένζυμα που περιέχονται στο διάλυμα και αποδομούν το RNA, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν την απομόνωση του ολικού RNA του δείγματος. Για το λόγο αυτό, το ρυθμιστικό διάλυμα RLT είναι απαραίτητο κατά τη διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA, καθώς πέραν της ιδιότητάς του να κρατά σταθερό pH κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και να λύει τα κύτταρα, εξασφαλίζει ταυτόχρονα την αναστολή των ριβονουκλεασών. Ως εκ τούτου, ελαχιστοποιεί την πιθανότητα αποδόμησης του RNA. Επιπλέον, δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση του RNA στην στήλη μεμβράνης πυριτίου QIAamp spin column.

Αμέσως μετά την πρόσδεση του RNA στην στήλη ακολουθούν διαδοχικά πλυσίματα, καθώς και αφαλάτωση της μεμβράνης της στήλης. Κατά την αφαλάτωση της μεμβράνης απομακρύνονται ίχνη αλάτων που έχουν απομείνει στην στήλη από την χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά τα αρχικά στάδια του πρωτόκολλου. Εν τέλει, το χαμηλό ιοντικό προφίλ και οι συνθήκες αλατότητας που εξασφαλίζονται από τη χρήση νερού απαλλαγμένου από ριβονουκλεάσες (RNase free water) επιτρέπουν την έκλουση RNA υψηλής καθαρότητας.

Πρωτόκολλο

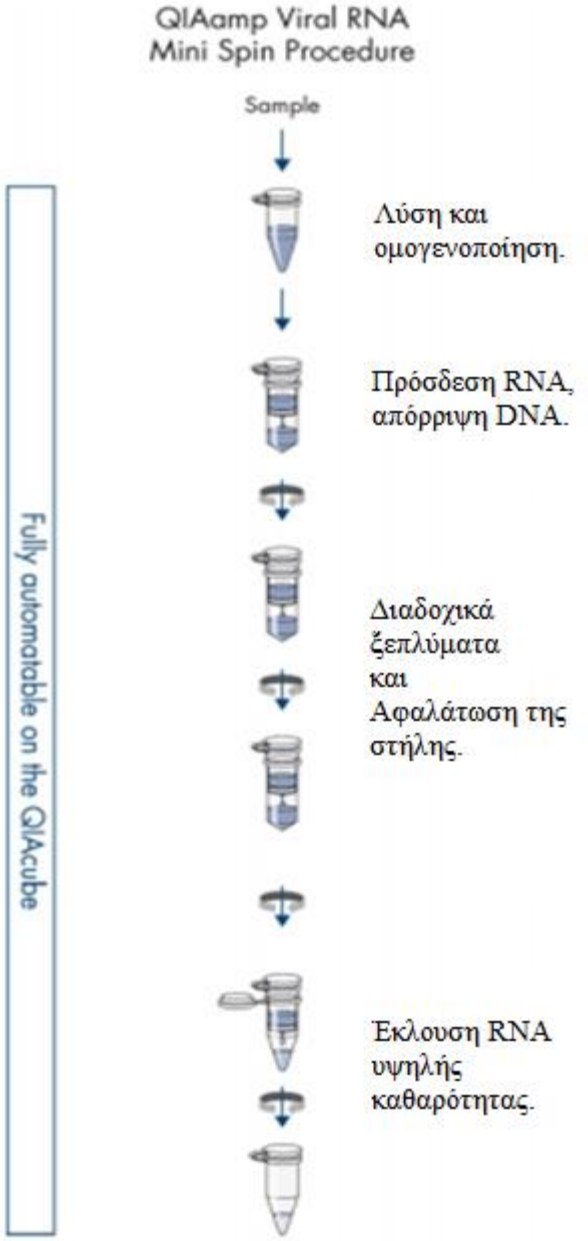
Η απομόνωση του RNA των κοκκωδών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμης τυποποιημένης συσκευασίας QIAamp® RNA Blood Mini Kit της QIAGEN.(“QIAamp RNA Blood Mini Handbook.Pdf” n.d.) Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρέχεται από την εταιρία μαζί με το προϊόν (QIAamp® RNA Blood Mini Handbook) και η διαδικασία της απομόνωσης συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα:

Διάσπαση/Λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων:

1. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 350μl **RLT buffer** μέχρι την πλήρη διάλυσή του.
2. Μεταφορά του διαλύματος στην **στήλη QIAshredder spin column** που παρέχεται από το kit και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στον μέγιστο αριθμό στροφών (1400 στροφές).
3. Απόρριψη της στήλης που συγκρατεί τα μη νουκλεϊκά προϊόντα της λύσης των κυττάρων (πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, μεμβράνες κλπ). Στον προϊόν της λύσης – διήθημα περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα RNA και DNA που διαπέρασαν την στήλη κατά την φυγοκέντρηση.

Πρόσδεση RNA:

4. Προσθήκη 350μl διαλύματος **αιθανόλης περιεκτικότητας 70%** στο διήθημα και μηχανική ανάδευση με χρήση πιπέτας.
5. Μεταφορά του διαλύματος και του όποιου ιζήματος έχει σχηματιστεί σε **στήλη QIAamp spin column** που παρέχεται από το kit και περιέχει το φίλτρο δέσμευσης του RNA. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 1400 στροφές. (Ο μέγιστος όγκος που είναι δυνατόν να φορτωθεί στη στήλη είναι 700μl. Επομένως, σε περίπτωση που ο όγκος του δείγματος υπερβαίνει τα 700μl φορτώνεται και φυγοκεντρείται προοδευτικά στη στήλη με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε).
6. Απόρριψη του διηθήματος που περιέχει το DNA. Η στήλη μετά τη φυγοκέντρηση συγκρατεί στη μεμβράνη της το RNA.



***Εικόνα 56**. Διαδικασία απομόνωσης ολικού PNA με τη χρήση του QIAamp® RNA Blood Mini Kit.*

Διαδοχικά Ξεπλύματα (Washes) και Αφαλάτωση Στήλης:

7. Μεταφορά της στήλης QIAamp σε νέο tube συλλογής και προσθήκη 700μl **RW1 Buffer**. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 1400 στροφές.
8. Απόρριψη διηθήματος και μεταφορά της στήλης σε νέο tube συλλογής. Προσθήκη 500μl **RPE Buffer** στη στήλη και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις

1400 στροφές. Το ρυθμιστικό διάλυμα RPE ξεπλένει την στήλη και η βασική του λειτουργεία είναι η απομάκρυνση ιχνών αλάτων που έχουν απομείνει σε αυτήν.

9. Εκ νέου προσθήκη 500μl RPE στη στήλη και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 1400 στροφές.
10. Απόρριψη διηθήματος και μεταφορά της στήλης σε tube συλλογής χωρητικότητας 1,5ml.

Έκλουση RNA υψηλής καθαρότητας:

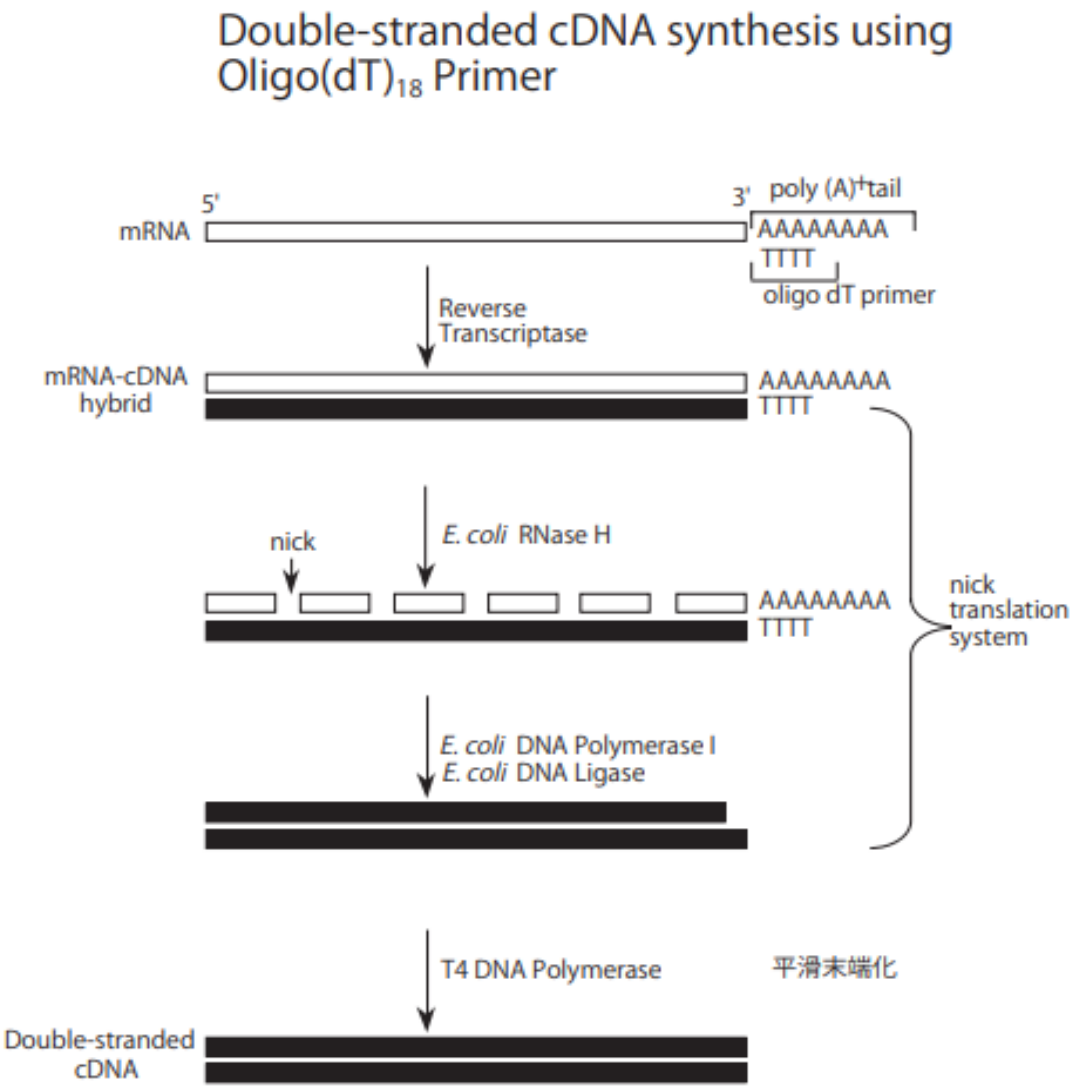
11. Προσθήκη 20μl **RNAse-free water** και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 1400 στροφές.
12. Συλλογή εκλούματος καθαρού RNA και αποθήκευση στους -80 ^{o}C.

2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Το ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κοκκώδη κύτταρα αποτέλεσε το υπόστρωμα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Η σύνθεση του cDNA (complementary DNA -συμπληρωματικό DNA) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του PrimeScript^{TM} RT reagent Kit (Perfect Real Time) της TaKaRa. Το kit είναι σχεδιασμένο για την γρήγορη και ταυτόχρονα αξιόπιστη σύνθεση δίκλωνου cDNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε Real Time PCR. Η σύνθεση πραγματοποιείται με την μέθοδο Gubler & Hoffman. (“CDNA Synthesis Invitrogen” n.d.)

Αρχή της μεθόδου

Το cDNA είναι ένα μόριο DNA που έχει συντεθεί από ώριμο mRNA. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complementary DNA-cDNA) με την χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Κατ’ αυτόν τον τρόπο, παράγονται υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Τα μόρια αυτά αποδιατάσσονται με αύξηση της θερμοκρασίας και το mRNA διασπάται με τη χρήση ριβονουκλεασών (*E. coli* RNase H.) Τα επιμέρους τμήματα (nicks) που προκύπτουν από τη δράση της ριβονουκλεάσης χρησιμεύουν σαν πρωταρχικά τμήματα για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA με τη βοήθεια DNA πολυμερασών (*E. coli* DNA Polymerase). Τα τμήματα της ασυνεχούς αλυσίδας που προκύπτει συνδέονται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση (*E. coli* DNA ligase).



Εικόνα 57. *Στάδια σύνθεσης συμπληρωματικού DNA*

Πρωτόκολλο

Το kit περιέχει:

1. 5 X PrimeScriptTM Buffer (for Real Time) (περιέχει μίγμα dNTPs και Mg^{2+})

2. PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I

3. Oligo dT Primer 50 μM

4. Random 6mers 100 Mm

5. RNase Free dH_2O

6. EASY Dilution Buffer (for Real Time PCR)

Τα τυχαία εξαμερή και το διάλυμα Oligo dT Primer χρησιμεύουν ως πρωταρχικά τμήματα για την σύνθεση του cDNA.

Κατά την εκτέλεση του πειράματος δημιουργείται ένα master mix που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια σε συγκεκριμένες ποσότητες ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Η δημιουργία του master mix επιτρέπει την ανάμειξη των αντιδραστηρίων, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιεί την πιθανότητα απώλειας αντιδραστηρίων με τον χειρισμό της πιπέτας. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι ποσότητες που προστίθενται στο master mix για **μια αντίδραση τελικού όγκου 10μL**.

< For 1 reaction >

Reagent	Amount
5 × PrimeScript™ Buffer (for Real Time)	2 μl
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 μl
Oligo dT Primer (50 μ M)*1	0.5 μ l
Random 6 mers (100 μ M)*1	0.5 μ l
total RNA	
RNase Free dH_2O	
Total	10 μ l *2

Το master mix χωρίζεται σε mini eppendorf tubes με τέτοιο τρόπο, ώστε καθένα να περιέχει 9μL. Τέλος, σε κάθε tube προστίθεται 1μL από το ολικό mRNA του δείγματος. Οι αντιδράσεις σύνθεσης sscDNA πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή TAKARA PCR thermal cycler.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό συγκεκριμένες συνθήκες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Θερμοκρασία	**Χρονικό διάστημα**	
37ºC	15min	Αντίστροφη μεταγραφή
85 ºC	5sec	Απενεργοποίηση της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης.
4 ºC	∞	Ψύξη

2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκε το 1983 από τον αμερικανικής καταγωγής βιοχημικό Kary Banks Mullis. Το 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το «μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα» και το 1993 ο K. Mullis βραβεύτηκε με το Νόμπελ Χημείας.

Σκοπός της PCR είναι ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων DNA αλληλουχιών-στόχων και η δημιουργία χιλιάδων ή και εκατομμυρίων αντιγράφων των αλληλουχιών αυτών. Απαραίτητη για την πραγματοποίηση της διαδικασίας καθίσταται η ύπαρξη του **ενζύμου της DNA πολυμεράσης** και των **εκκινητών**. Οι εκκινητές είναι μικρά μονόκλωνα τμήματα DNA, γνωστά και ως ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς την αλληλουχία – στόχο που πρόκειται να ενισχυθεί. ("PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time)" n.d.)

Κάθε κύκλος ενίσχυσης της PCR αποτελείται από τρία στάδια τα οποία εξαρτώνται άμεσα από την θερμοκρασία και επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Συγκεκριμένα τα στάδια ενός κύκλου είναι:

1) **Αποδιάταξη (denaturation)** του γενετικού υλικού, λόγω αυξημένης θερμοκρασίας. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 95°C. Στην θερμοκρασία αυτή τα δίκλωνα μόρια του DNA αποδιατάσσονται/ αποχωρίζονται ολοκληρωτικά και οι μονόκλωνες αλυσίδες που προκύπτουν χρησιμεύουν ως εκμαγεία για την σύνθεση συμπληρωματικών.

2) **Υβριδισμός των εκκινητών (annealing)** στην συμπληρωματική τους αλληλουχία DNA-στόχο, μετά από πτώση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών T_m (Melting Temperature) είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m διαφέρει μεταξύ των εκκινητών και εξαρτάται από το μέγεθος και την περιεκτικότητά τους σε βάσεις αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Έτσι, επηρεάζει άμεσα την θερμοκρασία υβριδισμού τους και αποτελεί βασικό παράγοντα εξειδίκευσης της αντίδρασης. Κυμαίνεται τυπικά μεταξύ 58 και 68°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού προσδιορίζεται πειραματικά, αλλά υπολογίζεται γύρω στους 3°C χαμηλότερα από την μικρότερη T_m των δυο εκκινητών.

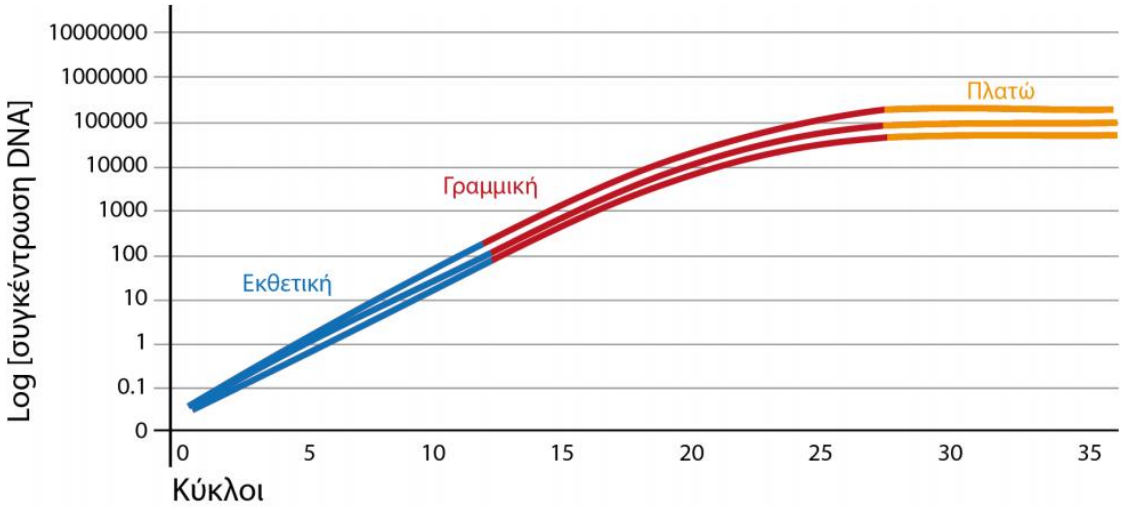
3) **Επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA (extension/ elongation).** Οι δύο αλυσίδες του DNA γίνονται καλούπια για τη σύνθεση δύο νέων, συμπληρωματικών αλυσίδων με τη βοήθεια του ενζύμου της Taq DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, όπου η δράση της θερμοανθεκτικής Taq βελτιστοποιείται και οδηγεί σε επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5' -> 3', σε περιβάλλον περίσσειας των τεσσάρων φωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Καθώς η PCR προχωράει, το δίκλωνο DNA που παράγεται και αποτελείται από έναν αρχικό και έναν νεοσυντιθέμενο κλώνο αποδιατάσσεται ξανά με αύξηση της θερμοκρασίας και οι δυο αλυσίδες του χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την σύνθεση νέων αλυσίδων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση κατά την οποία η αρχική αλληλουχία - στόχος ενισχύεται σημαντικά.

Κινητική της αντίδρασης

Η κινητική μιας αντίδρασης PCR αφορά την αύξηση των προϊόντων της αντίδρασης σε σχέση με τους κύκλους της. Θεωρητικά, τα προϊόντα αυξάνονται εκθετικά, αφού κάθε νέος κλώνος χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο. Στην πραγματικότητα όμως, κάθε αντίδραση PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

1. **Εκθετική φάση (expotential phase)**: Αρχίζει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας - στόχου και όλα τα αντιδρώντα βρίσκονται σε επάρκεια, με αποτέλεσμα η αντίδραση να είναι πολύ αποτελεσματική.
2. **Γραμμική φάση (linear phase)**: Μειώνεται η παραγωγή των αντιγράφων, εξαιτίας της σταδιακής εξάντλησης των αντιδρώντων.
3. **Φάση κορεσμού (plateau phase):** Δεν συντίθενται πλέον νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδρώντων.



Διάγραμμα 11*. Καμπύλες ενίσχυσης qPCR. Τα διαφορετικά χρώματα διακρίνουν τις διαφορετικές φάσεις της αντίδρασης.*

Σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί πολλές παραλλαγές της κλασσικής PCR και μια εξ' αυτών είναι η **ποσοτική PCR , Real Time qPCR** που χρησιμοποιήθηκε και ως βασική πειραματική τεχνική στην παρούσα εργασία. Τα στάδια ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου

μεταξύ κλασσικής και Real Time PCR είναι τα ίδια. Το ίδιο ισχύει και για την κινητική των αντιδράσεων. Η βασική διαφορά των παραλλαγών της τεχνικής εντοπίζεται στη ανάλυση των προϊόντων PCR και στην εξαγωγή αποτελεσμάτων.

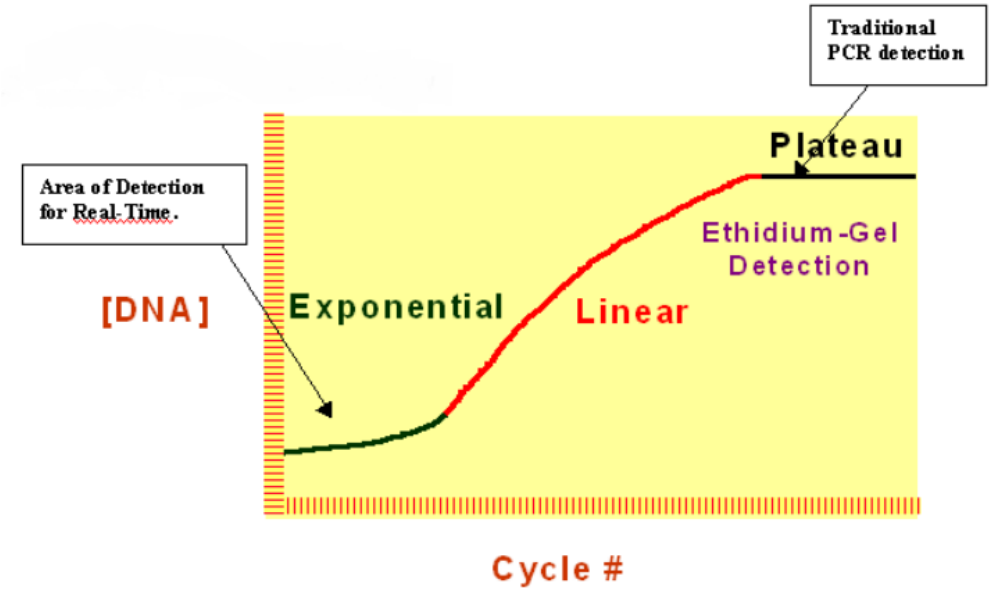
Κλασσική PCR Vs Real time qPCR

Στην **κλασσική PCR τελικού σημείου** πραγματοποιείται "endpoint analysis". Αυτό πρακτικά σημαίνει πως για να γίνει συλλογή δεδομένων η αντίδραση πρέπει να φθάσει στην φάση κορεσμού (plateau), δηλαδή θα πρέπει να παρέλθουν 30-35 κύκλοι. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης με σκοπό τον προσδιορισμό του μεγέθους και της σχετικής ποσότητάς τους. Η κλασσική, λοιπόν, PCR είναι μια **ποιοτική μοριακή τεχνική** που χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η ύπαρξη ή η απουσία συγκεκριμένου προϊόντος, το μέγεθος, η σχετική ποσότητα και η καθαρότητά του. Το γεγονός ότι η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται στη φάση κορεσμού, μειώνει την αποδοτικότητα της αντίδρασης, καθώς στη φάση αυτή κρίσιμα αντιδρώντα όπως τα δεοξυριβονουκλεοτίδια έχουν εξαντληθεί και πληθώρα αναστολέων έχουν συσσωρευθεί. Παράλληλα, τα προϊόντα διακρίνονται βάσει μεγέθους στη γέλη αγαρόζης, καθιστώντας την κλασσική PCR μέθοδο χρονοβόρα και μειωμένης ακρίβειας. ("PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time)" n.d.) ("Abi-Rtpcr-Pcr.Pdf" n.d.)

Μετά την ευρεία εφαρμογή της κλασσικής PCR αναπτύχθηκε στους επιστήμονες η ανάγκη ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων τους. Το κενό αυτό ήρθε να καλύψει η **ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR**), η οποία ανακαλύφθηκε το 1993 από τον Russel Higuchi και τους συνεργάτες του. Ο Higuchi και η ομάδα του πρόσθεσαν βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα της αντίδρασης και εφάρμοσαν στον θερμικό κυκλοποιητή μια κάμερα κλειστού κυκλώματος. Από το 1993 έως σήμερα, η μέθοδος έχει εξελιχθεί σημαντικά και αποτελεί πλέον μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων ικανών να ανιχνεύουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Κατ' αυτόν τον τρόπο το ποσό του νεοσυντιθέμενου DNA μετρείται με ακρίβεια βάσει του σήματος φθορισμού.("Abi-Rtpcr-Pcr.Pdf" n.d.)

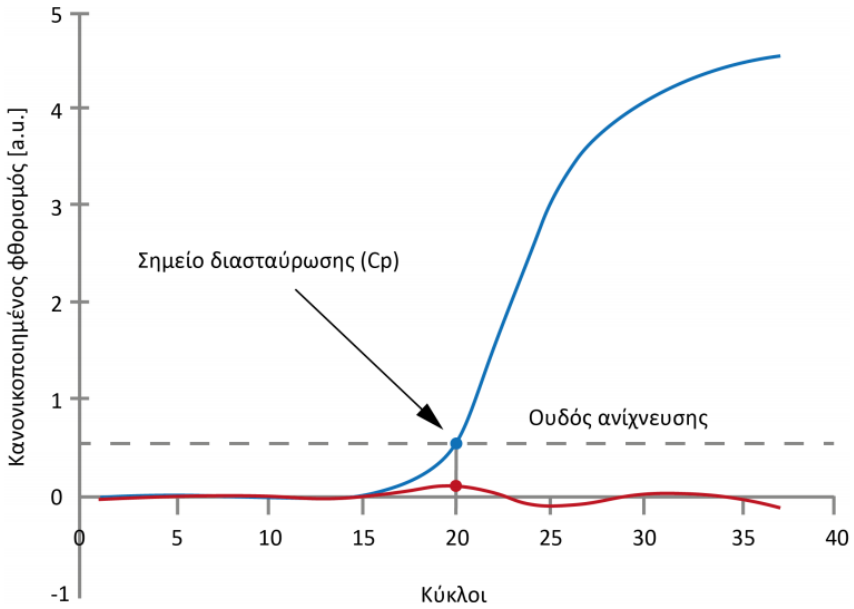
Το βασικό χαρακτηριστικό της ποσοτικής PCR είναι ότι στην τεχνική αυτή τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στην εκθετική φάση αύξησης. *Αυτή είναι και η βασική διαφορά της ποσοτικής από την κλασσική PCR*. Εν ολίγοις, στην Real Time qPCR η DNA ακολουθία ενισχύεται και ταυτόχρονα -καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης- τα παραγόμενα προϊόντα ανιχνεύονται, χάρη στις φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται σε αυτά.("Abi-Rtpcr-Pcr.Pdf" n.d.) Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της αντίδρασης την στιγμή που πραγματοποιείται. Η αύξηση

του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και εξαρτάται από την συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.



Διάγραμμα 12*.Συλλογή αποτελεσμάτων στην φάση κορεσμού για την κλασσική PCR και στην εκθετική φάση για την Real Time qPCR.*

Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή **Cp (Crossing Point**), που αντιστοιχεί στον κύκλο εκείνο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline) και φθάνει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα.



Διάγραμμα 13*.Ανίχνευση σήματος φθορισμού στο σημείο Cp.*

Στην παραπάνω γραφική παράσταση παρουσιάζεται η συσχέτιση του φθορισμού ως προς τον αριθμό των κύκλων. Ως **baseline** ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν, αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το **κατώφλι (threshold)** στο οποίο ο φθορισμός αρχίζει να ξεχωρίζει από το baseline. Ο κύκλος στον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης αποδίδεται με την τιμή **Ct (Cycle Threshold)** και το σημείο αυτό ονομάζεται και **σημείο διασταύρωσης Cp (Crossing Point)**. Η τιμή Cp είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αυτό σημαίνει ότι δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Cp από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Υπόστρωμα και qPCR

Ως υπόστρωμα της PCR είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί είτε RNA είτε DNA. Ανάλογα με το υπόστρωμα που κάθε φορά χρησιμοποιείται, διαφοροποιούνται και τα βήματα της διαδικασίας κατά την εκτέλεση του πειράματος.

- Στην περίπτωση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται RNA ακολουθείται η **One Step Real Time PCR.** Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιείται σε ένα βήμα, καθώς μετά την απομόνωση του ολικού RNA, τμήμα αυτού τοποθετείται σε ένα tube μαζί με τα υπόλοιπα απαραίτητα συστατικά, συμπεριλαμβανομένης της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η διαδικασία είναι απλή και εύκολη και περιορίζει σημαντικά την πιθανότητα επιμολύνσεων και σφαλμάτων.

- Στην περίπτωση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται DNA ακολουθείται η **Two Step Real Time PCR**. Σε αυτή την περίπτωση τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας είναι δύο, καθώς προηγείται η σύνθεση του cDNA από το ολικό RNA που έχει απομονωθεί και ακολουθεί η ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας του cDNA με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Η διαδικασία είναι σαφώς πιο χρονοβόρα, αλλά και σύνθετη, καθώς τα περισσότερα βήματα της διαδικασίας, συνοδεύονται με αυξημένη πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος. Ωστόσο, ως διαδικασία είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την one step real time PCR.

Στην παρούσα μελέτη, μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα κοκκωδών κυττάρων ακολούθησε, όπως προαναφέρθηκε, η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA. Έπειτα, ενισχύθηκαν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA με την χρήση ειδικών εκκινητών. Επομένως, το υπόστρωμα της qPCR ήταν DNA και η τεχνική που πραγματοποιήθηκε ήταν Two Step Real Time PCR.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να προσδένονται και να ενισχύουν αποκλειστικά τις μελετώμενες αλληλουχίες-στόχους, δηλαδή τα γονίδια Bcl-2 και Bax. Εκτός από την συμπληρωματικότητα ως προς την αλληλουχία-στόχο, κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών δόθηκε έμφαση στα παρακάτω:

- Μέγεθος εκκινητών: πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18 και 22 νουκλεοτιδίων.
- Ποσοστό βάσεων GC: πρέπει να κυμαίνεται σε εύρος 40-60%
- Παρουσία GC Clamp στο 3’ άκρο κάθε εκκινητή για ισχυρότερη σύνδεση στην αλληλουχία.
- Αποφυγή επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων/δινουκλεοτιδίων.
- Τιμές θερμοκρασίας τήξης (Tm εκκινητή): πρέπει να κυμαίνεται σε εύρος 45-60°C. Η διαφορά στις Tm των δυο εκκινητών δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 5 ^{o}C.
- Αποφυγή ύπαρξης συμπληρωματικότητας μεταξύ των δυο εκκινητών.

Μετά τον σχεδιασμό των εκκινητών ακολούθησε BLAST για την εξακρίβωση της ειδικότητάς τους ως προς τις υπό μελέτη αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που εν τέλει χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Bcl-2:
Reverse Primer: 5΄- TGG ATC CAAGGC TCT AGG TG – 3΄
Forward Primer: 5΄- TTC GGG ATG GAG TAA ACT GG – 3΄

Bax:
Reverse Primer: 5΄-GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG– 3΄
Forward Primer: 5΄-TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC– 3΄

Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων - Γονίδιο αναφοράς

Οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της RT- PCR είναι δύο, η απόλυτη και η σχετική ποσοτικοποίηση. Για την ποσοτικοποίηση γονιδίων που εκφράζονται ενδογενώς στον άνθρωπο ή στο εκάστοτε πειραματικό σύστημα είναι αναγκαία η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς (reference gene) πρέπει να έχει σταθερή έκφραση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το G6PD.

Η **απόλυτη ποσοτικοποίηση** στην ποσοτική PCR πραγματοποιείται βάσει μια πρότυπης καμπύλης (standard curve), η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards). Συγκεκριμένα, η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος RNA γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό άγνωστων συγκεντρώσεων δειγμάτων RNA.

Εκτός από την απόλυτη, όμως, μπορεί να πραγματοποιηθεί και **σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification)** της γονιδιακής έκφρασης. Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί την χρήση καμπύλης αναφοράς, γεγονός που την καθιστά ευκολότερη σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση. Στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης του φθορισμού του

υπό μελέτη γονιδίου μετά την ενίσχυσή του με Real Time PCR, με την ένταση φθορισμού ενός γονιδίου αναφοράς του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση. Εν ολίγοις, η σύγκριση αφορά στα Cp του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς. Όσον αφορά στον υπολογισμό της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς έχουν αναπτυχθεί πολλαπλά και ευρέως χρησιμοποιούμενα μαθηματικά μοντέλα. Το απλούστερο και ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είναι το ακόλουθο:

$$R = 2^{-[\Delta Cp\ \text{δείγματος} - \Delta Cp\ \text{γονιδίου αναφοράς}]}$$

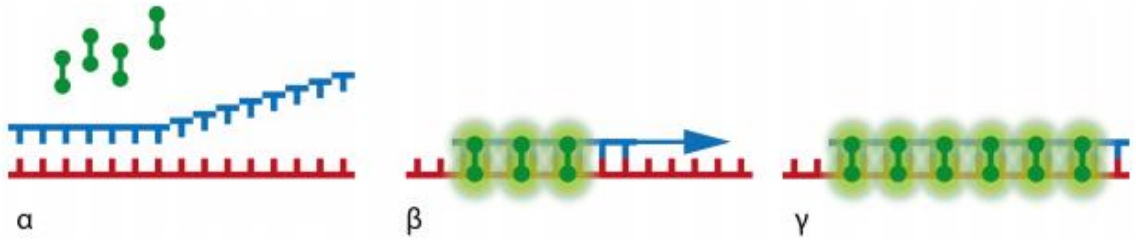
$$R = 2^{-[\Delta\Delta Cp]}$$

Φθορίζουσες Χρωστικές

Όπως προαναφέρθηκε η Real Time PCR πραγματοποιείται με ειδικούς θερμοκυκλοποιητές που ανιχνεύουν τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Οι φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ποσοτική PCR διακρίνονται σε **ειδικές** και **μη ειδικές**.

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μη ειδική φθορίζουσα χρωστική είναι το **SYBR Green I**. Η συγκεκριμένη χρωστική ενσωματώνεται στην μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA, διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497-520nm και φθορίζει. Σε περίπτωση που βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό. Κατά την διενέργεια ποσοτικής PCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Έτσι, η αύξηση της συγκέντρωσης των δίκλωνων προϊόντων της qPCR ακολουθείται από αύξηση του ανιχνεύσιμου φθορισμού.

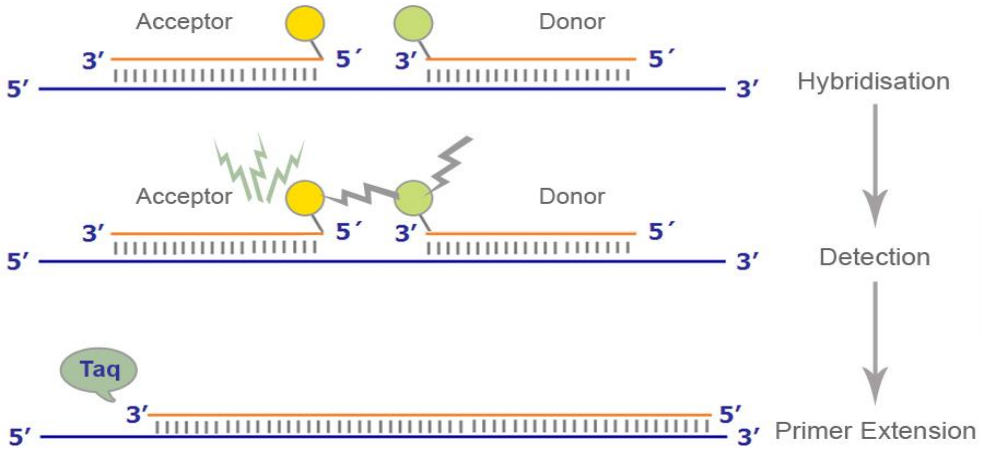
Βασικό μειονέκτημα της χρωστικής SYBR Green I αποτελεί η μη επιλεκτική της πρόσδεση, που καθιστά την αντίδραση λιγότερο αξιόπιστη. Συγκεκριμένα, η χρωστική είναι δυνατόν να προσδεθεί σε οποιοδήποτε δίκλωνο μη ειδικό προϊόν της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των διμερών των εκκινητών. Ενώ η ιδιότητά της αυτή μπορεί να οδηγήσει ενίοτε σε λάθος συμπεράσματα σχετικά με το επίπεδο φθορισμού, την ίδια χρονική στιγμή επιτρέπει την χρήση της χρωστικής για οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών. Επομένως, η SYBR Green I αποτελεί μια χρωστική εύχρηστη και οικονομική, της οποίας το αποτέλεσμα φθορισμού θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με την καμπύλη αποδιάταξης (melting curve) των προϊόντων της PCR ή με ποιοτική ανάλυση σε gel αγαρόζης.



Εικόνα 58. *Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές. Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, με γνωστότερη την SYBR Green I, ενσωματώνονται στο δίκλωνο μόριο DNA καθώς αυτό συντίθεται και φθορίζουν μόνο όταν είναι συνδεδεμένες.*

Οι ειδικές φθορίζουσες χρωστικές δεν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα, αλλά είναι προσδεδεμένες πάνω σε μικρά μόρια DNA μήκους 25-30 βάσεων. Τα μόρια DNA αυτά είναι μόρια ανιχνευτές και είναι σχεδιασμένα με τρόπο τέτοιο, ώστε να υβριδοποιούνται ανάμεσα στους δύο εκκινητές του τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες ειδικές φθορίζουσες χρωστικές είναι οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης (Hybridization Probes) και οι ιχνηθέτες τύπου Taqman (Taqman Probes).

Οι **hybridization probes** είναι δυο ιχνηθετημένα μόρια- ανιχνευτές, ένας εκ των οποίων έχει ιχνηθετηθεί με χρωστική υψηλής ενέργειας φθορισμού και ο δεύτερος με χρωστική χαμηλής ενέργειας. Μετά την αποδιάταξη, υβριδοποιούνται στο τμήμα μεταξύ των εκκινητών και συγκεκριμένα σε παρακείμενες περιοχές. Η βασική αρχή δράση τους βασίζεται στην μεταφορά ενέργειας που συμβαίνει από την χρωστική υψηλής ενέργειας



Εικόνα 59. *Εκπομπή φθορισμού με ειδική χρωστική. Δράση hybridization probes και φαινόμενο FRET.*

στην χρωστική χαμηλής ενέργειας, όταν αυτές υβριδοποιηθούν σε γειτονικά σημεία στην αλληλουχία στόχο. Το φαινόμενο καλείται Florescent Resonance Energy Transfer ή εν συντομία FRET.

Οι **Taqman probes** είναι επίσης ιχνηθετημένα μόρια- ανιχνευτές που υβριδοποιούνται σε αλληλουχία ενδιάμεση των αλληλουχιών πρόσδεσης των εκκινητών. Στο 5΄ άκρο του ιχνηθέτη υπάρχει μια φθορίζουσα ουσία και στο 3΄ άκρο του ένα μόριο παρεμπόδισης και εξουδετέρωσης του φθορισμού. Όταν ο ανιχνευτής βρίσκεται ελεύθερος, επομένως, δεν παράγεται φθορισμός. Κατά την υβριδοποίηση των εκκινητών, υβριδοποιείται και ο ανιχνευτής, ο οποίος συνεχίζει να μην παράγει ανιχνεύσιμο φθορισμό. Η κατάσταση αυτή αλλάζει κατά την φάση επιμήκυνσης Στην φάση αυτή, η Taq πολυμεράση υδρολύει μέσω της 5΄-3΄εξωνουκλεολυτικής της δράσης τον ιχνηθέτη Taqman και διαχωρίζει το φθορίζον μόριο από τον καταστολέα του. Η φθορίζουσα ουσία απελευθερώνεται και ούσα ελεύθερη φθορίζει.

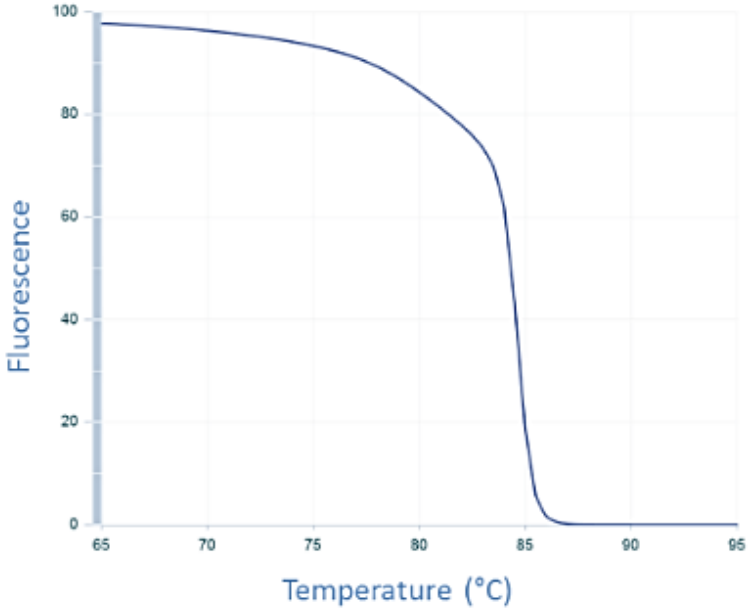
***Εικόνα 60**. Εκπομπή φθορισμού με ειδική χρωστική. Δράση Taqman probes.*

Το πλεονέκτημα των Taqman probes είναι ότι καθιστούν δυνατή τη μέτρηση και ποσοτικοποίηση μόνο του επιθυμητού προϊόντος της PCR. Τα διμερή εκκινητών ή άλλα μη ειδικά προϊόντα, που τυχόν παράγονται κατά την αντίδραση, δεν συμμετέχουν στην ποσοτικοποίηση, καθώς ο ιχνηθέτης δεν υβριδίζεται σε αυτά και ως εκ τούτου δεν παράγεται φθορισμός. Βέβαια, οι ιχνηθέτες αυτοί έχουν σχετικά υψηλό κόστος και απαιτούν ξεχωριστό σχεδιασμό για διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.

Καμπύλη αποδιάταξης - Melting curve

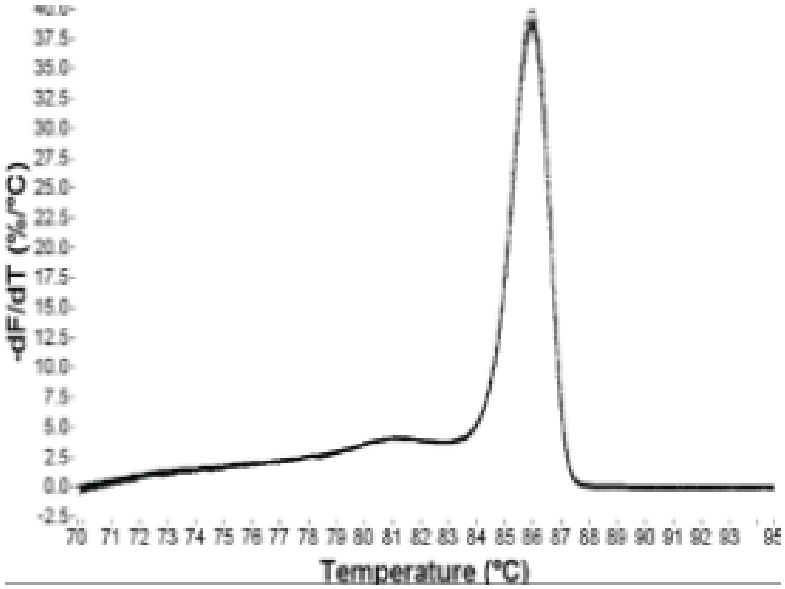
Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η χρήση μη ειδικών χρωστικών κατά τη διάρκεια μιας ποσοτικής αντίδρασης PCR εγκυμονεί τον κίνδυνο ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων. Ένας τρόπος αξιολόγησης του αποτελέσματος φθορισμού είναι η μελέτη της **καμπύλης τήξης- αποδιάταξης (melting curve).** Μια καμπύλη αποδιάταξης παρουσιάζει την αλλαγή στην ένταση φθορισμού που συμβαίνει όταν ένα δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται λόγω αύξησης της θερμοκρασίας. Η μορφή της εξαρτάται από το μέγεθος και την αλληλουχία του προϊόντος, αλλά και από το περιεχόμενό του σε βάσεις GC. Δίκλωνα μόρια με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βάσεις GC, όπως είναι λογικό, αποδιατάσσονται σε υψηλότερη θερμοκρασία.

Η πλειοψηφία των μηχανημάτων Real Time PCR παρέχει τη δυνατότητα κατασκευής καμπύλης αποδιάταξης. Η καμπύλη αυτή σχηματίζεται στο τέλος της αντίδρασης, αφότου οι κύκλοι ενίσχυσης έχουν ολοκληρωθεί και αφορά το προϊόν (ή τα προϊόντα εάν η αντίδραση δεν είναι ειδική) που έχουν ενισχυθεί. Στο τέλος, λοιπόν, της αντίδρασης ο θερμικός κυκλοποιητής μετράει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, ξεκινώντας από μια θερμοκρασία υψηλότερη της Tm των εκκινητών. Όπως είναι σαφές, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, τα δίκλωνα μόρια DNA αποδιατάσσονται. Η μη ειδική χρωστική που είναι προσδεδεμένη στα δίκλωνα μόρια αποδεσμεύεται και όντας ελεύθερη στο διάλυμα καθίσταται μη ανιχνεύσιμη από τον θερμικό κυκλοποιητή, με αποτέλεσμα το ποσό του ανιχνεύσιμου φθορισμού να μειώνεται, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία.



***Διάγραμμα 14**. Καμπύλη αποδιάταξης, όπου παρουσιάζονται οι μεταβολές στα επίπεδα του φθορισμού συναρτήσει της αυξανόμενης θερμοκρασίας.*

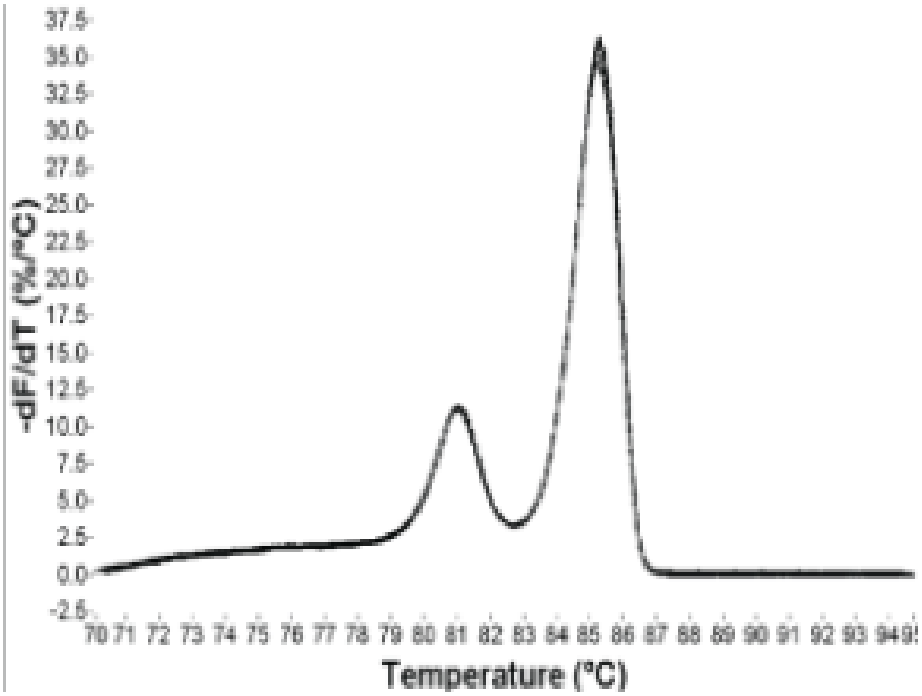
Εκτός της γραφικής παράστασης του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας, η melting curve αναπαρίσταται και ως ο λόγος μεταβολής φθορισμού προς μεταβολή θερμοκρασίας (-ΔF/ΔT) συναρτήσει της θερμοκρασίας. Σε κάθε melting curve παρατηρείται **για κάθε προϊόν μια κορυφή**, η οποία αντιστοιχεί στην T_m του προϊόντος αυτού. Προφανώς, σε μια αντίδραση Real Time PCR που έχει σχεδιαστεί για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, αναμένεται μια μόνο κορυφή στην καμπύλη αποδιάταξης. Έτσι, η ύπαρξη περισσότερων κορυφών μεταφράζεται σε ενίσχυση περισσότερων του ενός προϊόντων.



***Διάγραμμα 15**. Melting curve. Κορυφή αποδιάταξης του μοναδικού προϊόντος της αντίδρασης.*

Για το λόγο αυτό, η melting curve αποτελεί ένα ιδιαιτέρως χρήσιμο **εργαλείο αξιολόγησης της ειδικότητας των προϊόντων που ενισχύθηκαν και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν** κατά την αντίδραση. Σε περίπτωση που η ειδικότητα των εκκινητών ως προς την αλληλουχία-στόχο δεν είναι υψηλή, οι εκκινητές σχηματίζουν **διμερή (primer-dimers)**. Τα διμερή των εκκινητών είναι δίκλωνα μόρια DNA, τα οποία αποτελούν παραπροϊόντα της αντίδρασης, αποδιατάσσονται εξίσου κατά την αύξηση της θερμοκρασίας και δίνουν μια δεύτερη κορυφή στην melting curve, στην δική τους T_m.

Ωστόσο, ακριβώς επειδή η T_m των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το μήκος , την περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC και από την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών (mismatches), η κορυφή (ή κορυφές) που παρουσιάζουν τα διμερή των εκκινητών στην melting curve διακρίνεται (ή διακρίνονται) εύκολα από εκείνη του επιθυμητού προϊόντος. Το μέγεθος των εκκινητών και επακόλουθα η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC είναι σίγουρα μικρότερα της αλληλουχίας του προϊόντος, με αποτέλεσμα τα primer dimers να εμφανίζουν κορυφή σε μικρότερη θερμοκρασία από το προϊόν της αντίδρασης.



Διάγραμμα 16. *Melting curve. Διακρίνονται η κορυφή δεξιά που αντιστοιχεί στο προϊόν της αντίδρασης και η μικρότερη κορυφή αριστερά που αντιστοιχεί στα διμερή των primers. Οι εκκινητές δεν παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα και διμερίζονται σχηματίζοντας μη ειδικά προϊόντα.*

2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως. Βασίζεται στη διοχέτευση ηλεκτρικής τάσης μέσω ηλεκτροδίων σε ένα πορώδες μέσο (πήκτωμα αγαρόζης/πολυακρυλαμίδης) που φέρει σε κάποιο σημείο του το προς ανάλυση δείγμα. Τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και ως εκ τούτου κινείται προς τον θετικό πόλο. Τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο. Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των προϊόντων βάσει μεγέθους.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει δύο στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκεκριμένης συγκέντρωσης, βάσει του μεγέθους των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης.

Στη συγκεκριμένη εργασία η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ως **τεχνική ποιοτικού ελέγχου**. Δηλαδή, τα προϊόντα της Real Time qPCR ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την επιβεβαίωση της ειδικότητας του αποτελέσματος της αντίδρασης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης πηκτώματος βασίστηκε στο μικρό μήκος των αναμενόμενων προϊόντων της PCR (**Bcl2 157bp, Bax 175bp**).

Η διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος περιλαμβάνει τη ζύγιση 3gr αγαρόζης και την διάλυσή τους σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως και να γίνει εντελώς διαυγές. Στη συνέχεια, προστίθενται 10μL βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε το αποτέλεσμα να είναι φθορίζον υπό την επίδραση της UV και η κωνική φιάλη με τη ρευστή αγαρόζη ψύχεται με τη χρήση τρεχάμενου νερού. Η ρευστή αγαρόζη αφήνεται σε ειδικό εκμαγείο μέχρι να πολυμεριστεί, παρουσία ειδικών «χτενών» που θα δημιουργήσουν τα βοθρία-θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Τέλος, το στερεό πλέον πήκτωμα της αγαρόζης εμβαπτίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Η συνολική ποσότητα των προϊόντων της PCR (20μL) αναμειγνύεται με 8μL διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) και φορτώνονται καθένα σε μια ξεχωριστή θέση στο πήκτωμα. Ξεχωριστά προστίθεται και ο μάρτυρας (Ladder 100bp). Τέλος εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία είναι 91 Volt, 90Ma για 40 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 41 γυναίκες, οι οποίες προσήλθαν στο Γ.Π.Ν. Αλεξάνδρα με σκοπό να υποβληθούν σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η συμμετοχή τους στην ερευνητική εργασία δεν επηρέασε με κανένα τρόπο το αποτέλεσμα της προσπάθειας επίτευξης εγκυμοσύνης. Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη ήταν τα κοκκώδη κύτταρα των συμπλόκων κοκκωδών-ωοκυττάρων των συγκεκριμένων ασθενών. Τα κύτταρα αυτά διαχωρίζονται από το ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια του καθαρισμού των ωοκυττάρων (oocyte denuding) και δεν χρησιμεύουν σε κανένα άλλο στάδιο της διαδικασίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Στα κύτταρα αυτά μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων Bcl-2 και Bax και πιο συγκεκριμένα ο λόγος των επιπέδων έκφρασης του Bcl-2 προς το Bax. Στη συνέχεια ο λόγος αυτός συσχετίστηκε με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Η λεπτομερής μελέτη των ιατρικών ιστορικών και των υπόλοιπων στοιχείων των γυναικών, αλλά και η χρήση των κοκκωδών κυττάρων των γυναικών που συμμετείχαν στην ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε κατόπιν επίσημης έγγραφης συναίνεσης υπογεγραμμένης από το ζευγάρι.

Με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν διαπιστώθηκε ότι οι αιτίες υπογονιμότητας που οδηγούν εν τέλει ένα ζευγάρι στο εργαστήριο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι πολλαπλές και συχνά συνυπάρχουν. Αυξημένη ηλικία της γυναίκας, ανδρικός παράγοντας και γυναικείος παράγοντας υπογονιμότητας (σαλπιγγικός παράγοντας, ενδομητρίωση, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών), καθώς και ανεξήγητη υπογονιμότητα αποτελούν κάποιες από τις συχνότερα παρατηρούμενες αιτίες. Η συνύπαρξη περισσότερων αιτίων, όπως λόγου χάρη ο συνδυασμός ανδρικού παράγοντα (ολιγο-ασθενοσπερικά, κρυπτοζωοσπεριμικά, αζωοσπερμικά δείγματα) και αυξημένης ηλικίας της γυναίκας παρατηρήθηκαν επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις. Αντίστοιχα, ανεξήγητη υπογονιμότητα παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό ζευγαριών, καθ' όλα γόνιμων φαινομενικά, καταδεικνύοντας ότι η αιτία της υπογονιμότητας δεν είναι πάντα σαφής και εντοπισμένη. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα αίτια υπογονιμότητας που καταγράφηκαν για το δείγμα ασθενών που συμμετείχε στην έρευνα.

Ασθενής	Αιτία υπογονιμότητας
1	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
2	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
3	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
4	Ηλικία Γυναίκας
5	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
6	Ανεξήγητη υπογονιμότητα

7	Ηλικία Γυναίκας
8	Ηλικία Γυναίκας
9	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
10	Ηλικία Γυναίκας
11	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
12	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
13	Ηλικία Γυναίκας
14	Ανεξήγητη υπογονιμότητα
15	Ηλικία Γυναίκας
16	Ανδρικός Παράγοντας
17	Ανδρικός Παράγοντας
18	Ανδρικός Παράγοντας
19	Ανδρικός Παράγοντας
20	Ανδρικός Παράγοντας
21	Ανδρικός Παράγοντας
22	Ηλικία Γυναίκας
23	Ανδρικός Παράγοντας
24	Σαλπιγγικός Παράγοντας, Ενδομητρίωση, Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών
25	Ανδρικός Παράγοντας
26	Ανδρικός Παράγοντας
27	Ηλικία Γυναίκας
28	Ηλικία Γυναίκας
29	Ανδρικός Παράγοντας
30	Ανεξήγητη Υπογονιμότητα
31	Ανδρικός Παράγοντας
32	Ανδρικός Παράγοντας και Ηλικία Γυναίκας
33	Ανδρικός Παράγοντας και Ηλικία Γυναίκας
34	Ηλικία Γυναίκας
35	Σαλπιγγικός Παράγοντας
36	Ανδρικός Παράγοντας και Ηλικία Γυναίκας
37	Ανδρικός Παράγοντας
38	Ηλικία Γυναίκας
39	Ενδομητρίωση
40	Ανδρικός Παράγοντας
41	Ανεξήγητη Υπογονιμότητα

Συσχέτιση λόγου Bcl-2/Bax με ηλικία γυναίκας

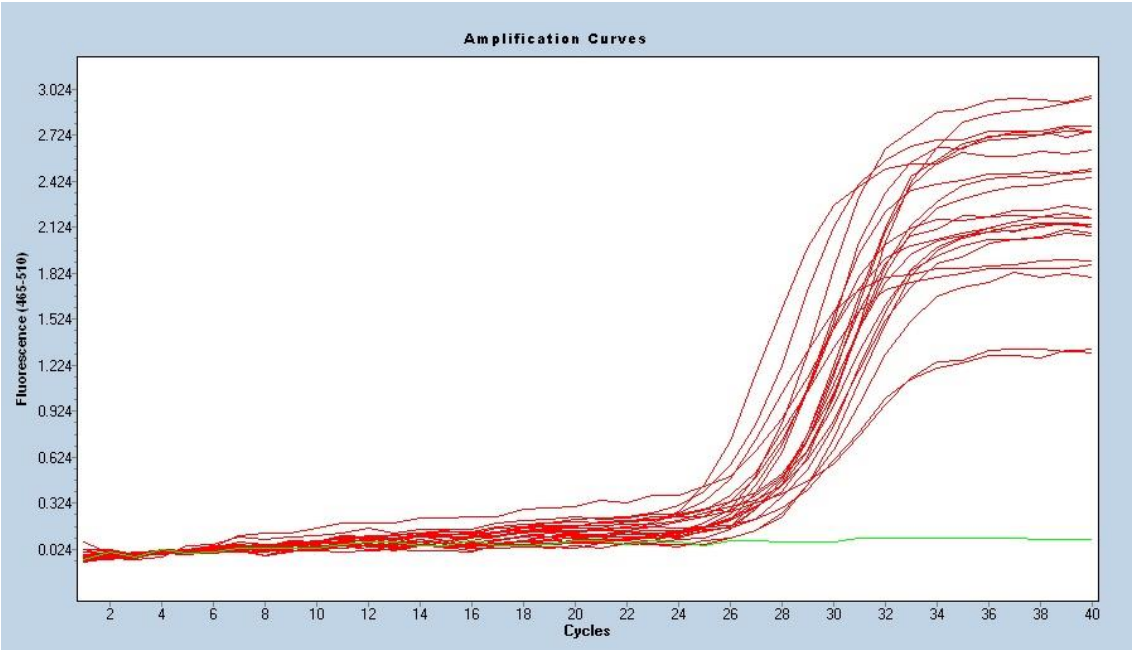
Στο δείγμα των γυναικών που συμμετείχαν στην παρούσα εργασία η **συχνότερη αιτία υπογονιμότητας είναι η αυξημένη ηλικία της γυναίκας.** Για το λόγο αυτό, η πρώτη συσχέτιση του λόγου έκφρασης Bcl-2/Bax πραγματοποιήθηκε σε σχέση με τον παράγοντα αυτό. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές Cp που συλλέξαμε για κάθε γυναίκα ξεχωριστά μετά την Real Time PCR, τόσο για το Bcl-2 όσο και για το Bax, σε συνδυασμό με την ηλικία της.

Ασθενής	Cp Bcl-2	Cp Bax	Ηλικία Γυναίκας
1	28,34	27,61	32
2	25,73	26,84	35
3	25,27	25,98	35
4	28,4	27,48	39
5	28,22	25,32	33
6	28,27	26,53	36
7	28,58	27,53	48
8	27,98	25,95	41
9	27,05	26,76	29
10	25,65	27,51	37
11	25,41	27,61	33
12	25,58	26,85	22
13	25,15	26,65	41
14	25,2	27,33	34
15	27,32	27,23	40
16	28,49	27,52	26
17	28,23	22,2	29
18	28,71	27,64	23
19	28,1	27,61	30
20	26,33	26,82	28
21	26,67	27,13	27
22	25,54	27,98	45
23	26,49	27,63	27
24	12,74	17,14	35
25	20,61	25,68	30
26	20,73	23,53	35
27	23,91	27,62	39
28	26,84	27,58	41
29	26,85	27,74	38
30	26,04	27,03	29
31	26,66	27,26	31
32	26,84	27,78	42
33	27,04	27,73	45
34	25,76	27,9	41
35	25,5	27,65	27
36	26,15	27,74	35
37	26,5	27,83	33

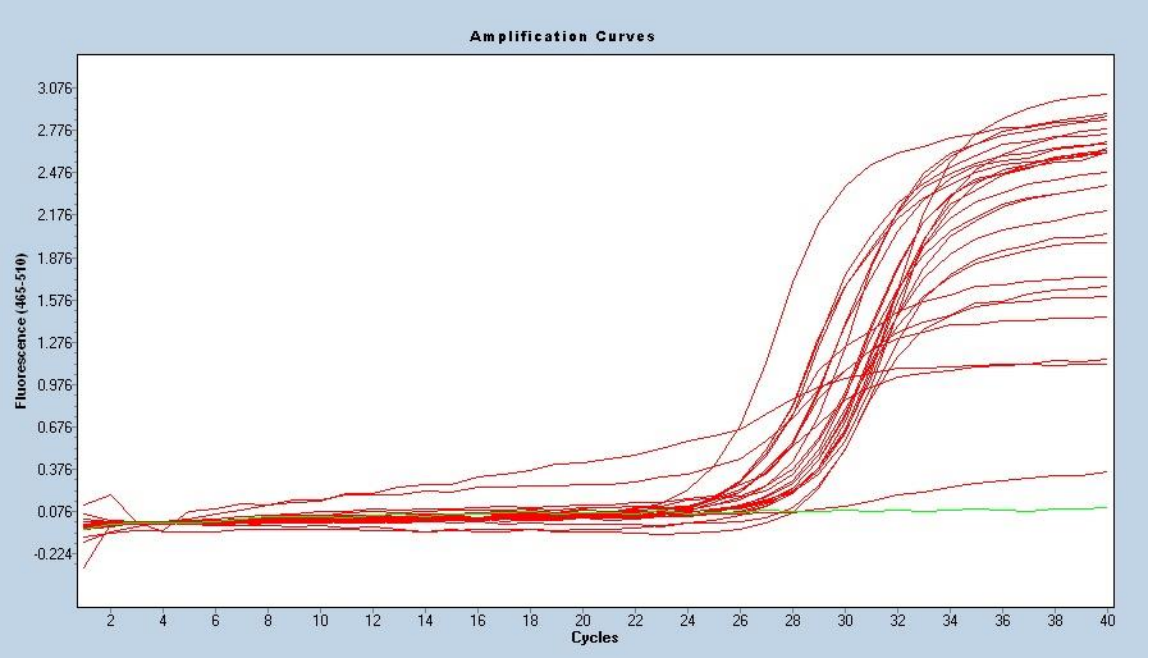
38	26,19	27,62	39
39	26,95	27,93	34
40	27,17	27,9	37
41	26,98	27,93	35

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων και συγκεκριμένα στο κομμάτι που αφορά στην Real Time PCR η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι η τιμή **Cp (Crossing Point**), που αντιστοιχεί στον κύκλο εκείνο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline) και φθάνει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Η τιμή Cp είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. **Αυτό σημαίνει ότι δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Cp από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα.**

Στα επόμενα δύο διαγράμματα παρουσιάζονται καμπύλες ενίσχυσης που πραγματοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, αφορούν ενίσχυση των γονιδίων Bcl-2 και Bax και είναι ενδεικτικές των αποτελεσμάτων που θα αναλυθούν στην συνέχεια. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης του φθορισμού και στον οριζόντιο οι κύκλοι της αντίδρασης.



***Διάγραμμα 17**. Καμπύλες ενίσχυσης Bax.*



Διάγραμμα 18*. Καμπύλες ενίσχυσης Bcl-2.*

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών Cp ανά γονίδιο, αλλά και ανά ηλικιακή ομάδα μελέτης. Οι ηλικιακές ομάδες ορίστηκαν με βάση τα ESHRE annual reports.

Πληθυσμός ασθενών	Μέσο Cp Bcl2	Μέσο Cp Bax	Ηλικιακές Ομάδες
19	26.58	26.91	≤34
13	24.92	26.27	35-39
9	26.78	27.37	≥40

Η έκφραση του Bcl-2 στις γυναίκες κάτω των 34 ετών και άνω των 40 δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά. Η διαφοροποίηση εντοπίζεται στις γυναίκες ηλικίας 35-39 οι οποίες φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου, καθώς το μέσο Cp είναι μικρότερο. Όσον αφορά το γονίδιο Bax, η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στις γυναίκες ηλικίας 35-39 και η μικρότερη στις γυναίκες άνω των 40 ετών.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε **σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης**. Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί την χρήση καμπύλης αναφοράς και στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης του φθορισμού των υπό μελέτη γονιδίων μετά την ενίσχυσή του με Real Time PCR, με την ένταση φθορισμού ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση. Εν ολίγοις, η σύγκριση αφορά στα Cp του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς, το οποίο παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλα

τα δείγματα που εξετάζονται. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς G6PD και η έκφραση των μελετώμενων γονιδίων ως προς το G6PD έγινε με τη βοήθεια ευρέως χρησιμοποιούμενου μαθηματικού μοντέλου που έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό. **Η μέση έκφραση του G6PD ήταν στους 28,5 κύκλους.** Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από την σχετική ποσοτικοποίηση περιγράφονται παρακάτω:

Πληθυσμός ασθενών	R_{Bcl-2}	R_{Bax}	Ηλικιακές Ομάδες (σε έτη)
19	8,69	6,91	≤34
13	27,47	10,78	35-39
9	7,57	5,03	≥40

Αντιλαμβανόμαστε, λοιπόν, ότι στην κατηγορία των γυναικών με ηλικία μικρότερη ή ίση των 34 χρόνων η έκφραση του Bcl-2 είναι 8,69 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του γονιδίου αναφοράς και αντίστοιχα η έκφραση του Bax είναι 6,91 φορές μεγαλύτερη της έκφρασης του G6PD. Με τον ίδιο τρόπο ερμηνεύονται οι τιμές και στην κατηγορία 35-39 ετών και στις γυναίκες άνω των 40. Η έκφραση των γονιδίων Bcl-2 και Bax εμφανίζεται σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερη του γονιδίου αναφοράς.

Ο λόγος έκφρασης Bcl-2/Bax, που αποτελεί και την παράμετρο που εξετάζεται στην παρούσα εργασία διαμορφώνεται στις 3 ηλικιακές ομάδες ως εξής:

Πληθυσμός ασθενών	Λόγος Bcl2/Bax	Συμπέρασμα	Ηλικιακές Ομάδες (σε έτη)
19	1,26	προστασία από απόπτωση	≤34
13	2,55	προστασία από απόπτωση	35-39
9	1,51	προστασία από απόπτωση	≥40

Σε όλα τα ηλικιακά γκρουπ ο λόγος Bcl-2/Bax είναι μεγαλύτερος της μονάδας. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 είναι μεγαλύτερη από αυτή του προ-αποπτωτικού Bax, με αποτέλεσμα, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων να ευνοείται η αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο. Ο μέγιστος λόγος παρατηρείται στην ομάδα γυναικών ηλικίας μεταξύ 35 και 39 ετών και ο μικρότερος στις γυναίκες κάτω των 34 ετών. ***Σε κάθε περίπτωση, λοιπόν, παρατηρείται προστασία από τον κυτταρικό θάνατο και επομένως απουσία συσχέτισης του λόγου με την ηλικία της γυναίκας.***

Συσχέτιση λόγου Bcl-2/Bax με ποσοστό γονιμοποίησης

Ασθενής	Cp Bcl-2	Cp Bax	Ποσοστό γονιμοποίησης
1	28,34	27,61	60%
2	25,73	26,84	100%
3	25,27	25,98	45,45%
4	28,4	27,48	100%
5	28,22	25,315	77,78%
6	28,27	26,53	87,5%
7	28,58	27,53	75%
8	27,98	25,95	80%
9	27,05	26,76	100%
10	25,65	27,51	100%
11	25,41	27,61	77,78%
12	25,58	26,85	70%
13	25,15	26,65	100%
14	25,2	27,33	86,67%
15	27,32	27,23	100%
16	28,49	27,52	81,25%
17	28,23	22,2	66,67%
18	28,71	27,64	73,05%
19	28,1	27,61	73,33%
20	26,33	26,82	68,18%
21	26,67	27,13	57,14%
22	25,54	27,98	75%
23	26,49	27,63	100%
24	12,74	17,14	77,78%
25	20,61	25,68	80,77%
26	20,73	23,53	66,67%
27	23,91	27,62	33,34%
28	26,84	27,58	100%
29	26,85	27,74	66,67%
30	26,04	27,03	77,78%
31	26,66	27,26	100%
32	26,84	27,78	66,67%
33	27,04	27,73	100%
34	25,76	27,9	66,67%
35	25,5	27,65	75%
36	26,15	27,74	75%
37	26,5	27,83	50%
38	26,19	26,19	100%
39	26,19	26,19	62,5%
40	27,62	27,62	0%
41	26,95	26,95	50%

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών Cp ανά γονίδιο, αλλά και ανά κατηγορία ποσοστού γονιμοποίησης. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 ομάδες με βάση την επίτευξη γονιμοποίησης σε ποσοστό μεγαλύτερο/ίσο του 75% ή μικρότερο του 75%.

Πληθυσμός ασθενών	Μέσο Cp Bcl2	Μέσο Cp Bax	Ποσοστό γονιμοποίησης
24	24,79	25,57	≥75%
17	26,39	26,76	<75%

Η έκφραση του Bcl-2 στα κοκκώδη κύτταρα των γυναικών που εντάσσονται στην ομάδα με ποσοστό γονιμοποίησης μεγαλύτερο/ίσο του 75% είναι ελαφρώς μεγαλύτερη της έκφρασης που αντιστοιχεί στην ομάδα με ποσοστό μικρότερο του 75%. Το μέσο Cp στην ομάδα με τα υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης είναι χαμηλότερο, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου Bcl-2 στην ομάδα αυτή και επακόλουθα μεγαλύτερη έκφραση του Bcl-2 στα κοκκώδη κύτταρα από όπου απομονώθηκε το RNA. Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου Bax διαφαίνεται μεγαλύτερη έκφραση στην ομάδα με ποσοστό γονιμοποίησης μεγαλύτερο/ίσο του 75%.

Έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με το γονίδιο G6PD προέκυψαν τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα:

Πληθυσμός ασθενών	R_{Bcl-2}	R_{Bax}	Ποσοστό γονιμοποίησης
24	30,06	17,51	≥75%
17	9,92	7,67	<75%

Εκ πρώτης όψεως είναι εμφανής σε κάθε περίπτωση η μεγαλύτερη έκφραση των γονιδίων ως προς το G6PD. Συγκεκριμένα, στην ομάδα με τα καλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης το Bcl-2 εκφράζεται 30 φορές περισσότερο από το γονίδιο αναφοράς και το Bax 17,52 φορές περισσότερο. Αντίστοιχα, στην ομάδα με ποσοστά γονιμοποίησης μικρότερα από 75% η έκφραση του Bcl-2 είναι σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερη από το G6PD και η έκφραση του Bax 7,67 φορές μεγαλύτερη.

Ο λόγος έκφρασης Bcl-2/Bax, που αποτελεί και την παράμετρο που εξετάζεται στην παρούσα εργασία διαμορφώνεται στις 2 επιμέρους ομάδες ως εξής:

Πληθυσμός ασθενών	Λόγος Bcl2/Bax	Συμπέρασμα	Ποσοστό γονιμοποίησης
24	1,72	προστασία από απόπτωση	≥75%
17	1,3	προστασία από απόπτωση	<75%

Στην προσπάθεια συσχέτισης του λόγου έκφρασης Bcl-2/Bax σε κοκκώδη κύτταρα, με το ποσοστό γονιμοποίησης των ωοκυττάρων δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιολογήσιμη διαφορά. Συγκεκριμένα, διαβάζοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και στις δυο υπο-ομάδες η έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 υπερτερεί, με αποτέλεσμα ο λόγος Bcl-2/Bax να έχει τιμή μεγαλύτερη της μονάδας και επαγωγικά να προωθείται η προστασία από τον αποπτωτικό θάνατο. ***Σε κάθε περίπτωση, λοιπόν, παρατηρείται προστασία από τον κυτταρικό θάνατο και επομένως απουσία συσχέτισης του λόγου με το ποσοστό γονιμοποίησης των ωοκυττάρων.***

Συσχέτιση λόγου Bcl-2/Bax με ποσοστό blastulation

Με τον όρο «blastulation» αναφερόμαστε στην διαδικασία κατά την οποία το έμβρυο περνά από το στάδιο του μοριδίου στο στάδιο της βλαστοκύστης. Το ποσοστό blastulation, δηλαδή το ποσοστό των γονιμοποιημένων ωοκυττάρων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης αποτελεί την τρίτη παράμετρο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία σε σχέση με τον λόγο των εκφράσεων Bcl2/Bax. Από τις 41 γυναίκες που συμμετείχαν στην έρευνα, στην συσχέτιση αυτή συμπεριλαμβάνονται μόνο οι 21, καθώς στις υπόλοιπες περιπτώσεις όλα ή κάποια από τα έμβρυα μεταφέρθηκαν ή κρυοσυντηρήθηκαν στο στάδιο 3^{ης} ημέρας ανάπτυξης. Έτσι, το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης δε θα ήταν αντιπροσωπευτικό.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των Cp των 2 μελετώμενων γονιδίων, ο αριθμός των ωοκυττάρων που γονιμοποιήθηκαν και περιείχαν 2 εμφανείς προπυρήνες στις 16-18 ώρες μετά την γονιμοποίηση, ο αριθμός των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης και το ποσοστό blastulation που προκύπτει από τα προαναφερθέντα στοιχεία.

Ασθενής	Cp Bcl-2	Cp Bax	Αριθμός 2pn Εμβρύων	Αριθμός Βλαστοκύστεων	Blastulation rate
1	28,34	27,61	3	2	66,67%
5	28,22	25,32	7	2	28,57%
6	28,27	26,53	7	2	28,57%
8	27,98	25,95	4	3	75%
10	25,65	27,51	7	2	28,57%
11	25,41	27,61	7	2	28,57%
12	25,58	26,85	7	5	71,43%
14	25,2	27,33	13	7	53,85%
15	27,315	27,23	4	1	25%
16	28,49	27,52	13	3	23,08%
17	28,23	22,2	6	5	83,33%
18	28,71	27,64	19	3	15,79%
19	28,1	27,61	12	4	33,33%
20	26,33	26,82	15	9	60%
21	26,67	27,13	16	11	68,75%
23	26,49	27,63	22	12	54,55%

27	23,91	27,62	1	1	100%
33	27,04	27,73	11	5	45,45%
35	25,5	27,65	12	8	66,67%
37	26,5	27,83	5	1	20%
38	26,19	26,19	11	3	27,27%

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών Cp ανά γονίδιο, αλλά και ανά κατηγορία ποσοστού blastulation. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 ομάδες με βάση το αν το ποσοστό των εμβρύων που έφθασε στο στάδιο της βλαστοκύστης ήταν μεγαλύτερο/ίσο ή μικρότερο του 50%.

Πληθυσμός ασθενών	**Μέσο Cp Bcl2**	**Μέσο Cp Bax**	**Blastulation rate**
10	26,42	26,68	≥50%
11	27,26	27,16	<50%

Οι δυο ομάδες αποτελούνται από τον ίδιο σχεδόν αριθμό ατόμων. Η έκφραση του Bcl-2 είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στην ομάδα με τα υψηλότερα ποσοστά blastulation σε σύγκριση με την ομάδα με τα χαμηλότερα ποσοστά. Συγκεκριμένα, το μέσο Cp στην πρώτη ομάδα είναι 26,42, ενώ στην δεύτερη 27,26, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού αντιγράφων του γονιδίου Bcl-2 στα κοκκώδη κύτταρα των γυναικών που εντάσσονται στην ομάδα με blastulation rate μεγαλύτερο/ίσο του 50%.

Αντίστοιχα, η έκφραση του Bax είναι μεγαλύτερη στην ομάδα με τα υψηλότερα ποσοστά blastulation βάσει των στοιχείων της μελέτης. Όταν το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης είναι μεγαλύτερο/ίσο του 50%, η έκφραση του Bax είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την περίπτωση που το ποσοστό είναι μικρότερο του 50%.

Τα αποτελέσματα εν συνεχεία ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και πάλι το housekeeping gene G6PD και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πληθυσμός ασθενών	**R_{Bcl-2}**	**R_{Bax}**	**Blastulation rate**
10	9,714	8,11	≥50%
11	5,43	5,82	<50%

Το Bcl-2 εκφράζεται, λοιπόν, σχεδόν 10 φορές περισσότερο από το γονίδιο αναφοράς όταν το ποσοστό blastulation είναι μεγαλύτερο/ίσο του 50% και 5,43 φορές περισσότερο όταν το ποσοστό είναι μικρότερο του 50%. Αντίστοιχα, το Bax εκφράζεται 8 φορές περισσότερο του g6pd στην πρώτη ομάδα και σχεδόν 6 φορές περισσότερο στη δεύτερη.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τον λόγο Bcl2/Bax σε σχέση με το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τα αποτελέσματα στις δυο επιμέρους ομάδες διαμορφώθηκαν ως εξής:

Πληθυσμός ασθενών	**Λόγος Bcl2/Bax**	**Συμπέρασμα**	**Blastulation rate**
10	1,20	προστασία από απόπτωση	≥50%
11	0,93	απόπτωση	<50%

Εκ πρώτης όψεως παρατηρούμε την ύπαρξη μιας τάσης **του λόγου των εκφράσεων των μελετώμενων γονιδίων να συσχετισθεί με το ποσοστό blastulation.** Συγκεκριμένα, στην πρώτη ομάδα που χαρακτηρίζεται από ποσοστό εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης μεγαλύτερο/ίσο του 50% παρατηρήθηκε λόγος μεγαλύτερος της μονάδας. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η έκφραση του Bcl-2 υπερτερεί της έκφρασης του Bax και ως εκ τούτου ο αποπτωτικός θάνατος παρεμποδίζεται. Η συσχέτιση που φαίνεται να υπάρχει είναι εύλογη, αν αναλογιστούμε ότι μειωμένα ποσοστά απόπτωσης θα μπορούσαν να σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των εμβρύων μέχρι την πέμπτη/ έκτη μέρα που εξελίσσονται σε βλαστοκύστη.

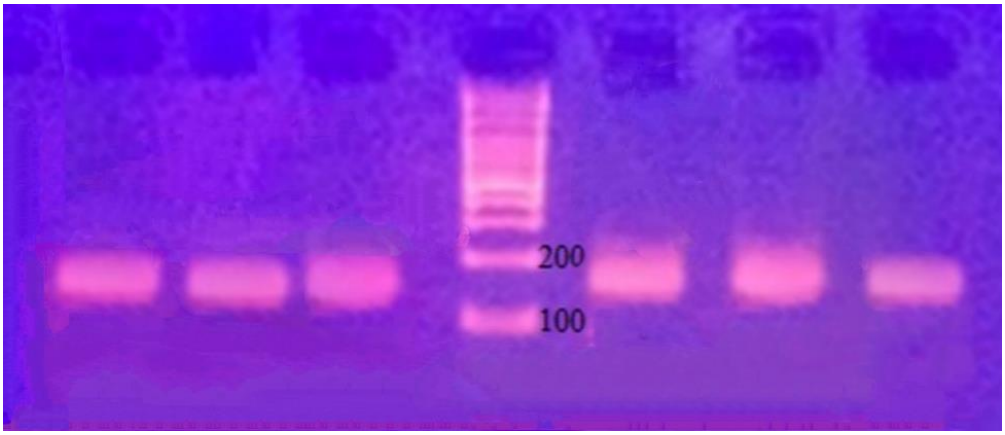
Στην δεύτερη ομάδα που χαρακτηρίζεται από χαμηλά ποσοστά εμβρύων που εξελίχθηκαν σε βλαστοκύστεις, ο λόγος Bcl-2/Bax είναι μικρότερος της μονάδας. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση του Bax υπερτερεί αυτής του Bcl-2, με αποτέλεσμα να προωθείται ο αποπτωτικός μηχανισμός μέσω ενεργοποίησης του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης. Η υπόθεση αυτή ταιριάζει με το χαμηλό ποσοστό blastulation, καθώς τα αυξημένα επίπεδα αποπτωτικού θανάτου θα μπορούσαν να παρεμποδίζουν την εξέλιξη των εμβρύων σε βλαστοκύστεις.

Επιβεβαίωση προϊόντων Real Time PCR

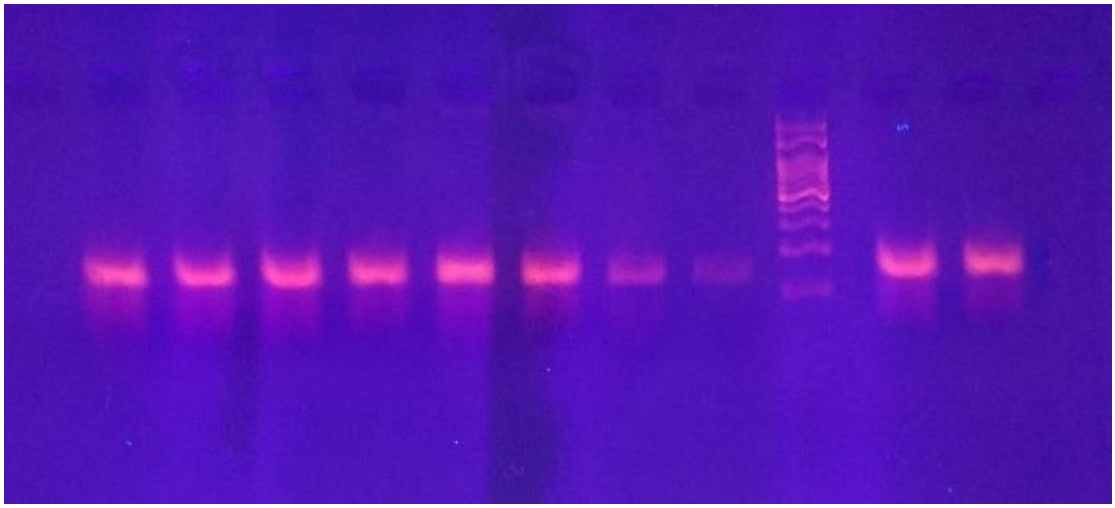
Όπως προαναφέρθηκε κατά τη διαδικασία της ποσοτικής Real Time PCR χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές, χάρη στις οποίες ανιχνεύεται και καταμετρείται η ενίσχυση του γονιδίου μέσω της μέτρησης του εκπεμπόμενου φθορισμού από τον θερμικό κυκλοποιητή.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μη ειδική φθορίζουσα χρωστική, **SYBR Green I**. Η συγκεκριμένη χρωστική ενσωματώνεται σε δίκλωνα μόρια DNA. Κατά την διενέργεια ποσοτικής PCR πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Έτσι, η αύξηση της συγκέντρωσης των δίκλωνων προϊόντων της qPCR ακολουθείται από αύξηση του ανιχνεύσιμου φθορισμού. Βασικό μειονέκτημα της χρωστικής SYBR Green I αποτελεί η *μη επιλεκτική της πρόσδεση σε οποιοδήποτε δίκλωνο μη ειδικό προϊόν της αντίδρασης*, συμπεριλαμβανομένων των διμερών των εκκινητών. Το γεγονός αυτό καθιστά την αντίδραση λιγότερο αξιόπιστη και το αποτέλεσμα φθορισμού θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με την **καμπύλη αποδιάταξης (melting curve)** των προϊόντων της PCR ή με **ποιοτική ανάλυση σε gel αγαρόζης**.

Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης τόσο κατά την ενίσχυση του Bcl-2 όσο και του Bax και η **ηλεκτροφόρηση** χρησιμοποιήθηκε ως **τεχνική ποιοτικού ελέγχου**. Το αναμενόμενο και επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης ενίσχυσης του Bcl-2, μαζί με τους σχεδιασμένους εκκινητές αντιστοιχεί σε μήκος 157bp. Αντίστοιχα, όσον αφορά την αντίδραση ενίσχυσης του Bax, το αναμενόμενο και επιθυμητό προϊόν αντιστοιχεί σε μήκος 173bp. Έτσι, κάθε αντίδραση ποσοτικής Real Time PCR ακολουθήθηκε από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, με σκοπό την εύρεση της μοναδικής αναμενόμενης ζώνης του συγκεκριμένου προϊόντος που επρόκειτο να ενισχυθεί.



***Εικόνα 60**. Επιβεβαίωση της ειδικής ενίσχυσης του γονιδίου Bcl-2.*



Εικόνα 61. *Επιβεβαίωση της ειδικής ενίσχυσης του Bax.*

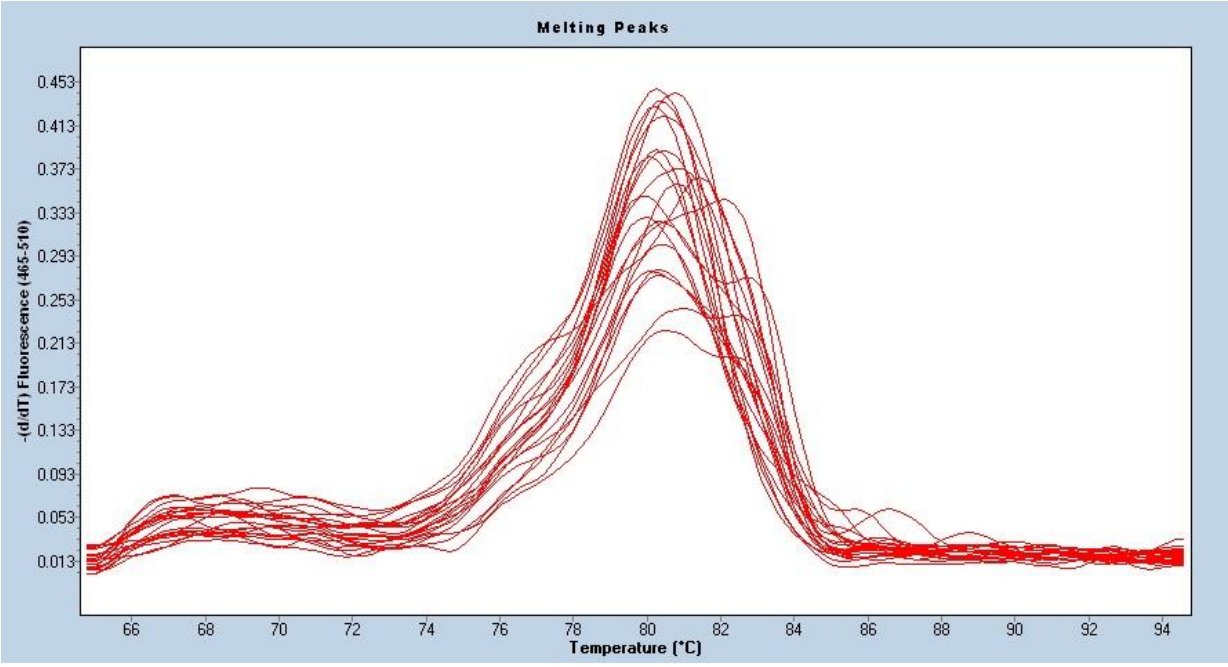
Το δεύτερο εργαλείο στην αξιολόγηση της ειδικότητας των προϊόντων που ενισχύθηκαν και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση αποτελεί η **melting curve**. Σε μια αντίδραση Real Time PCR που έχει σχεδιαστεί για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, αναμένεται μια μόνο κορυφή στην καμπύλη αποδιάταξης. Έτσι, η ύπαρξη περισσότερων κορυφών μεταφράζεται σε ενίσχυση περισσότερων του ενός προϊόντων. Σε περίπτωση που η ειδικότητα των εκκινητών ως προς την αλληλουχία-στόχο δεν είναι υψηλή, οι εκκινητές σχηματίζουν **διμερή (primer-dimers)**. Τα διμερή των εκκινητών είναι δίκλωνα μόρια DNA, τα οποία αποτελούν παραπροϊόντα της αντίδρασης, αποδιατάσσονται εξίσου κατά την αύξηση της θερμοκρασίας και δίνουν μια δεύτερη κορυφή στην melting curve, στην δική τους T_m.

Ωστόσο, ακριβώς επειδή η T_m των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το μήκος , την περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC και από την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών (mismatches), η κορυφή (ή κορυφές) που παρουσιάζουν τα διμερή των εκκινητών στην melting curve διακρίνεται (ή διακρίνονται) εύκολα από εκείνη του επιθυμητού προϊόντος. Το μέγεθος των εκκινητών και επακόλουθα η περιεκτικότητά τους σε βάσεις GC είναι σίγουρα μικρότερα της αλληλουχίας του προϊόντος, με αποτέλεσμα τα primer dimers να εμφανίζουν κορυφή σε μικρότερη θερμοκρασία από το προϊόν της αντίδρασης.

Βάσει των καμπύλων αποδιάταξης των αντιδράσεων ενίσχυσης των Bcl-2 και Bax, δεν παρατηρήθηκαν διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα κατά την εκτέλεση των αντιδράσεων.

Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζονται melting curves που παρατηρήθηκαν κατά την ενίσχυση του Bax. Είναι ενδεικτικές των αποτελεσμάτων, καθώς, τόσο κατά την ενίσχυση του Bax, όσο και κατά την ενίσχυση του Bcl-2 δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση παραπροϊόντων, ούτε διμερή εκκινητών. Η ειδική ενίσχυση της εκάστοτε αλληλουχίας-στόχου διαφαίνεται στην μοναδική κορυφή που παρουσιάζει κάθε καμπύλη αποδιάταξης στο παρακάτω

διάγραμμα. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζεται ο λόγος μεταβολής φθορισμού προς μεταβολή θερμοκρασίας (-ΔF/ΔT) και στον οριζόντιο η θερμοκρασία.



Διάγραμμα 19. Melting curves στην αντίδραση ενίσχυσης του Bax.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπογονιμότητα είναι αδιαμφισβήτητα ένα πρόβλημα της σύγχρονης εποχής που σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας αποτελεί διαταραχή της υγείας και χρήζει ιατρικής αντιμετώπισης. Η πιο αποτελεσματική θεραπεία της υπογονιμότητας είναι η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART: Assisted Reproduction Technology). Δεδομένου ότι ολοένα και περισσότερα ζευγάρια αντιμετωπίζουν διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος και δυσκολία στην απόκτηση απογόνων, ο κλάδος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ανθίζει και εξελίσσεται διαρκώς. Το ίδιο συμβαίνει και σε ερευνητικό επίπεδο, καθώς η έρευνα συνεπάγεται καλύτερη κατανόηση των εμπλεκόμενων σε κάθε βιολογική διαδικασία μηχανισμών, ακριβέστερη προσομοίωσή τους στο εργαστήριο, βελτίωση και εξέλιξη των τεχνικών τεχνητής γονιμοποίησης και αποτελεσματικότερη και πιο στοχευμένη θεραπεία της υπογονιμότητας.

Στην παρούσα εργασία το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στη γυναίκα, καθώς το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία ήταν τα κοκκώδη κύτταρα. Το σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων-ωοκυττάρου αποτελεί τη χαρακτηριστική δομή που επιτρέπει τη συμβίωση ενός κυττάρου της γαμετικής σειράς, του ωοκυττάρου, με τα σωματικά κοκκώδη κύτταρα. Τα κοκκώδη του ωοφόρου δίσκου (cumulus oophorus), αλλά και τα κοκκώδη που άπτονται του ωοκυττάρου (cumulus cells) και αποτελούν τον ακτινωτό στέφανο (corona radiata) αποτελούν το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας. Τα κοκκώδη κύτταρα αυτά επικοινωνούν στενά με το ωοκύτταρο μέσω χασμοσυνδέσμων και παρακρινικών παραγόντων, επιτρέποντας την αμφίδρομη ανταλλαγή θρεπτικών και σηματοδοτικών μορίων που ρυθμίζουν την ταυτόχρονη ανάπτυξη και ωρίμανση τόσο των κοκκωδών όσο και του ωοκυττάρου.

Ένα βασικό θέμα στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι η αδυναμία ακριβούς πρόβλεψης της ποιότητας των ωοκυττάρων (oocyte competence) που εν τέλει συνοψίζεται στο δυναμικό τους να γονιμοποιηθούν και να οδηγήσουν σε ποιοτικά έμβρυα και επίτευξη εγκυμοσύνης. Δεδομένου ότι οποιαδήποτε επεμβατική μέθοδος ελέγχου του ωοκυττάρου θα μπορούσε να επιβαρύνει την ποιότητά του, η μελέτη των κοκκωδών κυττάρων αποτελεί μια λογική εναλλακτική. Εξαιτίας, λοιπόν, της στενής αλληλεπίδρασής τους με το ωοκύτταρο, τα κοκκώδη κύτταρα έχουν αποτελέσει και συνεχίζουν να αποτελούν πεδίο συνεχούς έρευνας, καθώς πιθανόν φέρουν το αποτύπωμα των συνθηκών που επικρατούν κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοκυττάρου εντός του ωοθυλακίου.

Η γονιδιακή έκφραση στα κοκκώδη κύτταρα έχει μελετηθεί ευρέως, ενώ πλήθος μελετών καταδεικνύει την συσχέτιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με την βιωσιμότητα και την μετέπειτα τύχη των ωοκυττάρων. Αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων στα κοκκώδη νεότερων γυναικών (Matos et al. 2009), έκφραση πρωτεινών σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου (Wang, Tekpetey, and Kidder 2009), αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη ωοκυττάρων που γονιμοποιήθηκαν και εξελίχθηκαν σε καλής ποιότητας έμβρυα (McKenzie et al. 2004; Cillo et al. 2007), αλλά και μειωμένη έκφραση γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα ωοκυττάρων που οδήγησαν σε μορφολογικά ανώμαλα έμβρυα (Gasca et al. 2008), είναι λίγα μόνο από τα αποτελέσματα ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί με βασικό σκοπό την ταυτοποίηση γονιδίων-δεικτών της ποιότητας του ωοκυττάρου και της πιθανότητας να γονιμοποιηθεί και

να οδηγήσει σε ένα καλής ποιότητας έμβρυο. Επιπλέον, ο αποπτωτικός θάνατος των κοκκωδών κυττάρων έχει προγνωστική σημασία για την ποιότητα και την τύχη του ωοκυττάρου, καθώς ο ρυθμός του πολλαπλασιασμού και τα επίπεδα απόπτωσης των κυττάρων αυτών έχουν συσχετισθεί με την ωρίμανση των ανθρώπινων ωοκυττάρων, την γονιμοποίησή τους, αλλά και την μορφολογία των εμβρύων, την πιθανότητα να φθάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης και να εμφυτευθούν επιτυχώς σε προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης.(Høst et al. 2002) (Yang, Zhang, and Li 2009).

Βάσει, λοιπόν, των βιβλιογραφικών δεδομένων το ερευνητικό ενδιαφέρον για ταυτοποίηση γονιδίων-δεικτών που θα επιτρέπουν την επιλογή των ωοκυττάρων με το μεγαλύτερο αναπτυξιακό δυναμικό και την υψηλότερη πιθανότητα να οδηγήσουν σε έμβρυα καλής ποιότητας και επίτευξη εγκυμοσύνης είναι αδιαμφιβήτητα έντονο. Στο πλαίσιο αυτό διαμορφώθηκε και η ερευνητική υπόθεση της παρούσας εργασίας που συνοψίζεται στην **ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη και της ηλικίας της γυναίκας, του ποσοστού γονιμοποίησης και του ποσοστού των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης (blastulation rate).**

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν δυο γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2 και συμμετέχουν στην ρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού, τα Bcl-2 και Bax. Η επιλογή των γονιδίων δεν ήταν τυχαία, αλλά βασίστηκε στην πληθώρα μελετών που εστιάζουν στην οικογένεια Bcl-2, στην έκφραση των γονιδίων της οικογένειας στα κοκκώδη και στις πολλαπλές συσχετίσεις που μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί με το αναπτυξιακό δυναμικό του ωοκυττάρου, τα ποσοστά γονιμοποίησης και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Πιο συγκεριμένα, αυξημένη έκφραση του Bax και άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα ωοκύτταρα και στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται με αυξημένη τάση των κυττάρων αυτών να υποκύπτουν στον αποπτωτικό θάνατο, ενώ αυξημένη έκφραση του Bcl-2 και άλλων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών επάγει την επιβίωση των ωοκυττάρων. (Kim and Tilly 2004) Βάσει πολλών ερευνών που έχουν εκπονηθεί στο παρελθόν, ο λόγος της έκφρασης του Bcl-2 προς εκείνη του Bax έχει κεντρικό ρόλο στην τύχη του κυττάρου, καθορίζοντας εάν τελικά το κύτταρο θα υποκύψει στα αποπτωτικά σήματα ή όχι. (Oltval, Milliman, and Korsmeyer 1993) (Korzekwa et al. 2006). Τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά ωοκυττάρων που δεν ωριμάζουν πλήρως και με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης μετά από ICSI (Høst et al. 2002). Ακόμη, η υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων σε συνδυασμό με την υπο-έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων είναι ενδεικτικές της ποιότητας του ωοκυττάρου και μετέπειτα του εμβρύου (van Montfoort et al. 2008) και η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται με την ποιότητα του εμβρύου και την έκβαση της εγκυμοσύνης. (S. Assou et al. 2008) Τα επίπεδα έκφρασης του Bcl-2 στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells) σχετίζονται με την ικανότητα του ωοκυττάρου να ωριμάσει και να γονιμοποιηθεί. (Filali et al. 2009), ενώ τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του Bax σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά πλήρους ωρίμανσης και γονιμοποίησης ωοκυττάρων και καλύτερης ποιότητας έμβρυα.(van Montfoort et al. 2008; Corn et al. 2005; Almeida et al. 2018)

Οι λόγοι των εκφράσεων των γονιδίων Bcl-2/ Bax στα κοκκώδη κύτταρα υπογόνιμων γυναικών συσχετίστηκαν με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό εμβρύων που προχώρησαν μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης.

Στην **πρώτη συσχέτιση**, το δείγμα των γυναικών χωρίστηκε σε 3 ηλικιακές υποομάδες με βάση τα ετήσια reports της ESHRE (γυναίκες ≤34 ετών, 35-39 ετών και ≥40 ετών). Το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν η ύπαρξη συσχέτισης του λόγου με την ηλικία. Συγκεκριμένα, υποθέσαμε ότι αφού η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται από ωοκύτταρα χειρότερης ποιότητας, στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας τα ποσοστά απόπτωσης θα ήταν υψηλότερα και ο λόγος Bcl2/Bax μειωμένος.

Με βάση τα αποτελέσματά μας δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του λόγου με την ηλικία της γυναίκας. Ανεξάρτητα από την ηλικία, ο λόγος των εκφράσεων ήταν μεγαλύτερος της μονάδας. Επομένως, η έκφρασης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 ήταν σε κάθε ηλικιακή ομάδα μεγαλύτερη της έκφρασης του προ-αποπτωτικού Bax, ευνοώντας την προστασία από τον αποπτωτικό θάνατο.

Η **δεύτερη συσχέτιση** αφορούσε τον λόγο Bcl-2/Bax και το ποσοστό γονιμοποίησης. Οι γυναίκες κατηγοριοποιήθηκαν αυτή τη φορά σε δυο ομάδες με βάση την επίτευξη γονιμοποίησης σε ποσοστό μεγαλύτερο/ίσο του 75% ή μικρότερο του 75%. Όπως προαναφέρθηκε, τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης έχουν σχετιστεί με τα μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης. Αναμενόταν, λοιπόν, η ομάδα με ποσοστό γονιμοποίησης μικρότερο του 75% να παρουσιάζει εντονότερη απόπτωση και μικρότερο λόγο Bcl-2/Bax.

Ωστόσο, στα αποτελέσματά μας δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του λόγου με το ποσοστό της γονιμοποίησης. Και στις δυο υπο-ομάδες η έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 υπερτερεί, με αποτέλεσμα ο λόγος Bcl-2/Bax να έχει τιμή μεγαλύτερη της μονάδας και επαγωγικά να προωθείται η προστασία από τον αποπτωτικό θάνατο.

Η **τρίτη** και τελευταία συσχέτιση αφορούσε τον λόγο των εκφράσεων Bcl-2/Bax και το ποσοστό blastulation, δηλαδή το ποσοστό των εμβρύων που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Οι δυο ομάδες που δημιουργήθηκαν αφορούσαν ποσοστό βλαστοκύστεων μεγαλύτερο/ίσο και μικρότερο του 50% του συνόλου των εμβρύων. Με βάση τη βιβλιογραφία, ο λόγος έχει συσχετιστεί με την ποιότητα των εμβρύων, οπότε η αρχική πειραματική υπόθεση αφορούσε την ύπαρξη συσχέτισης και με το ποσοστό blastulation. Συγκεκριμένα, δεδομένου ότι αυξημένα ποσοστά απόπτωσης συνδέονται με χειρότερης ποιότητας έμβρυα, αναμέναμε ο μειωμένος λόγος της έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων να σχετίζεται με μειωμένα ποσοστά blastulation.

Στα αποτελέσματά μας παρατηρήθηκε πράγματι ότι ο λόγος των εκφράσεων Bcl-2/Bax στα κοκκώδη κύτταρα γυναικών με μειωμένα ποσοστά βλαστοκύστεων ήταν ελαφρώς μικρότερος της μονάδας. Αυτό σημαίνει πως όταν η έκφραση του προ-αποπτωτικού Bax υπερέχει αυτής του αντι-αποπτωτικού Bcl-2, επάγεται ο αποπτωτικός μηχανισμός και η επιρροή του στην τύχη των εμβρύων είναι σημαντική, μιας και το ποσοστό των εμβρύων που προχωρούν στο στάδιο της βλαστοκύστης μειώνεται. Αντίστοιχα, όταν η έκφραση του Bcl-2 υπερτερεί της έκφρασης του Bax και ο αποπτωτικός θάνατος παρεμποδίζεται, τα ποσοστά επιβίωσης των εμβρύων αυξάνονται καθιστώντας τα ικανά να εξελιχθούν σε βλαστοκύστη την πέμπτη/ έκτη ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η τρίτη, λοιπόν, και

τελευταία συσχέτιση παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς διαφαίνεται μια τάση του μελετώμενου λόγου να συσχετισθεί με το ποσοστό blastulation.

Η μελέτη των ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία δεν οδήγησε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την ηλικία της γυναίκας, το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό των εμβρύων που προχώρησαν στο στάδιο βλαστοκύστης. Οι πρωτεΐνες BCL-2 και BAX που κωδικοποιούνται από τα μελετώμενα γονίδια ανήκουν στην ευρέως μελετημένη οικογένεια των BCL-2 πρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή ρυθμίζει τον αποπτωτικό θάνατο μέσω του εσωτερικού/ μιτοχονδριακού μονοπατιού. Όπως είναι σαφές, όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας συμμετέχουν στο αποπτωτικό μονοπάτι επιτελώντας, τον προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό τους ρόλο. Έτσι, παρότι ο λόγος έκφρασης των Bcl-2 και Bax αποτελεί ένα δείκτη της ροπής του κυττάρου προς την επιβίωση ή το θάνατο η μελέτη της έκφρασης και άλλων γονιδίων-μελών την οικογένειας θα μπορούσε πιθανόν να οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Το γονίδιο BCL2L11 γνωστό και ως BIM ανήκει επίσης στην οικογένεια BCL-2. Η έρευνα του Assou και των συνεργατών του κατέδειξε ότι η έκφραση της BCL2L11 στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται με την επίτευξη ή όχι εγκυμοσύνης. Η πρωτεΐνη BCL2L11 ανήκει στις BH3-only πρωτεΐνες της οικογένειας και επάγει τον αποπτωτικό θάνατο, είτε παρεμποδίζοντας την δράση αντι-αποπτωτικών μελών όπως η BCL-2, είτε επάγοντας την δράση προ-αποπτωτικών μελών όπως η BAX και η BAK. Το ενδιαφέρον εύρημα της εργασίας είναι ότι η αυξημένη έκφραση του BCL2L11 στα κοκκώδη συσχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα εγκυμοσύνης. Παρότι η BCL2L11 συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης επάγοντάς την, παρουσιάζει αυξημένη έκφραση κατά την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. (Assou et al. 2008)

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου **Bcl2l1** που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCL2L11 θα μπορούσε να αποτελέσει συνέχεια της παρούσας ερευνητικής μελέτης. Η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης BCL-2 σε σχέση με την BAX που παρατηρήθηκε στα αποτελέσματα της εργασίας στις περισσότερες περιπτώσεις, θα μπορούσε να οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης BCL2L11, βάσει των παραπάνω βιβλιογραφικών δεδομένων. Σε αυτήν την περίπτωση η σχέση της έκφρασης των γονιδίων με το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό βλαστοκύστεων θα μπορούσε να διαλευκανθεί. Τα μειωμένα επίπεδα απόπτωσης που παρατηρήσαμε θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την μειωμένη έκφραση της BCL2L11 και να συσχετιστούν με μειωμένα επίπεδα γονιμοποίησης και επίτευξης εγκυμοσύνης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γονίδιο **Bcl2l10** που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCL2L10. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει επίσης στην οικογένεια BCL-2 και έχει ρόλο αντι-αποπτωτικό. Συγκεκριμένα, αποτελεί την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας με την μεγαλύτερη έκφραση στο ωοκύτταρο και στο έμβρυο στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του. Προσδένεται στην BAX καταστέλλοντας τον προ-αποπτωτικό της ρόλο και προστατεύοντας επαγωγικά το ωοκύτταρο και το έμβρυο από τον αποπτωτικό θάνατο. (Boumela et al. 2011)

Σε συνέχεια της παρούσας εργασίας, η μελέτη της έκφρασης της BCL2L10 θα παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η αυξημένη έκφραση της BCL2L10 θα μπορούσε να σχετιστεί με την χαμηλή έκφραση που παρουσίασε η BAX στα αποτελέσματά μας.

Η συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων BCL-2 και BAX με τις κασπάσες θα παρουσίαζε επίσης ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 ρυθμίζουν την απόπτωση μέσω του εσωτερικού-μιτοχονδριακού μονοπατιού. Η μελέτη της έκφρασης της κασπάσης 3 που συμμετέχει στην τελική διάσπαση των κυτταρικών στοιχείων θα μπορούσε να δώσει μια πληρέστερη εικόνα του αποπτωτικού μονοπατιού. Τέλος, το γεγονός ότι εκτός του εσωτερικού μονοπατιού η απόπτωση μπορεί να επαχθεί και από το εξωτερικό μονοπάτι γεννά πρόσθετο ενδιαφέρον για τα επίπεδα έκφρασης παραγόντων (TNFR, FAS) που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό, στα κοκκώδη κύτταρα.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, η μελέτη μεγαλύτερου δείγματος γυναικών θα οδηγούσε αναμφίβολα σε ασφαλέστερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Παράλληλα η χρήση ειδικών φθοριζουσών χρωστικών με probes, αντί για την SYBR GREEN I, θα οδηγούσε αναμφίβολα σε ασφαλέστερα αποτελέσματα. Η υβριδοποίηση των μορίων DNA, που φέρουν τις χρωστικές, ανάμεσα στους εκκινητές του τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί μειώνει την πιθανότητα ενίσχυσης διμερών εκκινητών καθιστώντας το αποτέλεσμα σαφώς πιο ειδικό.

Εν κατακλείδι, η σχέση αλληλεξάρτησης των κοκκωδών κυττάρων με το ωοκύτταρο δεν μπορεί να αμφισβητηθεί. Λειτουργικά κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την πλήρη ωρίμανση του ωοκυττάρου, καθώς και για την επίτευξη του αναπαραγωγικού του σκοπού. Η προσπάθεια ανάλυσης του γονιδιακού προφίλ των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο, μη επεμβατικό εργαλείο στην επιλογή των καταλληλότερων εμβρύων για μεταφορά και επίτευξη εγκυμοσύνης. Η συλλογή των κοκκωδών κυττάρων και η ανάλυση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών που θα οδηγούν στην επιλογή των κατάλληλων ωαρίων για γονιμοποίηση ή των κατάλληλων εμβρύων για μεταφορά αποτελεί μια πολύ σημαντική προοπτική εξέλιξης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Η ταυτοποίηση βιοδεικτών στα κοκκώδη κύτταρα που θα αποκαλύπτουν τα ωοκύτταρα και τα έμβρυα υψηλής ποιότητας θα οδηγούσε αντίστοιχα σε αυξημένα ποσοστά γονιμοποίησης και κλινικών κυήσεων. Η θεραπεία υπογονιμότητας θα ήταν εξατομικευμένη και πολύ πιο αποτελεσματική και η οικονομική, σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση των ζευγαριών σημαντικά μικρότερη.

Τα γονίδια Bcl-2, Bax, αλλά και αρκετά άλλα μέλη της οικογένειας Bcl-2 φαίνεται να σχετίζονται με την τύχη του ωοκυττάρου, του εμβρύου και με την επίτευξη εγκυμοσύνης. Περαιτέρω έρευνα των επιπέδων έκφρασής τους απαιτείται, ώστε τα γονίδια αυτά να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια ως προγνωστικοί, μη επεμβατικοί δείκτες της τύχης του ωοκυττάρου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Vander - m.d. - J.Sherman - ph.d. - D. Luciano - ph.d. - M. Τσακόπουλος m.d. N. Γελαδάς. 2011. *Φυσιολογία Του Ανθρώπου*. 8η. Πασχαλίδης.

"Abi-Rtpcr-Pcr.Pdf." n.d. Accessed June 16, 2019. https://www.gene-quantification.de/abi-rtpcr-pcr.pdf.

Adamopoulos, Panagiotis G., Christos K. Kontos, Panagiotis Tsiakanikas, and Andreas Scorilas. 2016. "Identification of Novel Alternative Splice Variants of the BCL2L12 Gene in Human Cancer Cells Using Next-Generation Sequencing Methodology." *Cancer Letters* 373 (1): 119–29. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.019.

Akgul, C., D.A. Moulding, and S.W. Edwards. 2004. "Alternative Splicing of Bcl-2-Related Genes: Functional Consequences and Potential Therapeutic Applications." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (17). https://doi.org/10.1007/s00018-004-4001-7.

Almeida, Camila P., Márcia C.F. Ferreira, Camila O. Silveira, Jacira R. Campos, Isabella T. Borges, Pedro G. Baeta, Felipe H.S. Silva, Fernando M. Reis, and Helen L. Del Puerto. 2018. "Clinical Correlation of Apoptosis in Human Granulosa Cells-A Review: Apoptosis in Human Granulosa Cells." *Cell Biology International* 42 (10): 1276–81. https://doi.org/10.1002/cbin.11036.

Andersen, Claus Y, and Diego Ezcurra. 2014. "Human Steroidogenesis: Implications for Controlled Ovarian Stimulation with Exogenous Gonadotropins." *Reproductive Biology and Endocrinology* 12 (1): 128. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-128.

Assou, S., D. Haouzi, K. Mahmoud, A. Aouacheria, Y. Guillemin, V. Pantesco, T. Reme, H. Dechaud, J. De Vos, and S. Hamamah. 2008. "A Non-Invasive Test for Assessing Embryo Potential by Gene Expression Profiles of Human Cumulus Cells: A Proof of Concept Study." *Molecular Human Reproduction* 14 (12): 711–19. https://doi.org/10.1093/molehr/gan067.

Assou, Said, Tal Anahory, Véronique Pantesco, Tanguy Le Carrour, Franck Pellestor, Bernard Klein, Lionel Reyftmann, Hervé Dechaud, John De Vos, and Samir Hamamah. 2006. "The Human Cumulus–Oocyte Complex Gene-Expression Profile." *Human Reproduction* 21 (7): 1705–19. https://doi.org/10.1093/humrep/del065.

Birkinshaw, Richard W., and Peter E. Czabotar. 2017. "The BCL-2 Family of Proteins and Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72 (December): 152–62. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.001.

Boumela, Imene, Said Assou, Abdel Aouacheria, Delphine Haouzi, Hervé Dechaud, John De Vos, Alan Handyside, and Samir Hamamah. 2011. "Involvement of BCL2 Family Members in the Regulation of Human Oocyte and Early Embryo Survival and Death: Gene Expression and Beyond." *Reproduction* 141 (5): 549–61. https://doi.org/10.1530/REP-10-0504.

"CDNA Synthesis Invitrogen." n.d. Accessed May 19, 2019. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/18267.pdf.

Cillo, Fabiana, Tiziana A L Brevini, Stefania Antonini, Alessio Paffoni, Guido Ragni, and Fulvio Gandolfi. 2007. "Association between Human Oocyte Developmental Competence and Expression Levels of Some Cumulus Genes." *Reproduction* 134 (5): 645–50. https://doi.org/10.1530/REP-07-0182.

Corn, Claudia Maria, Cornelia Hauser-Kronberger, Marianne Moser, Gernot Tews, and Thomas Ebner. 2005. "Predictive Value of Cumulus Cell Apoptosis with Regard to Blastocyst Development of Corresponding Gametes." *Fertility and Sterility* 84 (3): 627–33. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.061.

Coticchio, Giovanni, Mariabeatrice Dal Canto, Mario Mignini Renzini, Maria Cristina Guglielmo, Fausta Brambillasca, Diana Turchi, Paola Vittoria Novara, and Rubens Fadini. 2015. "Oocyte Maturation: Gamete-Somatic Cells Interactions, Meiotic Resumption, Cytoskeletal Dynamics and Cytoplasmic Reorganization." *Human Reproduction Update* 21 (4): 427–54. https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011.

Dekel, Nava. 1988. "Regulation of Oocyte Maturation.: The Role of Camp." *Annals of the New York Academy of Sciences* 541 (1 In Vitro Fert): 211–16. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb22258.x.

Delbridge, Alex R. D., Stephanie Grabow, Andreas Strasser, and David L. Vaux. 2016. "Thirty Years of BCL-2: Translating Cell Death Discoveries into Novel Cancer Therapies." *Nature Reviews Cancer* 16 (2): 99–109. https://doi.org/10.1038/nrc.2015.17.

Depalo, R. 2003. "Evidence of Apoptosis in Human Primordial and Primary Follicles." *Human Reproduction* 18 (12): 2678–82. https://doi.org/10.1093/humrep/deg507.

Dhali, Arindam, Pradeep Krishna Javvaji, Atul P. Kolte, Joseph Rabinson Francis, Sudhir C. Roy, and Veerasamy Sejian. 2017. "Temporal Expression of Cumulus Cell Marker Genes during in Vitro Maturation and Oocyte Developmental Competence." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 34 (11): 1493–1500. https://doi.org/10.1007/s10815-017-0998-z.

DiLuigi, Andrea, Vanessa N. Weitzman, Margaret C. Pace, Linda J. Siano, Donald Maier, and Lisa M. Mehlmann. 2008. "Meiotic Arrest in Human Oocytes Is Maintained by a Gs Signaling Pathway." *Biology of Reproduction* 78 (4): 667–72. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066019.

Dube, Jennifer L., Pei Wang, Julia Elvin, Karen M. Lyons, Anthony J. Celeste, and Martin M. Matzuk. 1998. "The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes." *Molecular Endocrinology* 12 (12): 1809–17. https://doi.org/10.1210/mend.12.12.0206.

Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337.

Eppig, John J. 1982. "The Relationship between Cumulus Cell-Oocyte Coupling, Oocyte Meiotic Maturation, and Cumulus Expansion." *Developmental Biology* 89 (1): 268–72. https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90314-1.

Erickson, Gregory F, and S Shimasaki. 2000. "The Role of the Oocyte in Folliculogenesis." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11 (5): 193–98. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00249-6.

Faddy, M.J., and R.G. Gosden. 1995. "Physiology: A Mathematical Model of Follicle Dynamics in the Human Ovary." *Human Reproduction* 10 (4): 770–75. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136036.

Filali, M, N Frydman, Mp Belot, L Hesters, F Gaudin, G Tachdjian, D Emilie, R Frydman, and V Machelon. 2009. "Oocyte In-Vitro Maturation: BCL2 MRNA Content in Cumulus Cells Reflects Oocyte Competency." *Reproductive BioMedicine Online* 19 (January): 71–84. https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61071-1.

Forgacs, Gabor, and Stuart A. Newman. 2005. *Biological Physics of the Developing Embryo*. Cambridge University Press.

Fortune, J.E. 2003. "The Early Stages of Follicular Development: Activation of Primordial Follicles and Growth of Preantral Follicles." *Animal Reproduction Science* 78 (3–4): 135–63. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5.

Gasca, Stéphan, Lionel Reyftmann, Franck Pellestor, Thierry Rème, Said Assou, Tal Anahory, Hervé Dechaud, Bernard Klein, John De Vos, and Samir Hamamah. 2008. "Total Fertilization Failure and Molecular Abnormalities in Metaphase II Oocytes." *Reproductive Biomedicine Online* 17 (6): 772–81.

Gianaroli, Luca, M.Cristina Magli, Anna P Ferraretti, Daniela Fortini, and Natascia Grieco. 2003. "Pronuclear Morphology and Chromosomal Abnormalities as Scoring Criteria for Embryo Selection." *Fertility and Sterility* 80 (2): 341–49. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00596-X.

Gilbert, Scott F. 2000. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates.

Gilchrist, R. B., A. M. Luciano, D. Richani, H. T. Zeng, X. Wang, M. De Vos, S. Sugimura, J. Smitz, F. J. Richard, and J. G. Thompson. 2016. "Oocyte Maturation and Quality: Role of Cyclic Nucleotides." *Reproduction* 152 (5): R143–57. https://doi.org/10.1530/REP-15-0606.

Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F. Macleod. 2010. "Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms." *The Journal of Pathology* 221 (1): 3–12. https://doi.org/10.1002/path.2697.

Gougeon, A. 1986. "Dynamics of Follicular Growth in the Human: A Model from Preliminary Results." *Human Reproduction* 1 (2): 81–87. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365.

Gougeon, Alain. 1996. "Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses." *Endocrine Reviews* 17 (2): 121–55. https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121.

Hardarson, T. 2003. "A Morphological and Chromosomal Study of Blastocysts Developing from Morphologically Suboptimal Human Pre-Embryos Compared with Control Blastocysts." *Human Reproduction* 18 (2): 399–407. https://doi.org/10.1093/humrep/deg092.

Hartshorne, G. M. 1997. "In Vitro Culture of Ovarian Follicles." *Reviews of Reproduction* 2 (2): 94–104.

Hillier, S.G. 1994. "Current Concepts of the Roles of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Folliculogenesis." *Human Reproduction* 9 (2): 188–91. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138480.

Høst, Erik, Anette Gabrielsen, Svend Lindenberg, and Steen Smidt-Jensen. 2002. "Apoptosis in Human Cumulus Cells in Relation to Zona Pellucida Thickness Variation, Maturation Stage, and Cleavage of the Corresponding Oocyte after Intracytoplasmic Sperm Injection." *Fertility and Sterility* 77 (3): 511–15. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03006-0.

Huang, D C, J M Adams, and S Cory. 1998. "The Conserved N-Terminal BH4 Domain of Bcl-2 Homologues Is Essential for Inhibition of Apoptosis and Interaction with CED-4." *The EMBO Journal* 17 (4): 1029–39. https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1029.

Huang, Zhongwei, and Dagan Wells. 2010. "The Human Oocyte and Cumulus Cells Relationship: New Insights from the Cumulus Cell Transcriptome." *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 16 (10): 715–25. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq031.

Inohara, N., D. Ekhterae, I. Garcia, R. Carrio, J. Merino, A. Merry, S. Chen, and G. Núñez. 1998. "Mtd, a Novel Bcl-2 Family Member Activates Apoptosis in the Absence of Heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (15): 8705–10. https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8705.

Kawatani, Makoto, and Masaya Imoto. 2003. "Deletion of the BH1 Domain of Bcl-2 Accelerates Apoptosis by Acting in a Dominant Negative Fashion." *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19732–42. https://doi.org/10.1074/jbc.M213038200.

Khemtémourian, Lucie, Marc-Antoine Sani, Katell Bathany, Gerhard Gröbner, and Erick J. Dufourc. 2006. "Synthesis and Secondary Structure in Membranes of the Bcl-2 Anti-Apoptotic Domain BH4." *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 12 (1): 58–64. https://doi.org/10.1002/psc.686.

Kim, Mee-Ran, and Jonathan L. Tilly. 2004. "Current Concepts in Bcl-2 Family Member Regulation of Female Germ Cell Development and Survival." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644 (2–3): 205–10. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.10.012.

Korzekwa, Anna J, Kiyoshi Okuda, Izabela Woclawek-Potocka, Shuko Murakami, and Dariusz J Skarzynski. 2006. "Nitric Oxide Induces Apoptosis in Bovine Luteal Cells." *Journal of Reproduction and Development* 52 (3): 353–61. https://doi.org/10.1262/jrd.17092.

Levine, Beth, Sangita Sinha, and Guido Kroemer. 2008. "Bcl-2 Family Members." *Autophagy* 4 (5): 600–606.

Lyons, K M, R W Pelton, and B L Hogan. 1989. "Patterns of Expression of Murine Vgr-1 and BMP-2a RNA Suggest That Transforming Growth Factor-Beta-like Genes Coordinately Regulate Aspects of Embryonic Development." *Genes & Development* 3 (11): 1657–68. https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1657.

Maraldi, T., M. Riccio, P. Sena, L. Marzona, A. Nicoli, A. La Marca, S. Marmiroli, J. Bertacchini, G. La Sala, and A. De Pol. 2009. "MATER Protein as Substrate of PKC in Human Cumulus Cells." *Molecular Human Reproduction* 15 (8): 499–506. https://doi.org/10.1093/molehr/gap048.

Martini, M C, J W Lampe, J L Slavin, and M S Kurzer. 1994. "Effect of the Menstrual Cycle on Energy and Nutrient Intake." *The American Journal of Clinical Nutrition* 60 (6): 895–99. https://doi.org/10.1093/ajcn/60.6.895.

Matos, L., D. Stevenson, F. Gomes, J.L. Silva-Carvalho, and H. Almeida. 2009. "Superoxide Dismutase Expression in Human Cumulus Oophorus Cells." *Molecular Human Reproduction* 15 (7): 411–19. https://doi.org/10.1093/molehr/gap034.

Mattioli, Mauro, and Barbara Barboni. 2000. “Signal Transduction Mechanism for LH in the Cumulus–Oocyte Complex.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 161 (1–2): 19–23. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00218-X.

McGee, Elizabeth A., and Aaron J. W. Hsueh. 2000. “Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles [1].” *Endocrine Reviews* 21 (2): 200–214. https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394.

McGrath, S A, A F Esquela, and S J Lee. 1995. “Oocyte-Specific Expression of Growth/Differentiation Factor-9.” *Molecular Endocrinology* 9 (1): 131–36. https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760846.

McKay, Donald G., Arthur T. Hertig, Eleanor C. Adams, and Sara Danziger. 1953. “Histochemical Observations on the Germ Cells of Human Embryos.” *The Anatomical Record* 117 (2): 201–19. https://doi.org/10.1002/ar.1091170206.

McKenzie, L.J., S.A. Pangas, S.A. Carson, E. Kovanci, P. Cisneros, J.E. Buster, P. Amato, and M.M. Matzuk. 2004. “Human Cumulus Granulosa Cell Gene Expression: A Predictor of Fertilization and Embryo Selection in Women Undergoing IVF.” *Human Reproduction* 19 (12): 2869–74. https://doi.org/10.1093/humrep/deh535.

Montfoort, A. P.A. van, J. P.M. Geraedts, J. C.M. Dumoulin, A. P.M. Stassen, J. L.H. Evers, and T. A.Y. Ayoubi. 2008. “Differential Gene Expression in Cumulus Cells as a Prognostic Indicator of Embryo Viability: A Microarray Analysis.” *Molecular Human Reproduction* 14 (3): 157–68. https://doi.org/10.1093/molehr/gam088.

Oltval, Zoltán N., Curt L. Milliman, and Stanley J. Korsmeyer. 1993. “Bcl-2 Heterodimerizes in Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programed Cell Death.” *Cell* 74 (4): 609–19. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-O.

Otsuka, Fumio, Zuxu Yao, Taek-hoo Lee, Shin Yamamoto, Gregory F. Erickson, and Shunichi Shimasaki. 2000. “Bone Morphogenetic Protein-15: IDENTIFICATION OF TARGET CELLS AND BIOLOGICAL FUNCTIONS.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (50): 39523–28. https://doi.org/10.1074/jbc.M007428200.

Palma, Gustavo Adolfo, Martin Eduardo Argañaraz, Antonio Daniel Barrera, Daniela Rodler, Adrian Ángel Mutto, and Fred Sinowatz. 2012. “Biology and Biotechnology of Follicle Development.” *The Scientific World Journal* 2012: 1–14. https://doi.org/10.1100/2012/938138.

Perez, Gloria I., Andrea Jurisicova, Lisa Wise, Tatiana Lipina, Marijana Kanisek, Allison Bechard, Yasushi Takai, et al. 2007. “Absence of the Proapoptotic Bax Protein Extends Fertility and Alleviates Age-Related Health Complications in Female Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (12): 5229–34. https://doi.org/10.1073/pnas.0608557104.

Petros, Andrew M., Edward T. Olejniczak, and Stephen W. Fesik. 2004. “Structural Biology of the Bcl-2 Family of Proteins.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology, 1644 (2): 83–94. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012.

Pincus, Gregory, and E. V. Enzmann. 1935. “THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO.” *The Journal of Experimental Medicine* 62 (5): 665–75.

Pistritto, Giuseppa, Daniela Trisciuoglio, Claudia Ceci, Alessia Garufi, and Gabriella D’Orazi. 2016. “Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies.” *Aging* 8 (4): 603–19. https://doi.org/10.18632/aging.100934.

Prados, F. J., S. Debrock, J. G. Lemmen, and I. Agerholm. 2012. “The Cleavage Stage Embryo.” *Human Reproduction* 27 (suppl 1): i50–71. https://doi.org/10.1093/humrep/des224.

“PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time).” n.d. Accessed May 19, 2019. http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/RR037A_e[1].v0610[0].pdf.

“QIAamp RNA Blood Mini Handbook.Pdf.” n.d. Accessed August 8, 2019. http://www.algimed.by/download/EN-QIAamp-RNA-Blood-Mini-Handbook.pdf.

Rahilly, Ronan, and Muller. 2000. *Εμβρυολογία Και Τερατολογία Του Ανθρώπου*. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.

Reed, Beverly G., and Bruce R. Carr. 2000. “The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation.” In *Endotext*, edited by Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Alison Boyce, George Chrousos, Kathleen Dungan, Ashley Grossman, Jerome M. Hershman, et al. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/.

Reed, J. C. 1999. “Mechanisms of Apoptosis Avoidance in Cancer.” *Current Opinion in Oncology* 11 (1): 68–75.

Reynolds, L P, and D A Redmer. 1998. “Expression of the Angiogenic Factors, Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor, in the Ovary.” *Journal of Animal Science* 76 (6): 1671. https://doi.org/10.2527/1998.7661671x.

Rimon-Dahari, Nitzan, Lia Yerushalmi-Heinemann, Liat Alyagor, and Nava Dekel. 2016. “Ovarian Folliculogenesis.” In *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, edited by Rafal P. Piprek, 58:167–90. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7.

Rocío, Nuñez-Calonge. 2019. “Apoptotic Markers and Antioxidant Enzymes Have Altered Expression in Cumulus and Granulosa Cells of Young Women with Poor Response to Ovarian Stimulation” 3 (1): 6.

Salha, O. 1998. “Dynamics of Human Follicular Growth and In-Vitro Oocyte Maturation.” *Human Reproduction Update* 4 (6): 816–32. https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.816.

Schmid, P., D. Cox, H. Vanderputten, G.K. Mcmaster, and G. Bilbe. 1994. “Expression of TGF-BS and TGF-β Type II Receptor MRNAs in Mouse Folliculogenesis: Stored Maternal TGF-B2 Message in Oocytes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (2): 649–56. https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1750.

Shamas-Din, Aisha, Justin Kale, Brian Leber, and David W. Andrews. 2013. “Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714.

Siddiqui, Waseem Ahmad, Amjid Ahad, and Haseeb Ahsan. 2015. “The Mystery of BCL2 Family: Bcl-2 Proteins and Apoptosis: An Update.” *Archives of Toxicology* 89 (3): 289–317. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7.

Syntichaki, Popi, and Nektarios Tavernarakis. 2002. “Death by Necrosis.” *EMBO Reports* 3 (7): 604–9. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf138.

Tanghe, Sofie, Ann Van Soom, Hans Nauwynck, Marc Coryn, and Aart de Kruif. 2002. “Minireview: Functions of the Cumulus Oophorus during Oocyte Maturation, Ovulation, and Fertilization.” *Molecular Reproduction and Development* 61 (3): 414–24. https://doi.org/10.1002/mrd.10102.

Tzifi, Flora, Christina Economopoulou, Dimitrios Gourgiotis, Alexandros Ardavanis, Sotirios Papageorgiou, and Andreas Scorilas. 2012. “The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias.” Research article. Advances in Hematology. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/524308.

Virant-Klun, Irma, Katja Knez, Tomaz Tomazevic, and Thomas Skutella. 2013. “Gene Expression Profiling of Human Oocytes Developed and Matured In Vivo or In Vitro.” Research article. BioMed Research International. 2013. https://doi.org/10.1155/2013/879489.

Wang, H.-X., F. R. Tekpetey, and G. M. Kidder. 2009. “Identification of WNT/ -CATENIN Signaling Pathway Components in Human Cumulus Cells.” *Molecular Human Reproduction* 15 (1): 11–17. https://doi.org/10.1093/molehr/gan070.

Watson, A. J. 2007. “Oocyte Cytoplasmic Maturation: A Key Mediator of Oocyte and Embryo Developmental Competence1.” *Journal of Animal Science* 85 (suppl_13): E1–3. https://doi.org/10.2527/jas.2006-432.

Yang, Yong-jie, Yan-jun Zhang, and Yuan Li. 2009. “Ultrastructure of Human Oocytes of Different Maturity Stages and the Alteration during in Vitro Maturation.” *Fertility and Sterility* 92 (1): 396.e1-396.e6. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.010.

Zwain, Ismail, Ismail H. Zwain, and Paula Amato. 2001. “CAMP-INDUCED APOPTOSIS IN GRANULOSA CELLS IS ASSOCIATED WITH UP-REGULATION OF P53 AND BAX AND DOWN-REGULATION OF CLUSTERIN.” *Endocrine Research* 27 (1–2): 233–49. https://doi.org/10.1081/ERC-100107184.