



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΡΟΔΟΛΑΚΗΣ

**ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

**Μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της
θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην *in vitro* ωρίμαση ωρίων πρόφασης I
ποντικού**

ΦΟΥΣΤΟΥΚΟΥ ΑΙΜΙΛΙΑ

A.M.: 20130579

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική»

Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην in vitro ωρίμαση ωαρίων πρόφασης I ποντικού»

Φουστούκου Αιμιλία

Βιολόγος

A.M.: 20130579

Επιβλέπων Καθηγητής

- **Δρακάκης Πέτρος**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Δρακάκης Πέτρος**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Ντόμαλη Αικατερίνη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Δέσποινα Μαυρογιάννη**, Δρ. Μοριακής Βιολογίας – Ε.ΔΙ.Π Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	11
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
B.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ, ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ.....	16
B.1.A. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ	16
B.1.B. ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ (TSH) ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ TSH-R	18
B.1.Γ. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ (T3, T4) ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ TRa και TRb	22
B.1.Δ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ TSH ΚΑΙ T3, T4 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	27
B2. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ, ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ, ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	29
B.2.A. ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	29
B.2.B. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	38
B.2.Γ. ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	39
B.2.Δ. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ	41
B.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ <i>IN VITRO</i>	44
B.3.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ I	44
B.3.B. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ/ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	44
B.3.Γ. <i>IN VITRO</i> ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ.....	46
B.3.Δ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ.....	49
Γ.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	51
Γ.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	51
Γ.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51

Γ.2.Α. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	51
Γ.2.Β. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ	51
Γ.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	52
Γ.3.Α ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ Ι.....	52
Γ.3.Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΤΡΟΠΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤSH ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ Τ3 ΣΤΗΝ <i>IN</i> <i>VITRO</i> ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ Ι ΠΟΝΤΙΚΟΥ	53
Γ.3.Γ. ΚΑΜΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	54
Γ.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	54
Γ.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
Γ.5.Α. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤSH ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ	55
Γ.5.Β. ΕΠΙΔΡΑΣΗ Τ3 ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ	62
Γ.6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
Δ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

*Στα παιδιά μου,
Φίλιππο και Νεφέλη*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2016 στο εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική», της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και πρωτίστως τον κ. Δημήτριο Λουτράδη, Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο ΜΠΣ.

Η επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Δέσποινα Μαυρογιάννη, Μοριακή Βιολόγο του εργαστηρίου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, παράλληλα με τον Μαιευτήρα-Γυναικολόγο κ.Γεώργιο Παρτσινέβελο, Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Υπότροφο της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ. Ευχαριστώ θερμά και τους δυο για την πολύτιμη βοήθεια τους, όλα αυτά τα χρόνια, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος της εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Π. Δρακάκη και κ. Α. Ντόμαλη της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, οι οποίοι ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής δαπάνησαν χρόνο με το να διαβάσουν και να διορθώσουν την παρούσα εργασία.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Μονάδας της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα για την βοήθειά τους κατά την εκπόνηση των πειραμάτων στο εργαστήριο.

Θερμές ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να απευθύνω στη συνάδελφο Βιολόγο κ. Αθηνά Κούτση για την καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε και το αμέριστο

ενδιαφέρον και υποστήριξη, τα οποία στάθηκαν καταλυτικά για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου, τους γονείς μου, τον αδερφό μου, τον συζυγο και τα παιδιά μου γιατί στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια και με στήριζαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός

Η παρούσα πειραματική ερευνητική εργασία προσανατολίζεται στις ενδιάμεσες επιδράσεις που έχει η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη TSH και η θυρεοειδική ορμόνη T₃ στην ωοθυλακική ανάπτυξη και συγκεκριμένα στην ωρίμαση ωαρίων ποντικού.

Υλικά και μέθοδος

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των TSH (1 μg/ml, 0,5 μg/ml και 0,1 μg/ml) και T₃ (10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M και 10⁻⁷ M) ενώ ως υλικό για την αξιολόγηση της επίδρασης των υπό εξέταση ορμονών επιλέχθηκαν τα ωάρια πρόφασης I (GV) ποντικού. Συγκεκριμένα, άνηβα θήλεα υβρίδια ηλικίας 2-3 εβδομάδων θυσιάστηκαν για την απομόνωση και καλλιέργεια *in vitro* ωαρίων πρόφασης I. Μετά τη διάνοιξη της περιτοναϊκής κοιλότητας, οι ωοθήκες αναγνωρίζονταν, εκτέμνονταν και μεταφέρονταν σε καλλιεργητικό υγρό. Τα ωάρια πρόφασης I απομονώνονταν με μηχανικό διαχωρισμό με τη χρήση λεπτής βελόνας «ινσουλίνης» υπό το στερεοσκόπιο. Εκτελέστηκε μία σειρά πειραμάτων, σε καθένα από τα οποία τα ωάρια που απομονώνονταν τοποθετούνταν τυχαιοποιημένα σε 7 ομάδες για βραχείας διάρκειας καλλιέργεια (Ομάδα ελέγχου [Control], Ομάδα TSH 2 mIU/ml [1 μg/ml], Ομάδα TSH 1 mIU/ml [0,5 μg/ml], Ομάδα TSH 0,2 mIU/ml [0,1 μg/ml], Ομάδα T₃ 10⁻⁹ M, Ομάδα T₃ 10⁻⁸ M, Ομάδα T₃ 10⁻⁷ M). Την επόμενη ημέρα αξιολογούνταν και καταγράφονταν η ωρίμαση των ωαρίων από το στάδιο της πρόφασης I σε εκείνο της μετάφασης II με την έξοδο του πρώτου πολικού σωματίου.

Αποτελέσματα

Τα πειραματικά μας αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προσθήκη της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH στο καλλιεργητικό μέσο σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν έχει καμία επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων, όπως αυτή αξιολογείται από την παρατήρηση της μετάβασης στο στάδιο του πολικού

σωματίου (μετάφαση II). Όσον αφορά την εκτίμηση του ποσοστού των ωοθυλακίων που φτάνουν στο στάδιο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (μετάφαση I), φάνηκε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ επέδρασε θετικά και «ώθησε» τα ωοθυλάκια να φτάσουν στο επόμενο στάδιο και μάλιστα με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας TSH 1 $\mu\text{g/ml}$.

Σχετικά με την επίδραση της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στα δυο διακριτά μορφολογικά στάδια ωρίμασης των ωαρίων, μετάφασης II και μετάφασης I, η T3 στην ενδιάμεση συγκέντρωση 10^{-8}M είχε ευεργετική επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων πρόφασης I σε ωάρια μετάφασης II. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο ποσοστό των ωαρίων που έφτασαν στο στάδιο της μετάφασης I με το ποσοστό της ομάδας T3 10^{-8}M να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο συγκρινόμενο με το ποσοστό της ομάδας ελέγχου και με τάση στατιστικής σημαντικότητας υψηλότερο συγκρινόμενο με τα ποσοστά των ομάδων T3 10^{-7}M και T3 10^{-9}M . Η θετική αυτή επίδραση της T3 δεν φάνηκε να εξακολουθεί στη μετάβαση από το στάδιο μετάφασης I στο στάδιο μετάφασης II, με παρόμοια ποσοστά μετάφασης II τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις T3.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα των σχετικών μελετών διαφέρουν μεταξύ τους με κάποιες εξ'αυτών να συντάσσονται με τα δικά μας αποτελέσματα και άλλες να αντιτάσσονται σε αυτά. Ως γνωστό, ακόμη και η διαπίστωση της απουσίας επίδρασης του υπό μελέτη παράγοντα στην ωρίμαση, δεν δύναται να αποκλείσει την επίδραση σε άλλες λειτουργίες του ωοκυττάρου απαραίτητες για τα μετέπειτα στάδια της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Για παράδειγμα, είναι πιθανόν το mRNA των υποδοχέων της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και των θυρεοειδικών ορμονών και τα συνοδά πρωτεϊνικά προϊόντα να αποθηκεύονται στο ωοκύτταρο και να καθίστανται λειτουργικά μονάχα στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης. Οι αντικρουόμενες αναφορές για την επίδραση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και των θυρεοειδικών ορμονών στην ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμαση στα διάφορα

είδη ζώων, πιθανόν να απορρέουν από εγγενείς ιδιομορφίες της ωοθυλακιογένεσης μεταξύ των διαφόρων ειδών, ενώ προκειμένου για το ίδιο είδος, πιθανόν να αποδίδονται σε διαφορές του πειραματικού σχεδιασμού. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ανοίγουν νέους ορίζοντες έρευνας για την επίδραση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της θυρεοειδικής ορμόνης T3 και ίσως και της T4 σε διάφορους συνδυασμούς μεταξύ τους, στην ωοθυλακιογένεση, σε συνθήκες που προσομοιάζουν στη φυσιολογία της ωοθυλακικής ανάπτυξης, με δεδομένο ότι οι ορμόνες αυτές *in vivo* συνυπάρχουν στην κυκλοφορία, αλλά και στο ωθυλακικό υγρό, που αποτελεί το μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων.

ABSTRACT

Aim

The aim of the study was to investigate the intermediate effects of Thyrotropin (TSH) and Thyroid hormone Triiodothyronine (T3) in *in vitro* maturation of mouse oocytes.

Materials and Methods

In the present study we utilised three distinct concentrations of TSH (1 µg, 0.5 µg/ml and 0.1 µg/ml) as well as T3 (10^{-9} M, 10^{-8} M and 10^{-7} M) and we evaluated the effects of those hormones on short term *in vitro* culture of prophase I (GV) mouse oocytes. In particular, immature pre-pubertal hybrid female mice 2-3 weeks old were sacrificed and the ovaries were surgically removed via laparotomy. and transferred to culture medium. Prophase I oocytes were mechanically dissected using an insulin syringe under the stereoscopic microscope and cultured *in vitro*. We performed a series of experiments through which prophase I oocytes were randomly assigned in 7 experimental groups for short-term culture (Control Group, Group TSH 2 mIU/ml [1 µg/ml], Group TSH 1 mIU/ml [0.5 µg/ml], Group TSH 0.2 mIU/ml [0.1 µg/ml], Group T3 10^{-9} M, Group T3 10^{-8} M, Group T3 10^{-7} M). The day after we assessed the maturation of prophase I oocytes to metaphase II ones with the extrusion of the first polar body.

Results

The results indicate that the addition of thyrotropin hormone (TSH) in the culture medium has no effect on *in vitro* maturation of prophase I oocytes, evaluated as their transition to metaphase II with the extrusion of the first polar body (metaphase II). As far as the percentage of prophase I oocytes reaching the germinal vesicle breakdown (metaphase I) stage is concerned, it seems that the higher concentration TSH 1 µg/ml had a positive effect and 'pushed' the follicles to move to the next level of maturation. This effect was statistically significant with respect to the control group.

Regarding the effects of Triiodothyronine (T3) in the two discrete oocyte morphological maturation stages, metaphase I and metaphase II, the intermediate concentration (10^{-8} M), affected positively the maturation from metaphase I to metaphase II. Similar results were observed in the percentage of prophase I oocytes reaching metaphase I, with the group of T3 10^{-8} M showing statistically significant higher percentage with respect to the control group and a trend towards statistically significant higher percentage with respect to the groups of T3 10^{-7} M and T3 10^{-9} M. The positive effect of T3 was not subsequently observed with regards to the transition from metaphase I to metaphase II, and similar percentages of metaphase II oocytes were seen in the control group and the groups of the three distinct T3 concentrations.

Discussion-Conclusion

In the literature, the findings of relevant studies seem to be highly different with some of them being in accordance with our results and others claiming opposing outcomes. Notwithstanding, it is worth noting that the absence of an effect on oocyte maturation cannot exclude the possibility of subtle modifications in other functions of the oocytes, which are considered crucial for the following stages of fertilisation and embryo development.

For example, it is possible the mRNA of the receptors of thyrotropin hormone and thyroid hormones together with the related proteins, are stored in the oocyte and become functional only in the later stages of development. The contradictory results regarding the effects of thyrotropin hormone and thyroid hormones in the ovarian follicle development and oocyte maturation in different species, might be a result of native differences in the processes of folliculogenesis. When investigating only one species, the differences in the experimental procedures may result in highly variable conclusions.

Overall, the findings of the present study open new research opportunities regarding the effects of thyrotropin hormone TSH and thyroid hormone T3 and possibly T4, in difference combinations, on folliculogenesis under conditions, which mimic the physiology of the ovarian follicle development, given that those hormones can be found, *in-vivo*, not only in the bloodstream but also in the follicular fluid; the actual microenvironment of the ovarian follicles.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, γνωστή και ως θυρεοτροπίνη (TSH), είναι μια γλυκοπρωτεΐνη. Η TSH συντίθεται στα βασεόφιλα θυρεοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την ενδοκρινική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Συγκεκριμένα, δρα στον θυρεοειδή αδένα διεγείροντας την σύνθεση και απελευθέρωση των θυρεοειδικών ορμονών τετραϊώδοθυρονίνης ή θυροξίνης (T4) και τριϊώδοθυρονίνης (T3). Η σημαντικότητα της ρύθμισης των ορμονών T3 και T4 βασίζεται στον διευρυμένο ρόλο τους στη ρύθμιση του μεταβολισμού.

Η δράση της TSH έχει την αφετηρία της στην σύνδεσή της μέσω ενός ειδικού υποδοχέα, του TSHR. Ο TSHR είναι μέλος της υπεροικογένειας των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονικών υποδοχέων (GpHR, Glycoprotein Hormone Receptors). Η έκφραση του TSHR δεν περιορίζεται στον θυρεοειδικό ιστό, καθώς εκφράζεται επίσης στον οπισθοκογχικό, στον λιπώδη ιστό, στους ινοβλάστες και στις γονάδες. Ανάλογες θέσεις υψηλής συγγένειας της TSH έχουν εντοπιστεί στον λιπώδη ιστό και στα λεμφοκύτταρα.

Η βιολογική δράση των θυρεοειδικών ορμονών, T3 και T4, επιτυγχάνεται με τη σύνδεσή τους με ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς, τους TR (Thyroid Hormone Receptors), οι οποίοι διακρίνονται στους TR α και TR β . Οι TR έχουν την ιδιότητα να δρουν άμεσα συνδεδεμένοι με το DNA του κυττάρου και να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων- στόχων, όπως άλλωστε όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς. Για το λόγο αυτό, ταξινομούνται στους μεταγραφικούς παράγοντες. Οι πυρηνικοί υποδοχείς συμμετέχουν στην ομοιοστασία, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό ελέγχοντας τους μηχανισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, αλλά και εκείνους της κυτταρικής επιβίωσης και απόπτωσης (1,2).

Στο πλάσμα του αίματος, οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι δεσμευμένες με πρωτεΐνες. Μόνο 0,3% της T3 και 0,03% της T4 κυκλοφορούν «ελεύθερες», μη συνδεδεμένες με λευκώματα. Το «ελεύθερο», μη συνδεδεμένο με λευκώματα κλάσμα τους καθορίζει τη βιολογική τους δραστηριότητα. Η T3 παράγεται από τον θυρεοειδή αδένα, ωστόσο το μεγαλύτερο μέρος της στον οργανισμό (>80%) σχηματίζεται περιφερειακά (εξωθυρεοειδικά) από αποϊώδωση της θυροξίνης.

Δεδομένης της δεκαπλάσιας δραστηριότητας της T3 σε σχέση με την T4, το ελεύθερο κλάσμα της T3 αποτελεί το σημαντικότερο τελικό προϊόν του θυρεοειδούς αδένου.

Η κύρια λειτουργία της T3 είναι η αύξηση του ρυθμού του βασικού μεταβολισμού. Διεγείρει την παραγωγή πρωτεϊνών αυξάνοντας έτσι τον ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού τόσο στην εμβρυϊκή ζωή όσο και στην παιδική ηλικία. Η T3 δρα στους πνεύμονες, συμμετέχει στη σωστή ανάπτυξη των οστών και στην ομαλή ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος συμβάλλοντας στην ανάπτυξη των νεύρων, της μυελίνης και των νευροδιαβιβαστών (3). Επιπλέον, η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Thyroid stimulating hormone (TSH) και οι θυρεοειδικές ορμόνες (T3 και T4), καθώς και η αυξητική ορμόνη (GH), ο ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας I (IGF-1) και η προλακτίνη (PRL) συμμετέχουν στην ανάπτυξη και ωρίμαση των ωαρίων, στην γονιμοποίηση και στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (4,5).

Προκειμένου να γίνει η γονιμοποίηση ενός ωαρίου, θα πρέπει απαραίτητως να έχει προηγηθεί η ωρίμαση του. Τα ώριμα ωάρια είναι απλοειδή, καθώς έχουν ολοκληρώσει τη μειωτική διαίρεση με αποτέλεσμα να έχουν 23 χρωμοσώματα. Τα ανώριμα ωάρια είναι δυνατό σε εργαστηριακές συνθήκες να ολοκληρώσουν την διαδικασία της ωρίμασής τους (*in vitro* maturation, IVM) και μετά να γονιμοποιηθούν.

Η ολοκλήρωση της ωρίμασης του ωαρίου απαιτεί πολλές διεργασίες στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Κατά την ωρίμαση, τα ωάρια περνούν διαδοχικές μορφολογικές αλλαγές, από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (Germinal vesicle, GV), που αντιστοιχεί στην πρόφαση I, στη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (Germinal vesicle breakdown, GVBD), που αντιστοιχεί στη μετάφαση I, και από εκεί στο στάδιο του πολικού σωματίου (Polar body, PB), που αντιστοιχεί στη μετάφαση II.

Η επίδραση των ορμονών που προαναφέρθηκαν, και ειδικότερα των TSH, T3 και T4, διαφοροποιείται ανάλογα με το στάδιο ωρίμασης του ωαρίου. Η βαθιά γνώση των μηχανισμών της δράσης τους στην λειτουργία των ωαρίων, σε συνάρτηση με το στάδιο ωρίμασής τους θα επιτρέψει την σωστότερη

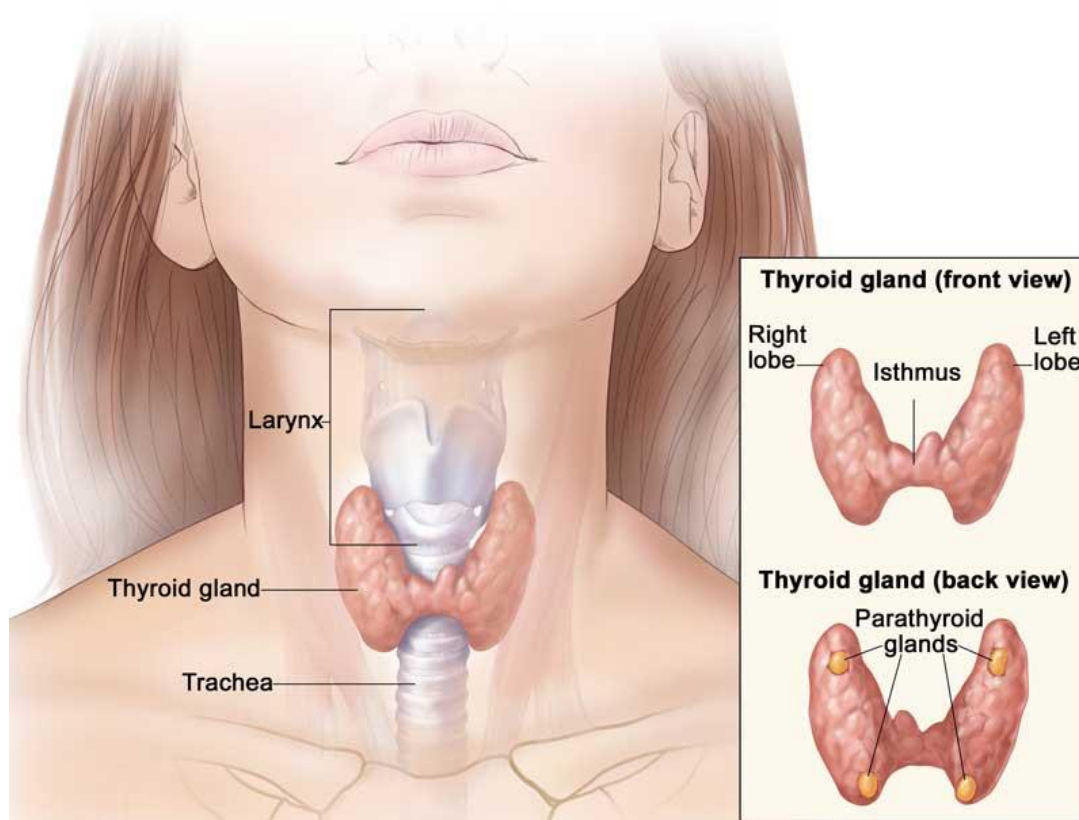
καθοδήγηση και αντιμετώπιση των γυναικών με ορμονικές διαταραχές, που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, αλλά και την αποτελεσματικότερη *in vitro* ωρίμαση τους κατά τις διαδικασίες ωθηκικής διέγερσης και εξωσωματικής γονιμοποίησης. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία προσανατολίστηκε τόσο στην βιβλιογραφική ανασκόπηση, όσο και στην πειραματική διερεύνηση της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην *in vitro* ωρίμαση (IVM) ωαρίων πρόφασης I ποντικού.

B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ, ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ

B.1.A. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας στο ανθρώπινο σώμα, και εντοπίζεται στον τράχηλο κάτω από τους θυρεοειδικούς κρικοειδείς χόνδρους. Οι αδένας είναι δίοβος και βρίσκεται προσκολλημένος στην πρόσθια πλευρά της τραχείας με τη βοήθεια χαλαρού συνδετικού ιστού. Μορφολογικά, ο θυρεοειδής αδένας είναι μαλακός, έχει σχήμα ασπίδας, χρώμα ερυθρόφαιο και ζυγίζει περίπου 20 γρ. Οι δύο λοβοί ενώνονται μεταξύ τους μέσω του ισθμού. (Εικόνα 1), ο οποίος βρίσκεται κάτω από τον κρικοειδή χόνδρο. Από τον ισθμό συχνά εκφύεται ένα τρίτος μικρός λοβός, ο πυραμοειδής. Το ερυθρόφαιο χρώμα του θυρεοειδή οφείλεται στην πλούσια αγγείωση του, καθώς η αιμάτωσή του ανά λεπτό είναι περίπου πενταπλάσια από το βάρος του. Η αιμάτωση μάλιστα του θυρεοειδούς αδένα, μαζί με εκείνη του φλοιού των επινεφριδίων, είναι τόσο μεγάλη όσο καμιάς άλλης περιοχής του σώματος (5,6,7).



Εικόνα 1: Μορφολογία και εντόπιση θυρεοειδή αδένα στο σώμα. Πηγή: <http://www.thyroid.com.au/>

Στον θυρεοειδή αδένα παρατηρούνται κάποιες ασυμμετρίες ανάμεσα στους λοβούς, ανάλογα με την ηλικία και με το φύλο. Το σχετικό μέγεθος του δεξιού λοβού είναι συνήθως μεγαλύτερο από του αριστερού. Επιπλέον, παρατηρείται φυλετικός διμορφισμός, καθώς ο θυρεοειδής αδένας είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Τέλος, στις γυναίκες το μέγεθός του βρίσκεται μεγαλύτερο στην εφηβεία, την κύηση, τη γαλουχία και το τέλος του καταμήνιου κύκλου.

Η λειτουργική μονάδα του θυρεοειδούς αδένα είναι το θυλάκιο, καθώς συνθέτει και αποθηκεύει θυροξίνη (T4) και τριιωδοθυρονίνη (T3). Ο θυρεοειδής αποτελείται από χιλιάδες τέτοια θυλάκια. Κάθε θυλάκιο έχει διάμετρο περίπου 30 μm και είναι αδρά σφαιρικό. Από την παρατήρηση ιστολογικών παρασκευασμάτων, φαίνεται ότι τα θυλάκια επενδύονται από κυβοειδές έως κυλινδρικό επιθήλιο σε απόκριση στην έκκριση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) από την υπόφυση, διατάσσονται σε συστοιχίες και εμπεριέχουν το λεγόμενο κολλοειδές και λυσοσώματα. Το κολλοειδές αποτελείται κυρίως από θυρεοσφαιρίνη, η οποία είναι γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιώδιο και αποτελεί πρόδρομη μορφή των ενεργών θυροειδικών ορμονών T3 και T4 (9,10). Επιπλέον, στο θυρεοειδή αδένα γίνεται η σύνθεση και η έκκριση της θυρεοκαλσιτονίνης (καλσιτονίνης) από τα παραθυλακιώδη κύτταρα C, τα οποία βρίσκονται ανάμεσα στα θυλάκια. Η καλσιτονίνη συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου, καθώς επάγει την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά, μειώνοντας παράλληλα τα επίπεδά του στον ορό (11).

Ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του θυρεοειδούς αδένα είναι το ιώδιο, το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της σύνθεσης των θυροειδικών ορμονών. Η συγκέντρωσή του ρυθμίζεται από το ίδιο το μόριο του ιωδίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο θυρεοειδής περιέχει οργανικές ενώσεις ιωδίου, οι οποίες αντιστοιχούν σε περίπου 10.000 μg, ενώ οι καθημερινές απαιτήσεις σε ιώδιο είναι μόνο 200 μg περίπου (13).

Ο ρόλος του θυρεοειδή αδένα βασίζεται στη σύνθεση, στην αποθήκευση και στην έκκριση της θυροξίνης (T4), της τριιωδοθυρονίνης (T3), της καλσιτονίνης και της μη βιολογικά ενεργής ανάστροφης τριιωδοθυρονίνης (rT3). Από το σύνολο των εκκρινόμενων ορμονών, το μεγαλύτερο μέρος

καταλαμβάνει η T4, ωστόσο αυτή γίνεται βιολογικά δραστική μετά την αποϊωδίωση της σε T3. Πιο συγκεκριμένα, μόνο το 20% της T3 στο αίμα προέρχεται άμεσα από τον θυρεοειδή, ενώ όλη η υπόλοιπη προέρχεται έμμεσα από την ενζυμική αφαίρεση ενός ιωδίου από την T4 στους νεφρούς και στο ήπαρ (12). Τα θυλακιώδη κύτταρα ελέγχονται από την έκκριση της θυρεοτροπίνης (TSH), που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η έκκριση της TSH με τη σειρά της υπόκειται στον έλεγχο του υποθαλαμικού παράγοντα TRF (Thyrotropin-Releasing Factor) ή TRH (Thyrotropin Releasing Hormone).

B.1.B. ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ (TSH) ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ TSH-R

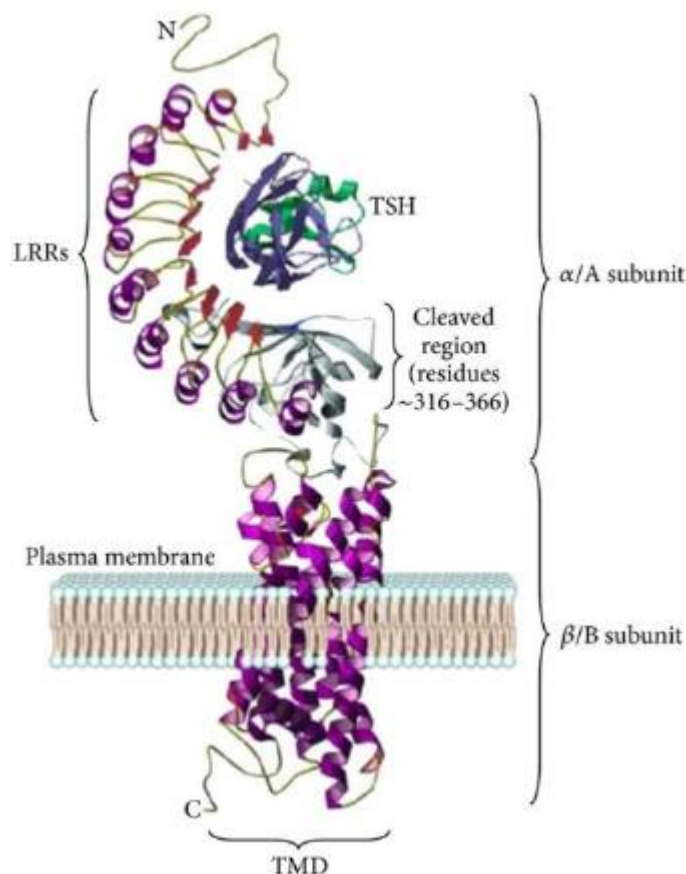
Ο θυρεοειδής αδένας είναι η τελική εκτελεστική συνιστώσα ενός κλασικού πρόσθιου υποθαλαμο-υποφυσιο-περιφερικού αδενικού άξονα. Κύριος διεγέρτης της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών είναι η θυρεοτροπίνη ή θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH). Η TSH συντίθεται στα θυρεοτρόπα κύτταρα της αδενούπόφυσης, που καλούνται β2-κύτταρα. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο πεπτιδικές υπομονάδες, την α και τη β (13).

Η υπομονάδα α είναι κοινή για όλες τις αδενούποφυσιακές γλυκοπρωτεΐνες. Απαντάται τόσο στην ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) όσο και στην ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) και στην ωοθυλακιότροπο ορμόνη (FSH). Η πρωτεϊνική αλληλουχία της υπομονάδας α αποτελείται από 92 αμινοξέα. Αυτή η περιοχή θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της αδενυλκυκλάσης, η οποία όταν έχει την ενεργό μορφή της προάγει τη βιοσύνθεση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Η υπομονάδα β, αποτελείται από 118 αμινοξέα και ευθύνεται για την ειδική αναγνώριση και πρόσδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της TSH-R (Thyroid Stimulation Hormone Receptor).

Η σύνθεση και η έκκριση της TSH ρυθμίζεται από τον μηχανισμό της αρνητικής ανάδρασης των θυρεοειδικών ορμονών, που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Με την αύξηση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών, μειώνεται η έκκριση της TSH και η μείωση αυτή με τη σειρά της επάγει τη

μείωση της έκκρισης των T4 και T3. Επίσης, η ρύθμιση της σύνθεσης και έκκρισης της TSH επιτελείται και από την TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), το οποίο είναι ένα ειδικό εκλυτικό τριπεπτίδιο που παράγεται στον υποθάλαμο και μεταφέρεται στην υπόφυση. Εκεί, συνδέεται με μεμβρανικούς υποδοχείς στα θυρεοτρόπα κύτταρα και αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και του ασβεστίου (Ca^{++}) (10,13). Τοπικά, η έκκριση της TSH μπορεί να ανασταλλεί από ουσίες, όπως η ντοπαμίνη και η σωματοστατίνη.

Η δράση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH ασκείται μέσω ειδικού υποδοχέα, του TSHR, ο οποίος έχει μια μεγάλη αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή (α ή A υπομονάδα) πλούσια σε λευκίνη (LRR, Leucine-rich repeats), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια καρβοξυτελική ενδοκυττάρια περιοχή (β ή B υπομονάδα) (Εικόνα 2). Ο υποδοχέας αυτός ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων που ονομάζονται συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs, G-protein-Coupled Receptors) και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονικών υποδοχέων (GpHR, Glycoprotein Hormone Receptors). Στην ίδια υποοικογένεια ανήκουν και οι υποδοχείς των γοναδοτροπινών FSH και LH (14).



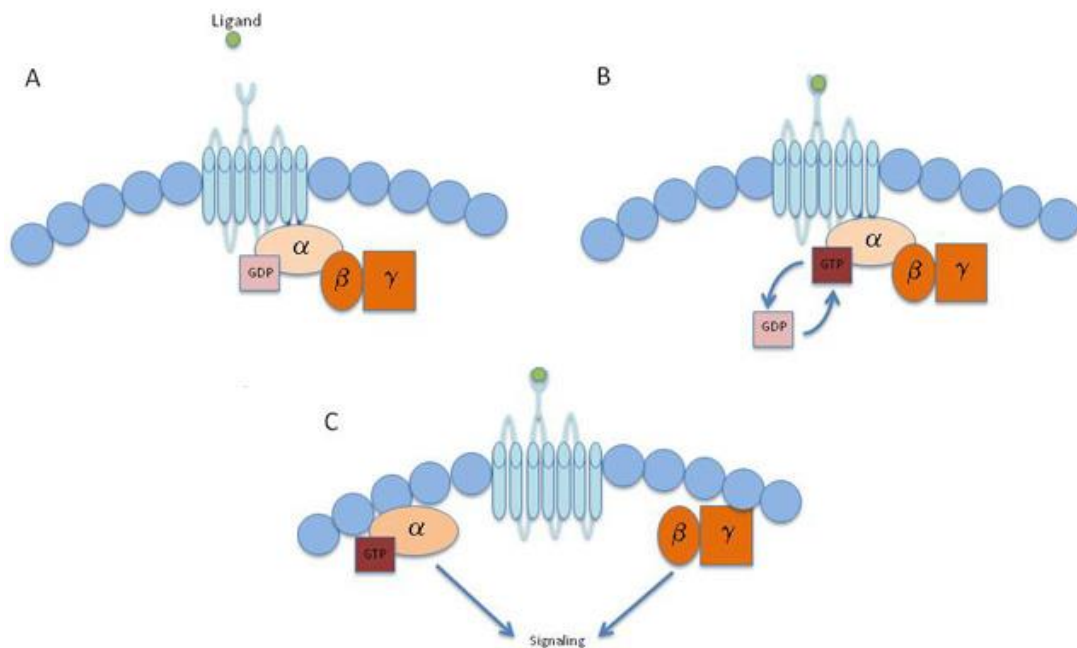
Εικόνα 2: Δομή του TSHR και η πρόσδεσή του με την TSH (14).

Οι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs) είναι από τις μεγαλύτερες ομάδες επιφανειακών υποδοχέων και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Οι υποδοχείς αυτοί λόγω των 7 ελίκων περιέλιξης της δομής τους, που παρομοιάζεται με τη μορφή της σερπαντίνας, ονομάζονται και επταδιαμεμβρανικοί χωροϋποδοχείς (7TM). Οι περισσότερες λειτουργίες των υποδοχέων αυτών επιτελούνται μέσω των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών, οι οποίες είναι μεγάλου μοριακού βάρους και μεταδίδουν το σήμα από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ενεργοποίηση ενός GPCR μέσω της πρόσδεσης ενός προσδέτη στο εξωκυτταρικό τμήμα του οδηγεί στην ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών. Αυτές, στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με διάφορα μόρια, οδηγώντας σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες (14).

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ξεκινά με τη σύνδεση του με την αντίστοιχη ορμόνη, TSH. Από εκεί και πέρα, ενεργοποιείται το σύστημα της G πρωτεΐνης. Κάθε μία G πρωτεΐνη παρουσιάζει ειδίκευση σε μια συγκεκριμένη

ομάδα υποδοχέων και ενδοκυττάρων πρωτεϊνών-στόχων. Ωστόσο, η δομή των G-πρωτεϊνών είναι συντηρημένη και έχουν όλες παρόμοιο μηχανισμό δράσης. Η κάθε G-πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες (α, β και γ).

Σε κατάσταση ηρεμίας, η υπομονάδα α είναι συνδεδεμένη με ένα μόριο GDP (Guanosine-di-phosphate). Μετά την πρόσδεση ενός εξωκυττάρου συνδέτη (ligand) στον υποδοχέα, η G-πρωτεΐνη ενεργοποιείται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ελεύθερη διάχυση κατά μήκος της μεμβράνης μιας ενεργοποιημένης υπομονάδας α, η οποία συνδέεται με ένα μόριο GTP (Guanosine-tri-phosphate), και του συμπλόκου των υπομονάδων β και γ. Τα μόρια αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με στόχους, οι οποίοι με τη σειρά τους μεταδίδουν το σήμα και συντελούν στην αλλαγή του κυτταρικού μεταβολισμού και της έκφρασης των γονιδίων ως απόκριση στην σύνδεση του μηνυματοφόρου μορίου με τον υποδοχέα G. Η υπομονάδα α διαθέτει εγγενή ενεργότητα υδρολάσης του GTP (GTPάσης) και, επομένως μετά την πάροδο ενός χρονικού διαστήματος Δt , το GTP υδρολύεται σε GDP. Ακολουθεί η επανασύνδεση με το σύμπλοκο β-γ, οπότε η μεταβίβαση σήματος σταματά (Εικόνα 3) (15,16).



Εικόνα 3: Πρόσδεση G-πρωτεΐνης στον GPCR υποδοχέα της. Στην μη ενεργή μορφή, η α-υπομονάδα της G-πρωτεΐνης προσδένεται σε GDP και σε ένα β-γ σύμπλοκο (A). Μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον προσδέτη του, εκτελείται ανταλλαγή GDP με GTP (B). Στην ενεργή μορφή, η G-πρωτεΐνη προσδεμένη με την α-υπομονάδα και GTP και το β-γ σύμπλοκο χωριστά ενεργοποιούν άλλα μόρια με μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Πηγή: www.nature.com

Ο υποδοχέας της TSH εκφράζεται όχι μόνο στο θυρεοειδικό ιστό αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός, οι ινοβλάστες, οι γονάδες (ωκύτταρα και σπερματοδόχοι κύστεις) (16,17). Μελέτες που έχουν γίνει σε θηλαστικά δείχνουν διασταυρούμενη ενεργοποίηση του υποδοχέα από τη χοριακή γοναδοτροπίνη και την ωχρινοτρόπο ορμόνη (16,18).

B.1.Γ. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ (T3, T4) ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ TRa και TRb

Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι μοναδικά μόρια ως προς το γεγονός ότι ενσωματώνουν ένα ανόργανο στοιχείο, το ιώδιο, σε μια οργανική δομή που είναι συγκροτημένη από δύο μόρια του αμινοξέος τυροσίνη. Η θυρεοειδική λειτουργία είναι συνυφασμένη με το μεταβολισμό του ιωδίου. Το τελευταίο, προσλαμβάνεται από την τροφή και με την αιματική κυκλοφορία, φθάνει στο θυρεοειδή αδένα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.

Η σύνθεση ολοκληρώνεται σε στάδια, με αφετηρία την πρόσληψη και συμπύκνωση του ιωδίου στο θυρεοειδή αδένα. Στη συνέχεια, το ιώδιο οξειδώνεται και ενσωματώνεται στον φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης και, τέλος, γίνεται η σύζευξη δύο ιωδιωμένων μορίων τυροσίνης για να σχηματίσουν T4 και T3. Κατά την ιωδίωση της τυροσίνης παράγεται η μονοϊωδοτυροσίνη (MIT, Moniodotyrosine) και η διωδοτυροσίνη (DIT, Diiodotyrosine). Για την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας, απαιτούνται δύο κυτταρικές πρωτεΐνες, η θυρεοσφαιρίνη (TG, Thyroglobulin) και η θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO, Thyroid Peroxidase). (13,14).

Η Μονοϊωδοτυροσίνη και η Διωδοτυροσίνη είναι πρόδρομες ουσίες των θυρεοειδικών ορμονών. Η σύνδεση ενός μορίου DIT και ενός μορίου MIT οδηγεί στη σύνθεση της τριιωδοθυρονίνης T3, ενώ η σύνδεση δύο μορίων DIT οδηγεί στη σύνθεση της τετραϊωδοθυρονίνης ή θυροξίνης T4. Μετά την ιωδίωση της, η θυρεοσφαιρίνη αποθηκεύεται μέσα στα θυλάκια με τη μορφή κολλοειδούς. Η απελευθέρωση των συνδεδεμένων με πεπτιδικούς δεσμούς στο μόριο της θυρεοσφαιρίνης θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4 στην κυκλοφορία του αίματος απαιτεί την επανάκτηση της θυρεοσφαιρίνης. Οι MIT και DIT που απελευθερώνονται, αποϊωδιώνονται μέσα στο θυρεοειδή από το ένζυμο αποϊωδινάση. Το ιώδιο επαναχρησιμοποιείται επιτόπου για τη σύνθεση νέων θυρεοειδικών ορμονών. Αντίστοιχα, το ιώδιο που απελευθερώνεται κατά τον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών στους περιφερικούς ιστούς επαναπροσλαμβάνεται από το θυρεοειδή και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση νέων θυρεοειδικών ορμονών, ενώ ένα ποσοστό 20% των θυρεοειδικών ορμονών αποβάλλεται με τη χολή στα κόπρανα.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες T3 και T4 κυκλοφορούν στο αίμα, κυρίως συνδεδεμένες με πρωτεΐνες-φορείς, τη θυροξινοδεσμευτική σφαιρίνη, τη θυροξινοδεσμευτική προλευκωματίνη και τη λευκωματίνη. Τα τρία τέταρτα της T4 είναι συνδεδεμένα με την θυροξινοδεσμευτική σφαιρίνη, το 20% συνδέεται με τη λευκωματίνη και το υπόλοιπο 5% με τη θυροξινοδεσμευτική προλευκωματίνη. Οι μη συνδεδεμένες ποσότητες της T4, που αποτελούν τις βιολογικά δραστικές μορφές, αντιπροσωπεύουν το 0,04% της συνολικής T4 και το 0,4% της συνολικής T3. Στο ήπαρ και τους νεφρούς, η T4 μετατρέπεται στην ενεργό T3 με τα ένζυμα αποϊωδινάσες I & II και αδρανοποιείται μετατρεπόμενη στην ανάστροφη T3 (rT3) με το ένζυμο αποϊωδινάση III. Η T3 είναι 10 φορές πιο δραστική από την T4, και ως εκ τούτου αποτελεί το πιο σημαντικό τελικό προϊόν του θυρεοειδούς αδένος.

Η δράση των θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4 ασκείται μέσω ειδικών υποδοχέων, των TR (Thyroid Hormone Receptors), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς συνδέονται άμεσα με το DNA, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων στόχων. Έτσι, ανήκουν ταξινομικά στους μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτή η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, επιτυγχάνεται όταν ένας συνδέτης (ligand) συνδέεται με τον

πυρηνικό υποδοχέα, οδηγεί σε μια αλλαγή της δομής του, άρα, και στην ενεργοποίησή του. Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι σημαντικοί κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, στην διατήρηση της ομοιόστασης, στην αναπαραγωγή και στον μεταβολισμό (10,13).

Οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν μοριακό βάρος 50.000 ως 100.000 daltons και έχουν συγκεκριμένη δομή (Εικόνα 4) :

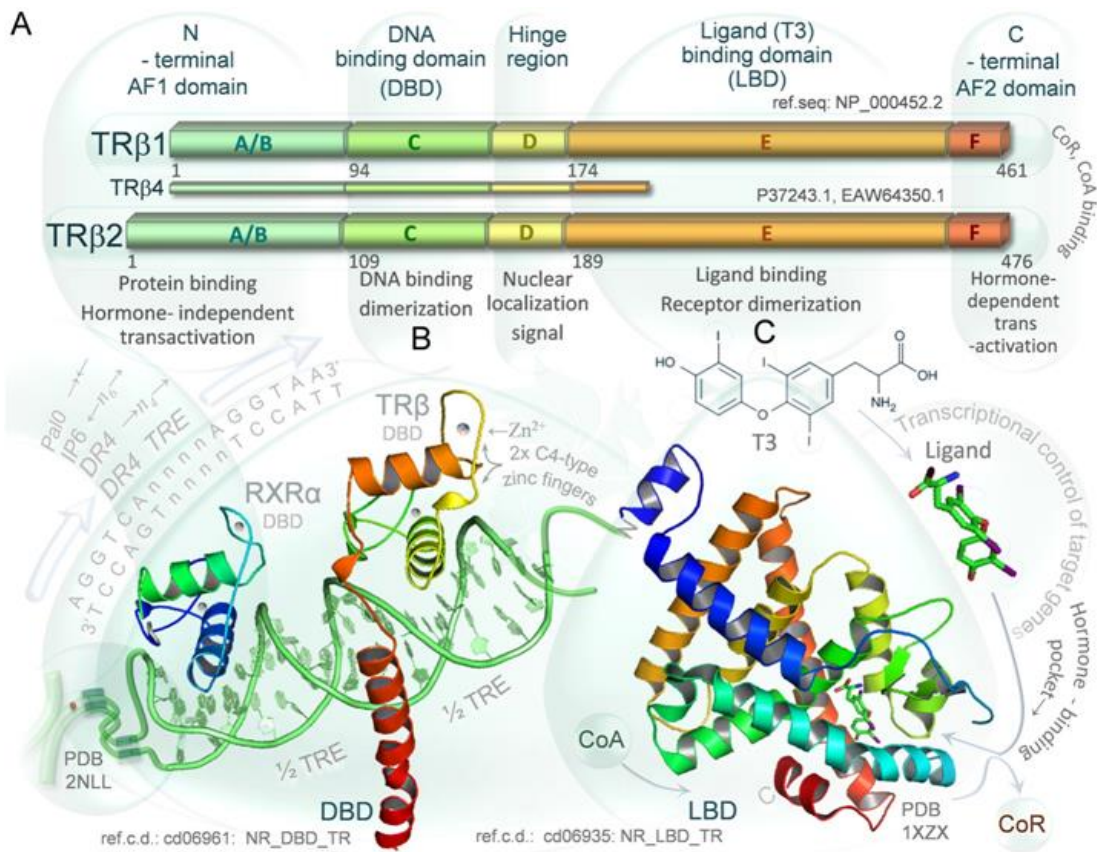
- A-B : Αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain) : Περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης 1 (AF-1), της οποίας η δράση είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του συνδέτη και δρα συνεργικά με την περιοχή ενεργοποίησης AF-2 που βρίσκεται στην περιοχή E. Η αμινοτελική περιοχή παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ διάφορων πυρηνικών υποδοχέων.
- C : Περιοχή σύνδεσης του DNA (DNA-binding domain, DBD) : περιοχή υψηλά συντηρημένη, που περιέχει δυο δακτύλους ψευδαργύρου, που συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται περιοχές ανταπόκρισης στην ορμόνη (hormone response elements, HRE).
- D : «Εύκαμπτη» περιοχή : συνδέει την περιοχή σύνδεσης του DNA (DBD) με την περιοχή σύνδεσης του συνδέτη (LBD).
- E : Περιοχή σύνδεσης του συνδέτη (Ligandbinding domain, LBD): Η περιοχή αυτή συνδέεται με πρωτεΐνες συνενεργοποιητές (co-activators) και πρωτεΐνες συγκαταστατολείς (co-repressors) και περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης AF-2, της οποίας η δράση εξαρτάται από την παρουσία του συνδέτη.
- F: Καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal domain): Παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διάφορων πυρηνικών υποδοχέων.

Υπάρχουν τέσσερις τύποι πυρηνικών υποδοχέων (type I-IV) και οι υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών ανήκουν στον τύπο II, στην υποοικογένεια ένα, μαζί με τον υποδοχέα των ρετινοειδών. Οι υποδοχείς τύπου II βρίσκονται στον πυρήνα και συνδέονται ως ετεροδιμερή με το DNA. Ο

υποδοχέας των θυρεοειδικών ορμονών TR επιτελεί σημαντικές λειτουργίες, ανάμεσα στις οποίες είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού και του καρδιακού ρυθμού, καθώς και η ανάπτυξη των οργανισμών. Οι TRs συνδέονται με συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων και αποτελούν στοιχεία ορμονικής απάντησης των θυρεοειδικών ορμονών (TRE, Thyroid Hormone Response Elements) (13).

Συνήθως η σύνδεση γίνεται σε ετεροδιμερή μορφή με τον υποδοχέα των ρετινοειδών-Χ (RXR, Retinoid-X-Receptors). Τα περισσότερα από τα TREs αναλαμβάνουν δράση επιτελώντας τη γονιδιακή μεταγραφή μόνο μετά τη σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και κάποια TREs τα οποία ενεργοποιούνται από μη συνδεδεμένους με την ορμόνη υποδοχείς.

Υπάρχουν 3 μορφές του υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών : alpha-1 (TR α), beta-1 (TR β 1) and beta-2 (TR β 2) που συνδέονται με τις θυρεοειδικές ορμόνες. Υπάρχουν δύο ισομορφές του υποδοχέα TR α που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *THRA* και δύο ισομορφές του TR β , που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *THRB* (Εικόνα 4). Οι υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών TR α και TR β αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, οι οποίοι μεταβιβάζουν σήματα των θυρεοειδικών ορμονών και κυρίως της T3.



Εικόνα 4: Στερεοχημική δομή και λειτουργική οργάνωση των TRβ πυρηνικών υποδοχέων.

Πηγή: <http://atlasgeneticsoncology.org>

Η γενετική μηχανική επιτρέπει την μελέτη των θυρεοειδικών υποδοχέων με τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων πειραματόζων με αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων. Έτσι, ομόζυγοι επίμυες με αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών TRβ1 και TRβ2 (TRβ^{-/-} knock-out mice), χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών και θυρεοειδοτρόπου ορμόνης. Επιπλέον, οι υποδοχείς TRβ θεωρούνται σημαντικοί για τη λειτουργία της ακοής.

Σε ότι αφορά τον υποδοχέα TRα-1, οι επίμυες που ήταν ομόζυγοι για την αποσιώπηση του γονιδίου του (TRα1^{-/-} knock-out mice) παρουσιάζουν καρδιακές αρρυθμίες και χαμηλή θερμοκρασία σώματος. Η σχέση του υποδοχέα TRα1 και της ισομορφής του TRα2 φαίνεται στον φαινότυπο των επίμυων που φέρουν ταυτόχρονα γονίδια για την αποσιώπηση και των δύο υποδοχέων, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μικρόσωμα ζώα, με εντερικές ανατομικές ανωμαλίες, υποπλαστικό θυρεοειδή αδένα, υποθυρεοειδισμό και μικρή διάρκεια ζωής, καθώς καταλήγουν μετά τον απογαλακτισμό τους.

Φυλετική διαφοροποίηση στην γονιμότητα, με γόνιμα αρσενικά και θηλυκά, που σπάνια έμεναν έγκυοι, τα οποία δεν κατάφερναν να ολοκληρώσουν την κύηση, παρατηρήθηκε στην περίπτωση των ομόζυγων επίμυων με απάλειψη των γονιδίων όλων των υποδοχέων των θυρεοειδικών ορμονών, TRα1, TRβ1 και TRβ2 (TRα1-/-β-/- knock-out mice). Σε *in vitro* πειράματα στις ωοθήκες έχουν εντοπιστεί υποδοχείς TR, όπως στα κοκκώδη κύτταρα του χοίρου και του ανθρώπου, στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells) και στα ωοκύτταρα (19).

B.1.Δ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ TSH ΚΑΙ T3, T4 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Οι θυρεοειδικές δυσλειτουργίες έχουν επίδραση στη γονιμότητα και στα δύο φύλα. Υπάρχει μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του θυρεοειδικού αδένος και των αναπαραγωγικών οργάνων, των όρχεων στους άνδρες και των ωοθηκών στις γυναίκες. Η παρουσία TR στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells) και στα ωοκύτταρα (19) αποτελεί ένδειξη για τη συμμετοχή της T3 στη διαδικασία ωρίμασης των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων. Ενδεχομένως, η T3 να συμμετέχει και σε άλλες λειτουργίες του ωοκυττάρου απαραίτητες για την επιτυχή γονιμοποίηση και πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Ο υποθυρεοειδισμός, κατά τον οποίον ο θυρεοειδής αδένος δεν παράγει επαρκή ποσότητα θυρεοειδικών ορμονών, επηρεάζει τη λειτουργία των ωοθηκών μειώνοντας τα επίπεδα της φυλοσυνδετικής σφαιρίνης (sex-hormone-binding-globulin, SHBG) και αυξάνει τα επίπεδα της προλακτίνης. Η προλακτίνη, εκτός από το ρόλο της στην παραγωγή του γάλακτος κατά το θηλασμό, επηρεάζει την ωορρηξία και τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, αναστέλλοντας την έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH (Follicle stimulating hormone) και της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). Τα υψηλά επίπεδα προλακτίνης, που συνοδεύουν τον υποθυρεοειδισμό, οδηγούν σε ανωοθυλακιωρρηξία ώστε η γυναίκα αδυνατεί να μείνει έγκυος. Επιπλέον, στους άνδρες, οι χαμηλές FSH και GnRH λόγω των αυξημένων επιπέδων προλακτίνης, μπορούν να εμποδίσουν την ωρίμαση του σπέρματος. Ακόμη απουσία

υπερπρολακτιναιμίας, ο υποθυρεοειδισμός διαταράσσει τη γονιμότητα, καθώς η T4 θεωρείται απαραίτητη για την επαρκή έκκριση οιστρογόνων και προγεστερόνης (20). Οι επανειλημμένες αποβολές στα θηλαστικά έχουν συνδεθεί με τον υποθυρεοειδισμό (21), καθώς ο θυρεοειδής εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την λειτουργία του ωχρού σωματίου. Επομένως, σε υποθυρεοειδικές μητέρες παρέχεται επαρκής υποστήριξη της ωχρινικής φάσης.

Από την άλλη, ο υπερθυρεοειδισμός (αυξημένη κυκλοφορία στο αίμα των θυρεοειδικών ορμονών), μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα σε μια γυναίκα όχι μόνο στην προσπάθεια της να μείνει έγκυος, αλλά και στη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλους κύκλους ή πλήρη απουσία εμμηνου ρύσεως. Στους άνδρες, ο υπερθυρεοειδισμός συνδέεται με μείωση της κινητικότητας του σπέρματος καθώς και αυξημένα επίπεδα μορφολογικά ανώμαλων σπερματοζωαρίων.

B2. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ, ΩΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ, ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

B.2.A. ΩΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Αρχικά, το γεννητικό σύστημα είναι πανομοιότυπο και στα δύο φύλα (αμφιφυλετική ή αδιαφοροποίητη φάση). Οι γονάδες δε μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους ως προς την εμφάνιση, παρόλο που μπορεί να υφίστανται ήδη κυτταρικές διαφορές και αποτελούνται από τρία είδη κυττάρων: κύτταρα του σπλαγχνικού επιθηλίου, του μεσεγγύματος και αρχέγονα γεννητικά κύτταρα.

Στον άνθρωπο, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται σε πρώιμο στάδιο της εμβρυικής ανάπτυξης. Εντοπίζονται ανάμεσα στα ενδοδερμικά κύτταρα, στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού κοντά στην αλλαντοΐδα. Στην αρχή της πέμπτης εβδομάδας της κύησης, μεταναστεύουν μέσω του ραχιαίου μεσεντερίου του οπίσθιου εντέρου στις αρχέγονες γονάδες με αμοιβαδοειδείς κινήσεις, όπου παραμένουν για μία εβδομάδα. Στη συνέχεια, εισχωρούν στους γεννητικούς κρημούς, όπου και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό και ωθούν στον πολλαπλασιασμό τα κύτταρα του μεσόνεφρου και του παρακείμενου κοιλωματικού επιθηλίου. Αυτό έχει σαν τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ζεύγους γεννητικών ταινιών, οι οποίες σχηματίζουν τις ωothήκες και τους όρχεις στα θηλυκά και αρσενικά έμβρυα, αντίστοιχα.

Όταν διαφοροποιηθεί σε θήλυ, το επιθήλιο του σπλαγχτικού κοιλώματος σχηματίζει τις γεννητικές δοκίδες, μεταξύ των οποίων εγκαθίστανται τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, που στην περίπτωση της ωothήκης είναι τα ωογόνια. Έτσι, η ωοθήκη αποτελείται από δύο μοίρες: τη μυελώδη μοίρα, που προέρχεται από το μεσέγγυμα και τη φλοιώδη μοίρα, που έχει προέλευση τα επιθηλιακά κύτταρα του σπλαγχτικού κοιλώματος. Αυτά περιβάλλουν τα ωογόνια, σχηματίζοντας τα αρχέγονα ωοθυλάκια (22).

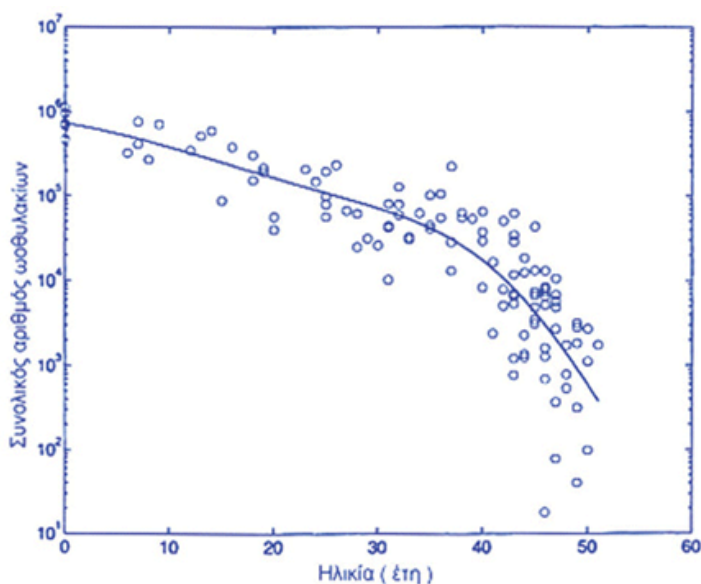
Στον άνθρωπο, η ωοθυλακιογένεση διαρκεί περισσότερο από 220 ημέρες ή οκτώ εμμηνορρυσιακούς κύκλους (23) και διακρίνεται σε τρία στάδια: α) την αρχική στρατολόγηση, που χαρακτηρίζεται από την διαρκή έναρξη της ωρίμασης των κατά τόπους αρχέγονων ωοθυλακίων, β) την κυκλική στρατολόγηση ή βασική ωοθυλακική ανάπτυξη και γ) την επιλογή και ωρίμαση του κυρίαρχου ή επικρατούντος ωοθυλακίου.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ωοθήκης, τα ωογόνια πολλαπλασιάζονται με ταχείες μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ παράλληλα αρχίζει η πρώτη μειωτική διαίρεση. Κατά την έκτη με έβδομη εβδομάδα, ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων είναι περίπου 10.000 ωογόνια και φτάνουν τα 600.000 κατά την όγδοη εβδομάδα. Από αυτή τη φάση της εμβρυϊκής ζωής ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων εξαρτάται από τις διεργασίες της μίτωσης, της μείωσης και της ατρησίας. Καθώς η μίτωση υπερισχύει, κατά την 20^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων μεγιστοποιείται, φτάνοντας περίπου τα 7 εκατομμύρια.

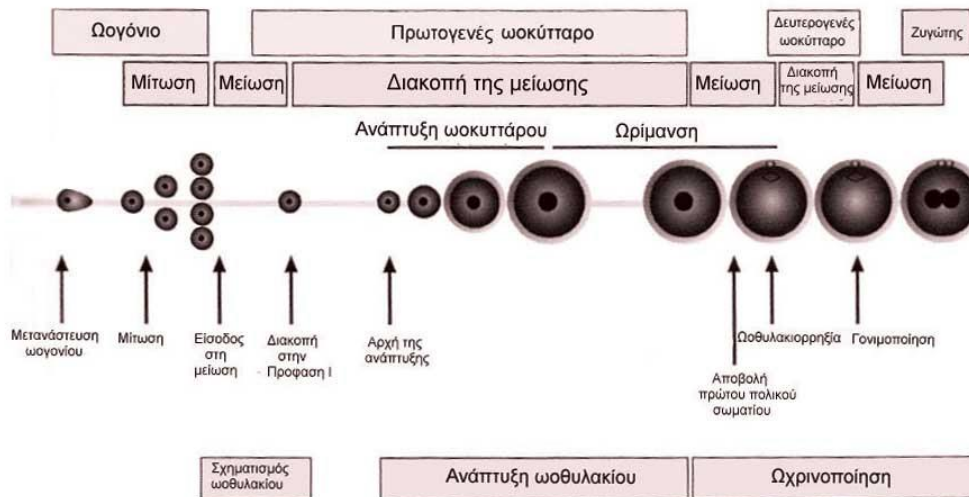
Κατά τον έβδομο μήνα της κύησης, σταματά η ατρησία των ωογονίων, οπότε όλα τα ωογόνια διαιρούνται μειωτικά και βρίσκονται στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλάκιου. Κατά τη γέννηση η ωοθήκη διαθέτει περίπου 1-2 εκατομμύρια γεννητικά κύτταρα. Ο αριθμός αυτός σταδιακά μειώνεται φτάνοντας τα 300.000-400.000 στην ήβη. Επομένως, σε μία ενήλικη γυναίκα 300-400 ωοθυλάκια αναμένεται να ωριμάσουν πλήρως και να φθάσουν σε ωοθυλακιορρηξία, καθώς έχει απωλέσει το 80% των γεννητικών κυττάρων της εμβρυϊκής ζωής. Κατά την εμμηνόπαυση, συνήθως κατά το 51^ο έτος ηλικίας, απομένουν περίπου 1.000 ωοθυλάκια, τα οποία σταδιακά εκφυλίζονται έως την ηλικία των 71 ετών (Εικόνα 5). Ο λόγος της αύξησης του ρυθμού της απόπτωσης δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ο μηχανισμός, που οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού της απόπτωσης πιθανόν συνδέεται με το ωογόνο, καθώς είναι ο βασικός ρυθμιστής της συνέχειας της πορείας του αρχέγονου ωοθυλακίου. Στο ωογόνο εκφράζονται γονίδια καθοριστικά για την εξέλιξη του ωοθυλακίου, όπως το σύστημα γονιδίων bcl 2, η ομάδα των BAX, το σύστημα σηματοδότησης Wnt, οι β κατενίνες, το σύστημα των κασπασών, BMP 4, και άλλοι παράγοντες.

Κατά την όγδοη εβδομάδα της κύησης αρχίζουν οι μειωτικές διαιρέσεις, οι οποίες διακόπτονται στο στάδιο της διπλοταινίας, δηλαδή στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Στο στάδιο αυτό, στα πρωτογενή ωοκύτταρα, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διατάσσονται σε ζεύγη. Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και πριν την ωοθυλακιορρηξία, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα. Στη συνέχεια, εκφυλίζεται το βλαστικό κυστίδιο και συνεχίζεται η μειωτική διαίρεση. Ακριβώς

πριν την ωοθυλακιορρηξία, αυξάνονται τα επίπεδα της ορμόνης LH, έχοντας σαν αποτέλεσμα την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης και την μετάβαση του πρωτογενούς ωοκυττάρου στο στάδιο του δευτερογενούς ωοκυττάρου ή ωαρίου (Εικόνα 6). Στην ωρίμαση τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατανέμονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Εξαιτίας της άνισης διαίρεσης του κυτταροπλάσματος, τα δύο θυγατρικά κύτταρα δεν είναι πανομοιότυπα. Το δευτερογενές ωοκύτταρο παραλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός αν γονιμοποιηθεί. Το άλλο κύτταρο, που προκύπτει, ονομάζεται πολικό σωματίο και περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, και τα δύο κύτταρα φέρουν ίση ποσότητα χρωμοσωμάτων, και συγκεκριμένα τον μισό αριθμό ομολόγων χρωμοσωμάτων.



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης του αριθμού ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας. Πηγή: <http://www.eugonia.com.gr/anthropini-anaparagogi>

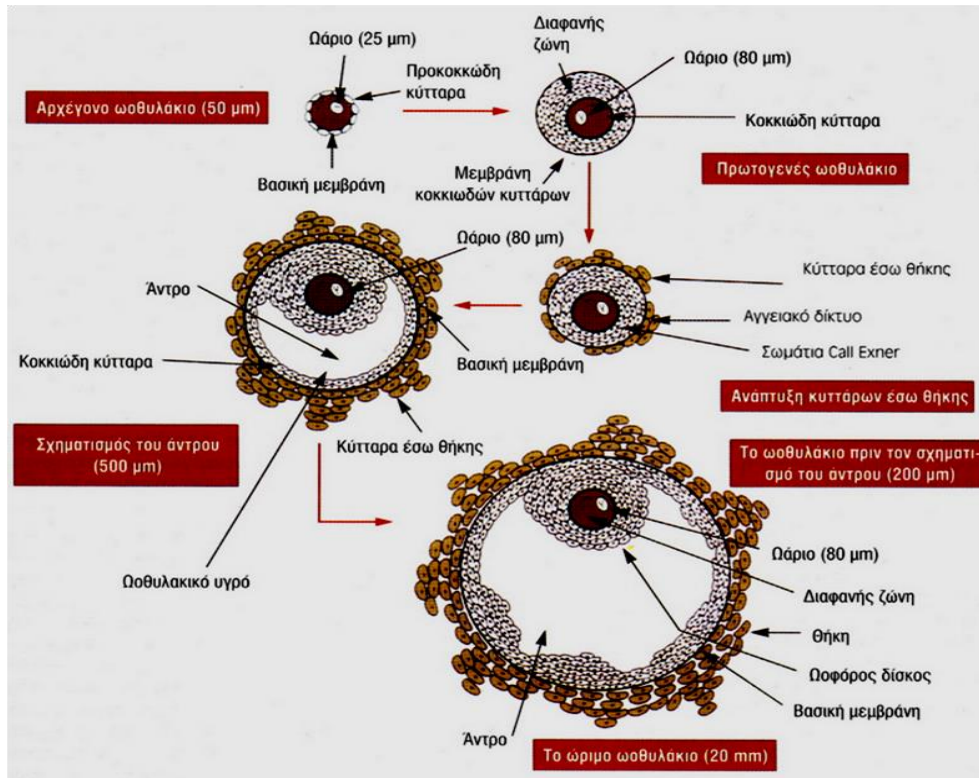


Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση της ανάπτυξης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου. Πηγή: <http://www.eugonia.com.gr/anthropini-anaparagogi>

Η ωοθήκη περιέχει διαφορετικού εξελικτικού σταδίου ωοθυλάκια. Ο κύκλος ζωής του ωοθυλακίου ακολουθεί τα εξής στάδια (22,24):

- *αρχέγονο ωοθυλάκιο:* διπλοειδές ωοκύτταρο στο στάδιο της Πρόφασης I. Χαρακτηριστικό περίβλημα με μία σειρά κοκκωδών κυττάρων και βασική μεμβράνη, που χωρίζουν το σύμπλεγμα ωαρίου - κοκκωδών κυττάρων από τον περιβάλλοντα ιστό. Σε αυτό το στάδιο αδράνειας παραμένουν όλα τα ωοθυλάκια μέχρι την εμμηναρχή, ενώ κάποια από αυτά μέχρι και λίγο πριν την εμμηνόπαυση.
- *πρωτογενές ωοθυλάκιο:* Πλήρως ανεπτυγμένο ωάριο, το οποίο περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη, από μία έως δύο στοιβάδες κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων και από τη βασική μεμβράνη γύρω από τα κοκκώδη κύτταρα.
- *δευτερογενές ωοθυλάκιο:* Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων καθώς και των κυττάρων της έσω και έξω θήκης του ωοθυλακίου. Η έσω θήκη του ωοθυλακίου χαρακτηρίζεται από επιθηλιοειδή διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία φέρουν υποδοχείς για την LH. Αντίστοιχοι υποδοχείς για την FSH, εκφράζονται σε αυτό στο στάδιο στα κοκκώδη κύτταρα. Σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο, δημιουργείται στο κέντρο του ωοθυλακίου μια κοιλότητα, το άντρο του ωοθυλακίου.

- *ωοθυλάκιο με πρώιμο άντρο*: το ωοθυλάκιο σε αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση τόσο των κοκκωδών (>10⁶) όσο και των κυττάρων της θήκης και από την εμφάνιση άντρου. Το πρώιμο άντρο περιέχει στεροειδή, πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες, πρωτεογλυκάνες και αυξητικούς παράγοντες. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων από το στάδιο σχηματισμού του πρώιμου άντρου μέχρι την ωοθυλακιορρηξία υπόκειται σε ενδοκρινολογικό έλεγχο, κυρίως από την FSH.
- *ώριμο ωοθυλάκιο με άντρο*: διαρκεί 2-3 μήνες και είναι αποτέλεσμα των έντονων πολλαπλασιαστικών και διαφοροποιητικών διεργασιών, που οδηγούν γρήγορα σε περισσότερο ώριμες μορφές, με μεγαλύτερο άντρο. Στην εξέλιξη και ρύθμιση αυτού του σταδίου συμμετέχουν οι γοναδοτροπίνες και τα στεροειδή. Από τη δεξαμενή των ώριμων ωοθυλακίων που θα προκύψουν, υπό την επίδραση της FSH θα ξεκινήσει η στράτευση του κύματος που θα εξελιχτεί μέσα σε ένα κύκλο προς την ωοθυλακιορρηξία. Πιο συγκεκριμένα, προς το τέλος της ωχρινικής φάσης κάθε κύκλου, υπό τη δράση της FSH, θα στρατευτεί ένα κύμα 5-6 ωοθυλακίων για εξέλιξη στον αμέσως επόμενο κύκλο. Από αυτό το κύμα ωοθυλακίων, ένα θα αποτελέσει το ώριμο ή γραφιανό ωοθυλάκιο (διάμετρος περί τα 20 mm).



Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής του ωοθυλακίου.

Σε κάθε κύκλο, ένα από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια ξεχωρίζει και αποτελεί το επικρατές ωοθυλάκιο. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας πραγματοποιείται εξέλιξη των ωοθυλακίων, η οποία εξαρτάται από την ύπαρξη τονικών επεισοδίων στις συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών. Στην αρχή του κάθε κύκλου αποκρίνεται στα επεισόδια αυτά μία ομάδα ωοθυλακίων, η οποία είναι βιοχημικά ωριμότερη. Από την ομάδα αυτή ξεχωρίζει ένα ωοθυλάκιο, λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει μεγαλύτερα ποσά FSH και επομένως να παράγει μεγαλύτερα ποσά οιστρογόνων. Το ωοθυλάκιο αυτό στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης του, συνεχίζει να αναπτύσσεται και οδηγείται στην ωοθυλακιορρηξία (22).

Επομένως, οι FSH και LH είναι οι ορμόνες που ελέγχουν κυρίως την παραγωγή ορμονών από την ωοθήκη. Οι γοναδοτροπίνες επιδρούν σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς για την LH βρίσκονται στην έσω θήκη και η σύνδεσή της με αυτούς επάγει την παραγωγή ανδρογόνων (τεστοστερόνης και ανδροστενδιόνης). Τα ανδρογόνα, στην συνέχεια, φθάνουν στα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία φέρουν ειδικούς υποδοχείς για την FSH. Η FSH επάγει την παραγωγή και ενεργοποίηση του ενζύμου αρωματάση στα

κοκκώδη κύτταρα, το οποίο με την σειρά του προκαλεί την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα και, κυρίως, σε οιστραδιόλη (25).

Τα οιστρογόνα που παράγονται στο ωοθυλάκιο αποτελούν μιτογόνους παράγοντες για τα κοκκώδη κύτταρα προκαλώντας διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Έτσι, επάγεται η αύξηση των υποδοχέων της FSH, με συνέπεια την ταχύτερη αρωματοποίηση των παραγόμενων από τα κύτταρα της θήκης ανδρογόνων και επομένως την παραγωγή όλο και μεγαλύτερων ποσοτήτων οιστρογόνων, που με την σειρά τους προκαλούν περισσότερες διαιρέσεις των κοκκωδών κυττάρων. Αυτή η συνεργασία των κυττάρων της θήκης και των κοκκωδών κυττάρων στην παραγωγή των οιστρογόνων είναι γνωστή ως θεωρία των δύο κυττάρων-δύο γοναδοτροπινών. Τέλος, τα οιστρογόνα και η FSH επάγουν την εμφάνιση υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα, ώστε να γίνει δυνατή η απόκρισή τους στην προωοθυλακιορρηκτική αύξηση της LH.

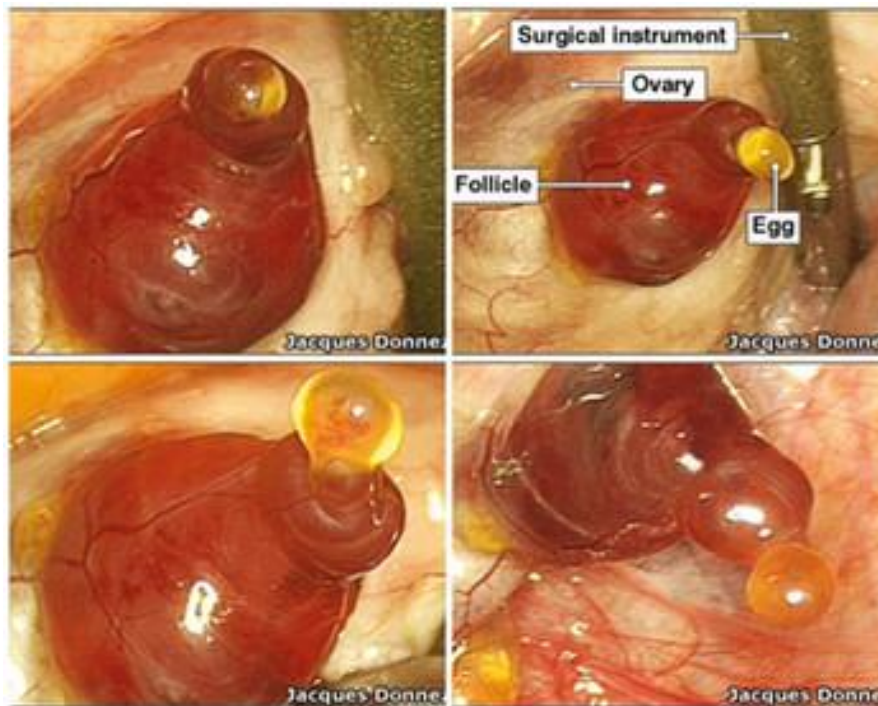
Τα οιστρογόνα, επίσης, ελέγχουν ορμονικά την λειτουργία της υπόφυσης. Από τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνεται και μία μη στεροειδής ορμόνη, η ανασταλίνη (ινχιμπίνη), η οποία σε συνεργασία με τα οιστρογόνα συμμετέχει στον μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης έκκρισης της FSH από την υπόφυση, έχοντας σαν συνέπεια την μείωσή της. Έτσι, το βιοχημικά πιο ώριμο ωοθυλάκιο, που βρίσκεται στην ωοθήκη στην αρχή του κύκλου, παράγει μεγαλύτερη ποσότητα οιστρογόνων, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της δεσμευτικής του ικανότητας για την FSH. Αυτό θα συμβάλει στην περαιτέρω ανάπτυξή του και, τελικά, στην ανάδειξή του ως κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Επιπλέον, μέσω του μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης κατά τη ρύθμιση της υπόφυσης, επάγει τη μείωση της παραγόμενης FSH (22,26).

Η μείωση της FSH έχει σαν αποτέλεσμα την παύση της υποστήριξής της στα λιγότερο ανεπτυγμένα ωοθυλάκια, τη διακοπή της παραγωγής οιστρογόνων από αυτά, που έχει σαν συνέπεια τη διακοπή του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων και τη διακοπή της λειτουργίας τους. Τελικό αποτέλεσμα αυτής της ορμονικής δραστηριότητας είναι η ατρησία και η εκφύλιση των ωοθυλακίων. Όταν τα επίπεδα των οιστρογόνων μεγιστοποιηθούν, σταθεροποιούνται για 14-24 ώρες. Στο διάστημα αυτό η δράση που ασκούν στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης από αρνητική γίνεται θετική, με συνέπεια τη μαζική έκκριση της LH. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την

επαγωγή της τελικής ωρίμασης του ωαρίου και της πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας.

Η τελική ωρίμαση του ωαρίου και η ρήξη του ωοθυλακίου καθορίζεται από το μεσοκυκλικό κύμα της LH. Η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει 10-12 ώρες μετά την εκκριτική μεγιστοποίηση της LH. Περίπου 48 ώρες πριν από την μεγιστοποίηση της, η LH, επιδρά στα κοκκώδη κύτταρα μέσω των υποδοχέων της και επάγει την παραγωγή προγεστερόνης. Η προγεστερόνη διευκολύνει την θετική αναδραστική ρύθμιση της LH και εμπλέκεται στην μεσοκυκλική αιχμή της FSH, η οποία εξασφαλίζει τον απαραίτητο αριθμό υποδοχέων της LH. Η σταδιακή αύξηση της προγεστερόνης πιθανόν επάγει την μείωση και τελικά τον τερματισμό της έκκρισης της LH με τον ρυθμιστικό μηχανισμό της αρνητικής αναδρασης, ενώ ενδεχομένως συμμετέχει στην αύξηση της ελαστικότητας του τοιχώματος του ωοθυλακίου.

Επομένως, η LH επιδρά στο ωάριο, επάγοντας την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσής του, στο σύστημα της κυκλοοξυγενάσης των κοκκωδών κυττάρων και στο σύστημα της παραγωγής ιντερλευκινών και προσταγλανδινών προκαλώντας την αύξησή τους. Οι ουσίες αυτές διεγείρουν την σύνθεση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η κολλαγονάση και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου και της πλασμίνης. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές, αλληλεπιδρούν με την LH προκαλώντας την παραγωγή συσπαστικών ουσιών, οι οποίες δρουν στις λείες μυϊκές ίνες της έξω θήκης που περιβάλλουν το ωοθυλάκιο. Η σύσπασση μεταφέρεται στο τοίχωμα του ωοθυλακίου, προκαλώντας τη ρήξη του στα σημεία διάβρωσής του από πρωτεολυτικά ένζυμα (ωοθυλακιορρηξία) (22,27) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σταδιακή απελευθέρωση του ωαρίου από το ωοθυλάκιο. Πηγή: <https://embryology.med.unsw.edu.au>

Η ωοθυλακιόρρηξια σηματοδοτεί τη λήξη της πρώτης φάσης του κύκλου (παραγωγική φάση) και την έναρξη της εκκριντικής φάσης. Μετά την ωοθυλακιόρρηξια, το ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε ωχρό σωματίο, με μια διαδικασία κατά την οποία γεμίζει αρχικά με αίμα, και στη συνέχεια με μία λιπώδη κίτρινη ουσία. Το ωχρό σωματίο είναι λειτουργικό για περίπου 14 ημέρες. Μετά το διάστημα αυτό το ωχρό σωματίο, στην περίπτωση που δεν υπάρχει γονιμοποίηση, εκφυλίζεται και αντικαθίσταται από το λευκό σωματίο, που είναι ένας ουλώδης ανάγγειος ιστός. Σε περίπτωση επιτυχούς γονιμοποίησης, το ωχρό σωματίο διατηρεί την βιολογική ενεργότητά του για περίπου 6-8 εβδομάδες, κάτω από την επίδραση της χοριακής γοναδοτροπίνης. Η χοριακή γοναδοτροπίνη συντίθεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη του κυήματος. Σε αυτή την περίπτωση, το ωχρό σωματίο της κύησης παράγει προγεστερόνη, μέχρι η παραγωγή αυτή να αντικατασταθεί πλήρως από τον πλακούντα (22).

B.2.B. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η γονιμοποίηση του ωαρίου έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία του ζυγωτού, που είναι διπλοειδές και φέρει 46 χρωμοσώματα. Κατά την γονιμοποίηση, συντήκονται οι δύο προπυρήνες, ο ανδρικός και ο γυναικείος, και ξεκινάνε διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις. Η ένωση των δύο προπυρήνων προϋποθέτει ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και ακροσωμική αντίδραση. Μέσα στις πρώτες 12-24 ώρες μετά την ωοθυλακιορρηξία θα πρέπει να επιτευχθεί γονιμοποίηση. Η γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων πιθανόν να διαρκεί 24-48 ώρες, αν και η κινητικότητα έχει μεγαλύτερη διάρκεια, αφού έχουν βρεθεί κινητά σπερματοζωάρια στο γυναικείο γεννητικό σύστημα έως και 5 ημέρες μετά την εκσπερμάτιση. Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στην λήκυθο της σάλπιγγας και απαιτεί να έχει ολοκληρωθεί η ωρίμαση των δύο γαμετικών κυττάρων.

Κατά την εκσπερμάτιση το παχύρρευστο σπερματικό υγρό εναποτίθεται στον κόλπο. Στα επόμενα 20-30 λεπτά, μέσω της επίδρασης των ενζύμων του προστατικού υγρού, ρευστοποιείται και τα ικανότερα σπερματοζωάρια μεταναστεύουν ταχύτατα στον τραχηλικό σωλήνα διαμέσου της τραχηλικής βλέννης. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ενώ σε κάθε εκσπερμάτιση απελευθερώνονται εκατομμύρια σπερματοζωάρια, στις σάλπιγγες καταλήγει ένας μικρός αριθμός, περίπου 50-4500. Ελάχιστα από τα αυτά θα μπορέσουν να πλησιάσουν το ωάριο. Τελικά, μόνο ένα από τα σπερματοζωάρια θα διεισδύσει επιτυχώς στο ωάριο και θα το γονιμοποιήσει.

Τα σπερματοζωάρια αποκτούν την γονιμοποιητική τους ικανότητα μέσω της ενεργοποίησής τους, η οποία περιλαμβάνει βιοχημικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις. Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης (capacitation) των σπερματοζωαρίων συντελείται σε όλο το γεννητικό σύστημα και θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί με την επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Κατά την επάφή τους αυτή πραγματοποιείται και η ακροσωμιακή αντίδραση, όπου διαλύονται οι μεμβράνες του ακροσώματος, απελευθερώνονται τα ένζυμα που διευκολύνουν την διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο (υαλουρονιδάση, διαλυτικό ένζυμο της ακτινωτής στεφάνης, ακροσίνη) και αυξάνεται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (25,27).

Το ωάριο μετά την ωοθυλακιορρηξία περιβάλλεται από τον ωοφόρο δίσκο και μεταφέρεται στη σάλπιγγα με στόχο τη γονιμοποίηση και στη συνέχεια ως γονιμοποιημένο ωάριο-προεμφυτευτικό έμβρυο, διαμέσου της σάλπιγγας στη θέση εμφύτευσης του στο ενδομήτριο. Η μεταφορά διακρίνεται σε τρία στάδια, στην παραλαβή του ωαρίου από τους κροσσούς της σάλπιγγας, στην ενδοσαλπιγγική του μεταφορά και στην κίνηση του εντός της ενδομήτριας κοιλότητας. Ο ωοφόρος δίσκος διακρίνεται στον ακτινωτό στέφανο, από όπου διέρχονται επιλεκτικά μόνο σπερματοζωάρια που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωμική τους αντίδραση, και στην διαφανή ζώνη. Τα σπερματοζωάρια, που θα διαπεράσουν τον ακτινωτό στέφανο, εφάπτονται στην διαφανή ζώνη μέσω ειδικών υποδοχέων, οι οποίοι είναι αυστηρά εξειδικευμένοι για κάθε είδος θηλαστικού.

Η διάτρηση της διαφανούς ζώνης επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεολυτικών ενζύμων που ελευθερώνονται κατά την ακροσωμική αντίδραση και μέσω της υπερκινητικότητας του σπερματοζωαρίου. Στη συνέχεια, το σπερματοζωάριο έρχεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη του ωαρίου, τη διαλύει και ενσωματώνεται στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Η σύνδεση της μεμβράνης του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου ενεργοποιεί την φλοιϊκή αντίδραση και επάγει την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσής του ωαρίου, την αποβολή του πολικού σωματίου και τον σχηματισμό του γυναικείου προπυρήνα (22+X).

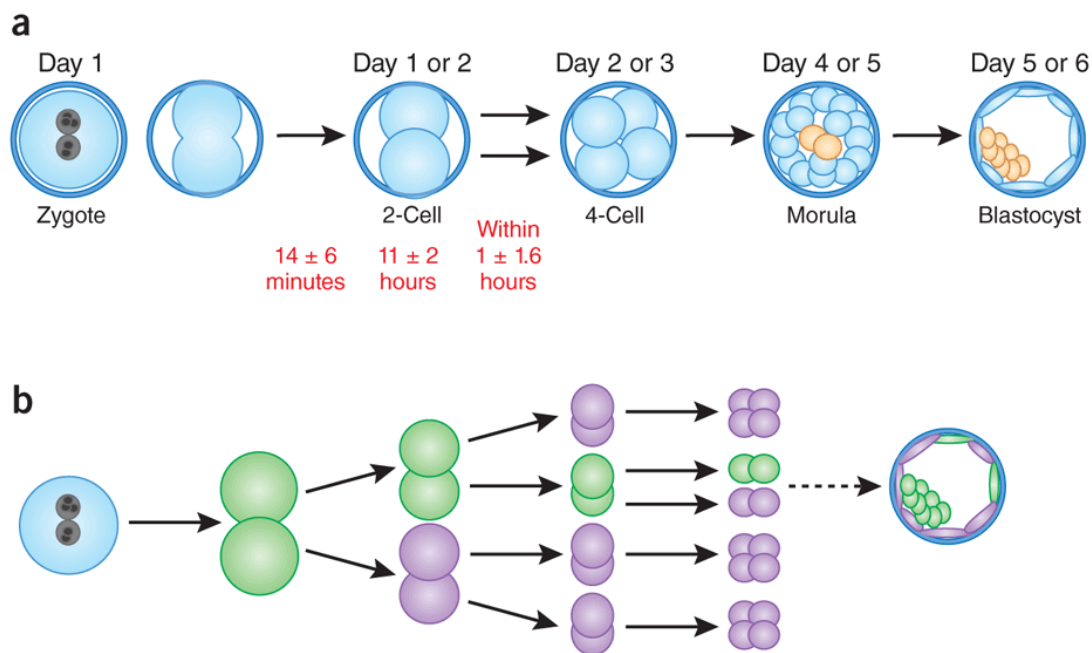
Το ζυγωτό κατά την πορεία του στην σάλπιγγα διαιρείται αλεπάλληλα και αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων του, γνωστά ως βλαστομερίδια. Αργότερα με περισσότερες κυτταρικές διαιρέσεις το ζυγωτό φτάνει στο στάδιο του μοριδίου ή στάδιο των 16 κυττάρων. Κατά το στάδιο αυτό το μορίδιο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας, και μετά από 1-2 ημέρες από την γονιμοποίηση μεταβάλλεται σε βλαστοκύστη, η οποία αποτελείται από 24 και 322 κύτταρα (84).

B.2.Γ. ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η ανάπτυξη του ζυγωτού, του πρώτου κυττάρου του νέου οργανισμού, αρχίζει αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο. Ο

ζυγώτης διαιρείται μιτωτικά και μέσω του κροσσωτού επιθηλίου της σάλπιγγας φθάνει στην κοιλότητα της μήτρας μετά από περίπου 3 ημέρες. Οι πρώτες γρήγορες μιτωτικές διαιρέσεις του ζυγώτη ονομάζονται αυλακώσεις. Από την πρώτη διαίρεση του ζυγώτη προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα, τα βλαστομερίδια. Οι επόμενες διαιρέσεις σχηματίζουν ολοένα και μικρότερα βλαστομερίδια. Κατά την αυλάκωση, τα βλαστομερίδια γίνονται διαδοχικά δυο, τέσσερα, οκτώ κ.ο.κ..

Μετά την αυλάκωση ακολουθεί το στάδιο του μοριδίου. Στο μορίδιο, τα βλαστομερίδια σχηματίζουν μια συμπαγή μάζα σαν μούρο. Στη συνέχεια, δημιουργείται η βλαστική κοιλότητα, η οποία προκύπτει από την συσσώρευση υγρού, και σηματοδοτεί τη μετάβαση στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται και διατάσσονται. στην έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη, από την οποία θα προκύψει το έμβρυο και στην έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη, μια στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλει την κοιλότητα της βλαστοκύστης από την οποία θα σχηματισθεί ο πλακούντας και οι εμβρυικοί υμένες, χόριο και άμνιο. (Εικόνα 9). Ως ένα σημείο, η βλαστοκύστη διατηρεί τον ίδιο συνολικό όγκο παρά τις διαδοχικές διαιρέσεις και συνεχίζει να περιβάλλεται από την διαφανή ζώνη. Ωστόσο, με την προοδευτική αύξηση της βλαστικής κοιλότητας, ο όγκος της βλαστοκύστης αυξάνεται, και η διαφανής ζώνη εξασθενεί και λεπταίνει (5η ημέρα), υπο την επίδραση και των εκκρινόμενων ενζύμων από τα βλαστομερίδια της τροφοβλάστης. Τελικά, η διαφανής ζώνη ρήγνυται, και το εκκολαπτόμενο έμβρυο αποσπάται (6η ημέρα) και η τροφοβλάστη αποκαλύπτεται, καθιστώντας δυνατή την προσκόλληση του εμβρύου στο ενδομήτριο (27).



Εικόνα 9: Πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης στον άνθρωπο. Πηγή: <http://www.nature.com>

Η εμφύτευση γίνεται στον πυθμένα της μήτρας και αρχίζει περίπου 2,5-3 ημέρες (85) μετά την είσοδο του εμβρύου στη μήτρα, περίπου δηλαδή, 5-6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Κατά την εμφύτευση, το έμβρυο διεισδύει στο επιθήλιο καθοδηγούμενο από την κυτταροτροφοβλάστη και εγκαθιστά ένα τροφοβλαστικό στρώμα στο φθαρτό. Μετά την είσοδό της στην κοιλότητα της μήτρας, η βλαστοκύστη παραμένει αιωρούμενη για περίπου 2-3 ημέρες, αναμένοντας μηνύματα για την κατάλληλη θέση εμφύτευσης στο ενδομήτριο (27).

B.2.Δ. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ

Η εμβρυολογική προέλευση και δημιουργία των γονάδων καθώς και τα βασικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης δεν διαφοροποιούνται ουσιαστικά στους ανθρώπους και τους επίμυες. Οι διαφορές μεταξύ τους αφορούν τα χρονικά διαστήματα των διαδικασιών, το μέγεθος των ωοθυλακίων και των ωαρίων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, τα οποία είναι σημαντικά μικρότερα στον επίμυ, όπως επίσης και ο περιορισμένος αριθμός των κοκκωδών κυττάρων.

Η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων ξεκινά την 8η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής και ολοκληρώνεται την 13η ημέρα. Στην 13^η ημέρα

της κύησης, ο αριθμός των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων εκτιμάται περίπου στα 25.000 (29) ενώ από τη 12^η ημέρα ξεκινούν οι μειωτικές διαιρέσεις και η μετάβασή τους στο στάδιο του ωογονίου (30). Στους επίμυες, ο μεγαλύτερος αριθμός ωοθυλακίων των δύο ωοθηκών εκτιμάται γύρω στα 50.000-75.000, και σχετίζεται με τη γενετική τους ποικιλομορφία. Όπως και στον άνθρωπο, τα περισσότερα ωοθυλάκια βρίσκονται στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου κατά την εμβρυική ζωή (19). Από τη στιγμή αυτή, τα αρχέγονα ωοθυλάκια εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ανάπτυξη με μία δυναμική διαδικασία, η οποία συνεχίζεται σε όλες τις ηλικίες. Ωστόσο, η πλειονότητά τους, περίπου το 80%, θα εκφυλιστούν μέσω της ατρησίας, με αποτέλεσμα ο αριθμός τους κατά τη γέννηση να είναι περίπου 10.000-15.000 (31).

Η διάρκεια της εγκυμοσύνης στους επίμυες είναι 19-20 ημέρες εξαρτώμενη από τη γενετική τους ποικιλία. Τα αρχέγονα και πρωτογενή ωοθυλάκια παρατηρούνται στις ωοθήκες των επίμυων ήδη από την 3^η ημέρα ζωής (32), ενώ την 5^η ημέρα όλα τα ωάρια βρίσκονται στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (πρόφαση I), ενώ τα δευτερογενή ωοθυλάκια παρατηρούνται από την 7^η μέρα ζωής. Την 18^η ημέρα εμφανίζονται πρώιμα ωοθυλάκια με άντρο, ενώ η ενήβωση και η εμμηναρχή τοποθετείται στην 34^η μέρα ζωής, οπότε και εκτιμάται ότι ο αριθμός των ωοθυλακίων διαφόρων σταδίων ανάπτυξης και στις δύο ωοθήκες είναι περίπου 20.000 (32).

Η διάρκεια του καταμήνιου κύκλου επηρεάζεται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και ορμονικούς χειρισμούς. Σε εργαστηριακές συνθήκες, οι θηλυκοί επίμυες έχουν ωοθυλακιόρρηξία κάθε 4 ημέρες. Η ωοθυλακιόρρηξία είναι σχετικά ασύγχρονη καθώς εκτείνεται σε ένα χρονικό διάστημα 2-3 ωρών, κατά το οποίο απελευθερώνονται 8-12 ωάρια. Τα ωάρια συλλαμβάνονται από τους κροσσούς του κωδωνικού άκρου του ωαγωγού και οδηγούνται στη λήκυθο, όπου θα ακολουθήσει η γονιμοποίηση (32).

Κατά την εκσπερμάτιση του αρσενικού επίμυος απελευθερώνονται περίπου 58 εκατομμύρια σπερματοζωάρια, μέρος των οποίων φθάνουν στη λήκυθο του ωαγωγού σε διάστημα 5 λεπτών. Ωστόσο η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων γίνεται μετά από μία ώρα, οπότε και εκδηλώνουν γονιμοποιητική ικανότητα.

Η μετάβαση από το αρχέγονο στο πρωτογενές ωοθυλάκιο απαιτεί περίπου 16 μέρες, ενώ στο δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο τουλάχιστον 30 μέρες. Τις επόμενες 30 μέρες το δευτερογενές ωοθυλάκιο μεταβαίνει στο στάδιο του ώριμου γραφιανού ωοθυλακίου. Συνεπώς, στους επίμυες η ωοθυλακιογένεση από το αρχέγονο στο ώριμο προωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο διαρκεί περίπου 60 ημέρες ή 15 ωοθυλακιόρρηκτικούς κύκλους. Κατά την περίοδο αυτή το μέγεθος του ωοθυλακίου αυξάνεται από τα 25 μm στα 500-800 μm. Παράλληλα με την ωοθυλακική ανάπτυξη, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους του ωαρίου ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης νερού, ιόντων, υδατανθράκων και λιπιδίων (33). Στους επίμυες το μέγεθος του ωαρίου αυξάνεται κατά 150 περίπου φορές από το στάδιο του αρχέγονου στο στάδιο του προωοθυλακιόρρηκτικού ωοθυλακίου (34).

B.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ *IN VITRO*

B.3.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ I

Έχουν περιγραφεί δύο τεχνικές για την απομόνωση των ωοθυλακίων: ο μηχανικός και ο ενζυματικός διαχωρισμός, ενώ μπορεί να γίνει και συνδυασμός των δύο μεθόδων. Κατά το μηχανικό διαχωρισμό, ο ωοθηκικός ιστός τεμαχίζεται με απαλές κινήσεις με τη βοήθεια λεπτών βελόνων ινσουλίνης 26G, λαβίδων και άλλων εργαλείων υπό το στερεοσκόπιο ώστε να απομονωθούν ακέραια ωοθυλάκια. Σε σχέση με τον ενζυματικό, μειονεκτεί στο ότι είναι πιο χρονοβόρος σαν διαδικασία λόγω της πυκνής και ινώδους φύσης του ωοθηκικού ιστού στα μεγαλύτερα θηλαστικά και ειδικά στον άνθρωπο. Επίσης, ο αριθμός των ωοθυλακίων που αποδίδεται ανά ωοθήκη με αυτή τη μέθοδο είναι αρκετά μικρότερος. Πλεονεκτεί σε σχέση με τον ενζυματικό στο γεγονός ότι παράγει ωοθυλάκια υψηλής ποιότητας με ανέπαφη τη βασική μεμβράνη η οποία διατηρεί προσκολλημένα κύτταρα θήκης.

Ο ενζυματικός διαχωρισμός χρησιμοποιεί τα ένζυμα κολλαγενάση και δεοξυριβονουκλεάση, τα οποία «μαλακώνουν» την ωοθήκη και απελευθερώνουν τα ωοθυλάκια. Πλεονεκτεί σε σχέση με τον μηχανικό στο γεγονός ότι είναι πιο εύκολος και γρήγορος τρόπος, αποδίδοντας μεγαλύτερο αριθμό ωοθυλακίων. Ωστόσο, έχει αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα των ωοθυλακίων, τα ένζυμα διασπούν τη βασική μεμβράνη, απομακρύνουν τα κύτταρα της θήκης και διακόπτουν την επικοινωνία μεταξύ ωοθυλακίων και κοκκωδών κυττάρων. Τέλος, δεν αποκλείεται να υπάρχει επίδραση των ενζύμων στους υποδοχείς ορμονών και αυξητικών παραγόντων της κυτταρικής μεμβράνης.

B.3.B. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ/ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Αν και έχει μελετηθεί σε ποικιλία ζωικών ειδών η βέλτιστη σύνθεση των καλλιεργητικών μέσων για την *in vitro* ωρίμαση ωαρίων, στον άνθρωπο δοκιμάζονται ακόμη διάφορα καλλιεργητικά μέσα και χρησιμοποιείται η διαθέσιμη πληροφορία άλλων μεθόδων καλλιέργειας άλλων κυτταρικών τύπων. Έχουν δοκιμαστεί έως τώρα σύνθετα καλλιεργητικά μέσα, όπως το

ιστικό καλλιεργητικό μέσο 199 (TCM-199), το Ham's F10 και το μέσο Chang με προσθήκη HEPES.

Μετά την απομόνωσή τους από την ωοθήκη, οι ωοθυλακικές μονάδες θα πρέπει να βρεθούν σε ένα κατάλληλο εργαστηριακό περιβάλλον που θα τους παρέχει θρεπτικά συστατικά, ηλεκτρολύτες, αμινοξέα, βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες και αντιοξειδωτικές ουσίες. Επίσης, θα πρέπει να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού, όπως η αμμωνία, τα οποία μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στην ωοθυλακική ανάπτυξη.

Μεταξύ των καλλιεργητικών μέσων που έχουν χρησιμοποιηθεί, ξεχωρίζουν το Alpha-Minimal Essential Medium (αMEM), το Waymouth Medium και το McCoy's 5a Medium (35,36). Τα μέσα αυτά εμπλουτίζονται από μία πηγή πρωτεΐνης, ινσουλίνη, τρανσφερρίνη και σελήνιο. Κάποιοι ερευνητές επίσης προσθέτουν αντιβιοτικά ή/και αντιμυκητιασικά σκευάσματα για την αποφυγή μικροβιακών επιμολύνσεων. Ως πηγή πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται κυρίως ο βόειος εμβρυϊκός ορός (FBS), σε συγκέντρωση 5%. Η μείωση της συγκέντρωσης από 5% σε 1% έχει συνδεθεί με την ελάττωση του ποσοστού ωρίμασης των ωαρίων μετά τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και EGF, παρόλο που δεν επηρέασε αρνητικά την επιβίωση των ωοθυλακίων (37,38). Οι μεγάλες συγκεντρώσεις ινσουλίνης (5 μg/ml) βοηθούν στον μεταβολισμό των καλλιεργούμενων ωοθυλακίων με την πρόσληψη γλυκόζης και αμινοξέων. Η τρανσφερρίνη συμμετέχει στη μεταφορά του σιδήρου ενδοκυτταρικά και στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου από το καλλιεργητικό μέσο. Το σελήνιο ενεργοποιεί ένζυμα που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό (38). Στο εμπόριο διατίθεται έτοιμο σκεύασμα που παρέχει ταυτόχρονα ινσουλίνη, τρανσφερρίνη και σελήνιο σε αναλογία 1000:1000:1 αντίστοιχα, ώστε στο καλλιεργητικό μέσο να επιτυγχάνονται συγκεντρώσεις 5 μg/ml ινσουλίνης, 5 μg/ml τρανσφερρίνης και 5ng/ml σεληνίου.

Η προσθήκη γοναδοτροπινών FSH και LH στο μέσο της καλλιέργειας βελτιώνει το ποσοστό ωρίμασης ωαρίων *in vitro*. Οι LH και HCG αυξάνουν στον ίδιο βαθμό τα ποσοστά *in vitro* ωρίμασης ανώριμων ωαρίων. Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSH θεωρείται απαραίτητη, τουλάχιστον από το

απώτερο στάδιο του ωοθυλακίου πριν το σχηματισμό του άντρου (late preantl follicle) και μάλιστα παρουσιάζει δόσοεξαρτώμενη δράση. Η ελάχιστη συγκέντρωση για την ανάπτυξη *in vitro* ωοθυλακίων πριν το σχηματισμό του άντρου είναι 10 mIU/ml, ωστόσο συνήθως προστίθεται στο καλλιεργητικό μέσο σε συγκέντρωση 100 mIU/ml (39). Η ορμόνη επιδρά θετικά μέχρι τη συγκέντρωση 100 mIU/ml, ενώ η παρουσία της σε συγκέντρωση 1000 mIU/ml μείωσε το ποσοστό των ωοθυλακίων που οδηγούνταν σε ωοθυλακιορρηξία (37).

Η ωχρινοτρόπος ορμόνη LH δεν είναι απαραίτητη. Η προσθήκη μικρών ποσοτήτων, όμως, στις καλλιέργειες ωοθυλακίων πριν το σχηματισμό του άντρου ενισχύει την ανάπτυξη του άντρου και βελτιώνει την πυρηνική ωρίμαση του ωαρίου (40).

Οι συνθήκες καλλιέργειας συνήθως είναι: θερμοκρασία 37^o C, συγκέντρωση CO₂ 5% σε ατμοσφαιρικό αέρα που περιέχει περίπου 20% O₂, υγρασία 95% και pH 7,3- 7,5.

B.3.Γ. IN VITRO ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Η ωρίμαση των ωαρίων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την γονιμοποίησή τους. Μόνον τα ώριμα ωάρια έχουν διαιρεθεί μειωτικά με αποτέλεσμα να έχουν 23 χρωμοσώματα. Τα ανώριμα ωάρια με ειδικές τεχνικές είναι δυνατόν να ωριμάσουν *in vitro* και μετά να γονιμοποιηθούν.

Ανάλογα με τη χρονική διάρκεια, χαρακτηρίζουμε την καλλιέργεια ωοθυλακίων *in vitro* βραχεία και μακρά. Στη βραχεία, κατά την οποία δεν μελετάται η επιβίωση των ωοθυλακίων μετά το πέρας του πειράματος, χρησιμοποιούνται συνήθως μεγάλα ωοθυλάκια και μελετάται η βραχυπρόθεσμη επίδραση παραγόντων στο μεταβολισμό τους. Συλλέγονται ωάρια από ωοθυλάκια διαμέτρου 2-10 mm, με ή χωρίς να έχει προηγηθεί διέγερση των ωοθηκών και καλλιεργούνται για 24-48 ώρες, ώστε να φτάσουν στη μετάφαση II (41). Επειδή όλα τα ωάρια δεν είναι όλα συμφασικά, σημαντικός αριθμός ωαρίων φτάνουν στη μετάφαση II μετά από καλλιέργεια 23-25 ωρών. Επομένως, για την αποφυγή παραμονής των ωαρίων αυτών στην μετάφαση II για 20-30 ώρες πριν την γονιμοποίηση και δεδομένου ότι τα ωάρια

που φτάνουν πρώτα στη μετάφαση II είναι πιο πιθανό να αναπτυχθούν έως το στάδιο της βλαστοκύστης (42), ο χρόνος καλλιέργειας των ωαρίων έχει μειωθεί πλέον στις 28-36 ώρες (43).

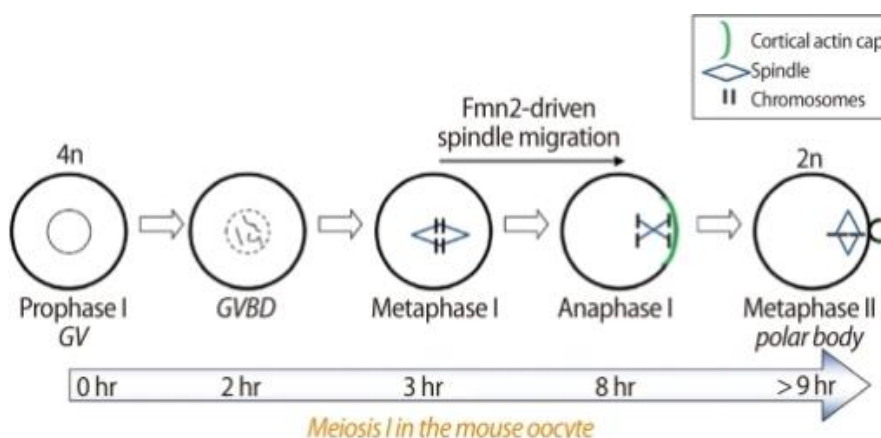
Στη μακρά καλλιέργεια ωοθυλακίων *in vitro* χρησιμοποιούνται μικρά ωοθυλάκια, όπως αρχέγονα, πρωτογενή ή δευτερογενή προκοιλοτικά και παράλληλα με τις μεταβολικές παραμέτρους αξιολογείται η τελική επιβίωση των ωοθυλακίων, η ωρίμαση των ωαρίων και επιπλέον η γονιμοποιητική τους ικανότητα και η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη των παραγόμενων εμβρύων. (44).

Οι τεχνικές καλλιέργειας με τα καλύτερα αποτελέσματα έως τώρα είναι η καλλιέργεια τμήματος ωοθηκικού ιστού και η καλλιέργεια μεμονωμένων ωοθυλακίων. Κατά την καλλιέργεια ωοθηκικού ιστού, τα αρχέγονα ωοθυλάκια φτάνουν στο στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου, ενώ σε καλλιέργειες μεμονωμένων αρχέγονων ωοθυλακίων, τα κύτταρα εκφυλίζονται άμεσα (44). Τα δευτερογενή ωοθυλάκια όταν καλλιεργούνται, φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πρώιμο άντρο και μετά εκφυλίζονται, ενώ τα δευτερογενή ωοθυλάκια με μικρό άντρο (*early preantral*) φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πλήρως αναπτυγμένο άντρο σε περιορισμένο όμως αριθμό (45).

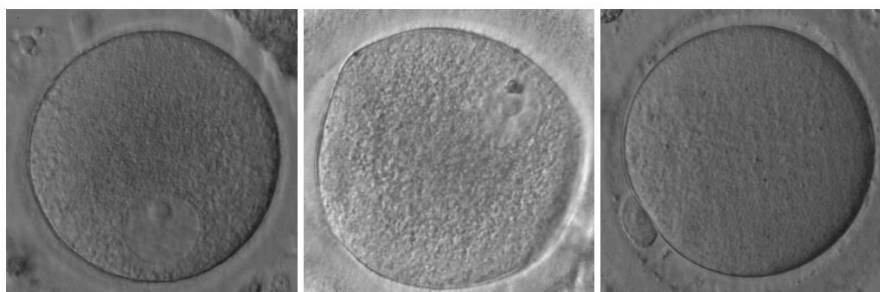
Η *in vitro* ωρίμαση των ωαρίων (IVM) είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ωάρια περνούν από το μορφολογικό στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV), που αντιστοιχεί στην πρόφαση I σε εκείνο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), που αντιστοιχεί στη μετάφαση I και από εκεί στο στάδιο του πολικού σωματίου (PB), που αντιστοιχεί στη μετάφαση II. Η *in vitro* ανάπτυξη των ωοθυλακίων (IVG) είναι η διαδικασία κατά την οποία αρχέγονα ωοθυλάκια (*primordial*) ή ωοθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου (*early preantral*) καλλιεργούνται με σκοπό την πλήρη ωρίμασή τους, που καθορίζεται από την εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου (Εικόνα 10).

Ένα ανώριμο ωάριο πρόφασης I, χαρακτηρίζεται από την απουσία πολικού σωματίου, αλλά την παρουσία βλαστικού κυστιδίου (GV). Στο στάδιο αυτό, ο πυρήνας περιέχει 46 χρωμοσώματα και παρατηρείται ένα συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων – ωαρίου (COCS) (Εικόνα 11). Στο στάδιο μετάφασης I, το ωάριο χαρακτηρίζεται από την απουσία πολικού σωματίου και

βλαστικού κυστιδίου και έχει ένα εκτεταμένο και μη συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων (Εικόνα 11). Στο στάδιο μετάφασης II (MII), το ωάριο είναι ώριμο έτοιμο να γονιμοποιηθεί. Έχει ένα διευρυμένο μη συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων, περιέχει 23 χρωμοσώματα και ένα πολικό σωματίο στον περιλεκιθικό χώρο καθώς και ένα καθαρό και ομογενές κυτταρόπλασμα με ομαλή κατανομή κυτταρικών οργανιδίων.



Εικόνα 10: Τα στάδια της μείωσης στο ωκύτταρο του επίμουσ. Πηγή: <http://openi.nlm.nih.gov/>



Εικόνα 11: Αριστερά: Ανώριμο ωάριο στο στάδιο της πρόφασης I με εμφανές βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle-GV), Κέντρο: Ανώριμο ωάριο το οποίο πλησιάζει το στάδιο της μετάφασης I (germinal vesicle breakdown, GVBD). Δεξιά: Ωριμο ωάριο στο στάδιο της μετάφασης II με εμφανές πολικό σωματίο. Πηγή: <https://atlas.eshre.eu/es/1454662357452400>

Όταν τα ωοθυλάκια εισέρχονται στην φάση της ωρίμασης, τα ωκύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος, ενώ τα περιβάλλοντα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης διαφοροποιούνται. Η ωρίμαση των ωαρίων συνοδεύεται από σύνθετες κυτταρικές διαδικασίες (19,46), όπως η πυρηνική και κυτταροπλασματική ανάπτυξη, παραγωγή οργανιδίων, παραγωγή RNA που

υποστηρίζει την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμαση. Η ωρίμαση του πυρήνα χαρακτηρίζεται από την δυνατότητα επανέναρξης της μείωσης από το ωάριο, ενώ η κυτταροπλασματική ωρίμαση σχετίζεται με την γονιμοποιητική ικανότητα και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

B.3.Δ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Ορμόνες όπως η αυξητική ορμόνη (GH), ο Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), η προλακτίνη (PRL), η θυρεοειδοτρόπος (TSH) και οι θυρεοειδικές ορμόνες έχει δείχθει ότι επηρεάζουν την ωοθυλακιογένεση με την ανάπτυξη και την ωρίμαση των ωαρίων, καθώς και τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η προλακτίνη (PRL) είναι μια ορμόνη με πολλαπλές βιολογικές δράσεις που εμπλέκεται σε πολλαπλές φυσιολογικές διαδικασίες. Ο υποδοχέας της είναι μια πρωτεΐνη που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ισομορφών του υποδοχέα της PRL που ποικίλει στα διάφορα είδη. Ωστόσο, οι ισομορφές αυτές διαθέτουν κοινή εξωκυτάρια και διαμεμβρανική περιοχή και παρουσιάζουν διαφορετικές καρβοξυτελικές περιοχές (47,48) οι οποίες προκύπτουν από το φαινόμενο της εναλλακτικής αποκοπής και επανασυναρμολόγησης (alternative splicing) των εξονίων του γονιδίου του υποδοχέα της προλακτίνης (49,50). Στον επίμου έχουν περιγραφεί τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα της PRL, μία μεγάλου μήκους (long, PRL-RL), καθώς και τρεις βραχύτερες σε μέγεθος ισομορφές (short, PRL-RS1, PRL-RS2, PRL-RS3) (48,51). Ομόζυγοι επίμους με τεχνητή έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα της PRL (knockout mice) εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα αναπαραγωγής και λιγότερες σε αριθμό ωοθυλακιορρηξίες (56). Τα ωάρια των πειραματόζων αυτών παραμένουν στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (πρόφαση I) και δεν εξελίσσονται περαιτέρω (57). Στον άνθρωπο εκτός από τη μεγάλη και την ενδιάμεση ισομορφή έχουν προσδιοριστεί και δύο βραχείες ισομορφές PRL (PRL-RSa και PRL-RSb) (52,53,54,55).

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη συγκεκριμένων συγκεντρώσεων προλακτίνης σε καλλιέργειες ωαρίων επιμύων, κουνελιών και αρουραίων προάγει την ωρίμασή τους, και την εμβρυϊκή ανάπτυξη πριν την

εμφύτευση (58, 59, 60, 61). Η ύπαρξη mRNA των ισομορφών του υποδοχέα της προλακτίνης έχει δειχθεί τόσο στα διάφορα στάδια πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης επιμύων (62), όσο και στα πρωτογενή ωοθυλάκια, στο ωοθυλακικό σύμπλεγμα πριν την ωοθυλακιορρηξία (COCs) και στα ωάρια πρόφασης I, στον επίμυ. Σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας πρωτογενών ωοθυλακίων επιμύων *in vitro*, η προσθήκη PRL (100, 200 ή 300 ng/ml) στα καλλιεργητικά μέσα αυξάνει θεαματικά τα ποσοστά πυρηνικής ωρίμασης, γονιμοποίησης και επακόλουθης πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Η αυξητική ορμόνη (GH), είναι ένας επιπλέον παράγοντας που συμμετέχει στη διαδικασία της ωρίμασης των ωαρίων. Έχει αναφερθεί αύξηση του ποσοστού *in vitro* ωρίμασης COCs, καθώς και της επακόλουθης εμβρυϊκής ανάπτυξης σε βοοειδή, ενώ το mRNA της GH εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα και στα ωάρια των βοοειδών (63). Πρόσφατα ανακοινώθηκε η παρουσία του υποδοχέα της GH σε ωοθυλάκια αρουραίων πριν το σχηματισμό του άντρου (64). Επιπλέον, η αυξητική ορμόνη αυξάνει τα ποσοστά *in vitro* ωρίμασης ωοθυλακίων με μικρό άντρο σε αρουραίους (65), ενώ προάγει την ωρίμαση πρωτογενών ωοθυλακίων επιμύων (66). Η GH ασκεί τη δράση της στα ωοθυλάκια, είτε άμεσα μέσω του υποδοχέα της, είτε έμμεσα μέσω του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1) (64,65).

Η GH και ο IGF-1 όταν προστεθούν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σε καλλιέργειες ωαρίων πρόφασης I επιμύων αυξάνουν στατιστικώς σημαντικά το ποσοστό της *in vitro* ωρίμασης των ωαρίων (62). Η απουσία των κοκκωδών κυττάρων στις καλλιέργειες αυτές αποτελεί ένδειξη ύπαρξης υποδοχέων GH στα ωάρια πρόφασης I. Ο IGF-1 και ο υποδοχέας του εκφράζονται στα ωάρια και στα κοκκώδη κύτταρα αρουραίων, και η προσθήκη του IGF-1 στα καλλιεργητικά μέσα αυξάνει το ποσοστό *in vitro* ωρίμασης ωαρίων (18). Στον άνθρωπο, ο υποδοχέας του IGF-1 εκφράζεται σε όλα τα στάδια ωοθυλακικής ανάπτυξης, από τα αρχέγονα ωοθυλάκια έως τα ωοθυλάκια πριν την ωοθυλακιορρηξία (67), ενώ η προσθήκη του IGF-1 σε καλλιέργειες ωαρίων αυξάνει και τα ποσοστά της *in vitro* ωρίμασής τους (68).

Γ.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Γ.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην *in vitro* ωρίμαση ωαρίων πρόφασης I ποντικού.

Γ.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.2.A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία γενετική ποικιλία υβριδίων F1, απότοκος διασταύρωσης ποντικών C57BL/6 (θήλυ) X CBA (άρρεν). Συγκεκριμένα, άνηθα θήλεα υβρίδια ηλικίας 2-3 εβδομάδων θυσιάστηκαν για την απομόνωση και καλλιέργεια *in vitro* ωαρίων πρόφασης I. Τα υβρίδια μέχρι την ημέρα του πειράματος, αναπτύσσονταν στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Pasteur) σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας, συγκεκριμένων περιόδων εναλλαγής φωτός-σκότους και χωρίς περιορισμό στην πρόσληψη τροφής και νερού, σύμφωνα με το αυστηρό πρωτόκολλο εκτροφής που τηρεί το Ινστιτούτο.

Γ.2.B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Το μέσο απομόνωσης των ωοθυλακίων DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) και το καλλιεργητικό μέσο Ham's F10 χωρίς την προσθήκη υποξανθίνης (Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine) προμηθεύτηκαν από την Εταιρεία Gibco® Life Technologies. Το καλλιεργητικό μέσο α-MEM (α-Minimal Essential Medium), ο βόειος εμβρυϊκός ορός FBS (Fetal Bovine Serum), το σκεύασμα Ινσουλίνης- Τρανσφερρίνης-Σεληνίου ITS (Insulin-Transferin-Selenium) και ο ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF (Epidermal Growth Factor) προμηθεύτηκαν από την Εταιρεία Invitrogen TM Life Technologies. Οι γοναδοτροπίνες rFSH (Puregon®, Follitropin beta, Recombinant Follicle Stimulating Hormone-Ανασυνδυασμένη Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη) και hCG (Pregnyl®, Human Chorionic

Gonadotropin - Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη) προμηθεύτηκαν από την Εταιρεία MSD, ενώ η rLH (Luveris®, Lutropin Alfa, Recombinant Luteinizing Hormone – Ανασυνδυασμένη Ωχρινοτρόπος Ορμόνη) από την Εταιρεία Merck Serono S.A. Η βόειος αλβουμίνη BSA (Bovine Serum Albumin - Albumin, bovine serum fractionV), η TSH (Thyroid Stimulating Hormone- Θυρεοειδοτρόπος Ορμόνη) και η θυρεοειδική ορμόνη T3 (3,3',5-Triiodo-L-thyronine- Τριιωδο-θυρονίνη) προμηθεύτηκαν από την Εταιρεία Sigma-Aldrich®. Τα καλλιεργητικά τρυβλία Falcon 60X15 mm προμηθεύτηκαν από την Εταιρεία Becton Dickinson Co. (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Γ.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Γ.3.Α ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ Ι

Ο πάγκος εργασίας του Εργαστηρίου προετοιμαζόταν με τα κατάλληλα υλικά για κάθε πείραμα και έξι υβρίδια θυσιάζονταν με «αυχενική μετατόπιση», που είχε ως αποτέλεσμα τη διατομή της αυχενικής μοίρας του νωτιαίου μυελού. Μετά τη διάνοιξη της περιτοναϊκής κοιλότητας, οι ωθήκες αναγνωρίζονταν, εκτέμνονταν και μεταφέρονταν σε καλλιεργητικό υγρό Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) εμπλουτισμένο με Bovine Serum Albumin (BSA) σε αναλογία 9:1. Τα ωάρια πρόφασης Ι απομονώνονταν με μηχανικό διαχωρισμό με τη χρήση λεπτής βελόνας «ινσουλίνης» υπό το στερεοσκόπιο.

Στον πάγκο εργασίας προετοιμάστηκαν τα παρακάτω: (α) δοχείο με οινόπνευμα και φιλτραρισμένο αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1, (β) δοχείο με φιλτραρισμένο αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, με ανατομική λαβίδα και χειρουργικό ψαλίδι (γ) δοχείο με φιλτραρισμένο αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, ψαλίδι και λαβίδα μικροχειρουργικής και (δ) καλλιεργητικό τρυβλίο με DPBS εμπλουτισμένο με BSA σε αναλογία 9:1.

Γ.3.Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΤΡΟΠΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ TSH ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ T₃ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΠΡΟΦΑΣΗΣ Ι ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Για τη μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH και της θυροειδικής ορμόνης T₃ στην *in vitro* ωρίμαση ωαρίων πρόφασης Ι, εκτελέστηκε μία σειρά πειραμάτων, σε καθένα από τα οποία τα ωάρια που απομονώνονταν τοποθετούνταν τυχαίοποιημένα σε 7 ομάδες για βραχείας διάρκειας καλλιέργεια ως εξής:

- Ομάδα ελέγχου (Control)
- Ομάδα TSH 2 mIU/ml (1 µg/ml)
- Ομάδα TSH 1 mIU/ml(0,5 µg/ml)
- Ομάδα TSH 0,2 mIU/ml (0,1 µg/ml)
- Ομάδα T₃ 10⁻⁹ M
- Ομάδα T₃ 10⁻⁸M
- Ομάδα T₃ 10⁻⁷ M

Το καλλιεργητικό υγρό που χρησιμοποιούνταν ήταν το α-MEM (α-Minimal Essential Medium) εμπλουτισμένο με 5% FBS (Fetal Bovine Serum), και 5 µl ITS (Insulin-Transferin-Selenium), που ισοδυναμεί με 5 µg/ml ινσουλίνη, 5 µg/ml τρανσφερρίνη και 5ng/ml σεληνίου. Επιπλέον 100 mIU/ml r-FSH (recombinant Follicle Stimulating Hormone) και 10 mIU/ml r-LH (recombinant Luteinizing Hormone) προσθέτονταν στο καλλιεργητικό υγρό.

Στο κέντρο κάθε καλλιεργητικού τρυβλίου που περιείχε 1 ml καλλιεργητικού μέσου επικαλυπτόμενου με 1 ml ελαιώδους επιστρώματος τοποθετήθηκαν 30-60 ωάρια πρόφασης Ι. Για τη διατήρηση της υγρασίας προστέθηκαν 4 ml καλλιεργητικού μέσου στην περιφέρεια του τρυβλίου. Σε κάθε πείραμα δύο τρυβλία με την ανωτέρω σύσταση καλλιεργητικού υγρού αντιπροσώπευαν την ομάδα ελέγχου (Control) και από δύο τρυβλία καθεμιά από τις υπόλοιπες 6 ομάδες μελέτης (δύο για την ομάδα TSH 2 mIU/ml, δύο για την ομάδα TSH 1 mIU/ml, δύο για την ομάδα TSH 0,2 mIU/ml, δύο για την ομάδα T₃ 10⁻⁹ M, δύο για την ομάδα T₃ 10⁻⁸ M και δύο για την ομάδα T₃ 10⁻⁷ M) με την προσθήκη της αντίστοιχης ποσότητας της υπό μελέτη ουσίας TSH

στο ανωτέρω καλλιεργητικό υγρό. Συνολικά δηλαδή, κάθε σειρά κυτταροκαλλιέργειας (πείραμα) περιελάμβανε 14 καλλιεργητικά τρυβλία (2 για την ομάδα Control και από δύο για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της TSH και της T3 αντίστοιχα). Την επόμενη ημέρα αξιολογήθηκε και καταγράφηκε η ωρίμαση των ωαρίων από το στάδιο της πρόφασης I σε εκείνο της μετάφασης II με την έξοδο του πρώτου πολικού σωματίου.

Γ.3.Γ. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι συνθήκες καλλιέργειας είχαν καθοριστεί ως εξής: θερμοκρασία 37°C, διαθεσιμότητα CO₂ 5%, υγρασία 95% και pH 7,3-7,5.

Γ.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό STATA 11.0. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο διαφέρουν τα ποσοστά ωρίμασης των ωοθυλακίων μεταξύ των εναλλακτικών συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ορμονών (TSH, T3), χρησιμοποιήθηκε το Pearson χ^2 test. Τα επίπεδα σημαντικότητας ήταν αμφίπλευρα και στατιστική σημαντικότητα των παρατηρούμενων διαφορών στο δείγμα θεωρήθηκε για $p < 0,05$, ενώ μία τάση για στατιστική σημαντικότητα στις παρατηρούμενες διαφορές θεωρήθηκε για $p < 0,10$.

Γ.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.5.Α. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤSH ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH στην *in vitro* ωρίμαση ωαρίων πρόφασης I, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 987 ωοθυλάκια, τα οποία κατανεμήθηκαν στις τέσσερις ομάδες ως εξής:

- Ομάδα ελέγχου (Control) : 244 ωοθυλάκια
- Ομάδα TSH 2 mIU/ml (1 µg/ml) : 240 ωοθυλάκια
- Ομάδα TSH 1 mIU/ml (0,5 µg/ml) : 246 ωοθυλάκια
- Ομάδα TSH 0,2 mIU/ml (0,1 µg/ml) : 257 ωοθυλάκια

Η αξιολόγηση της ωρίμασης των ωαρίων βασίστηκε στην αναγνώριση του πρώτου πολικού σωματίου μεταξύ της διαφανούς ζώνης και της κυτταρικής μεμβράνης του ωοκυττάρου δευτέρας τάξεως, που έφθασε στην μετάφαση II της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Τα ώριμα ωάρια καταγράφηκαν στην ομάδα ελέγχου (Control) και στις τρεις ομάδες ωαρίων με διαφορετικές συγκεντρώσεις TSH (1 µg/ml, 0,5 µg/ml και 0,1 µg/ml). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Το ποσοστό των ωρίμων ωαρίων (Polar Body, PB) στην ομάδα ελέγχου ήταν 42,2%, στην ομάδα TSH 1 mg ήταν 35,8%, στην ομάδα TSH 0,5 mg ήταν 39,4% και στην ομάδα TSH 0,1 mg ήταν 37,0% (Πίνακας 1, Γράφημα 1).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I (στήλη «all») που εξελίχθηκαν σε ώριμα ωάρια (στήλη «PB») καθώς και τα ποσοστά ωρίμασης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (Πίνακας 1). Τα ποσοστά ωρίμασης που προκύπτουν έχουν παραπλήσιες τιμές χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 1: Επίδραση της TSH στην ωρίμαση ωαρίων πρόφασης I (GV) στο στάδιο της μετάφασης II (στάδιο πολικού σωματίου, PB)

Στήλη «all» : Οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «PB» : Αριθμοί ωαρίων πρόφασης I που εξελίχθηκαν σε ώριμα ωάρια (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «%» : Ποσοστά ωρίμασης ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 1 $\mu\text{g/ml}$

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

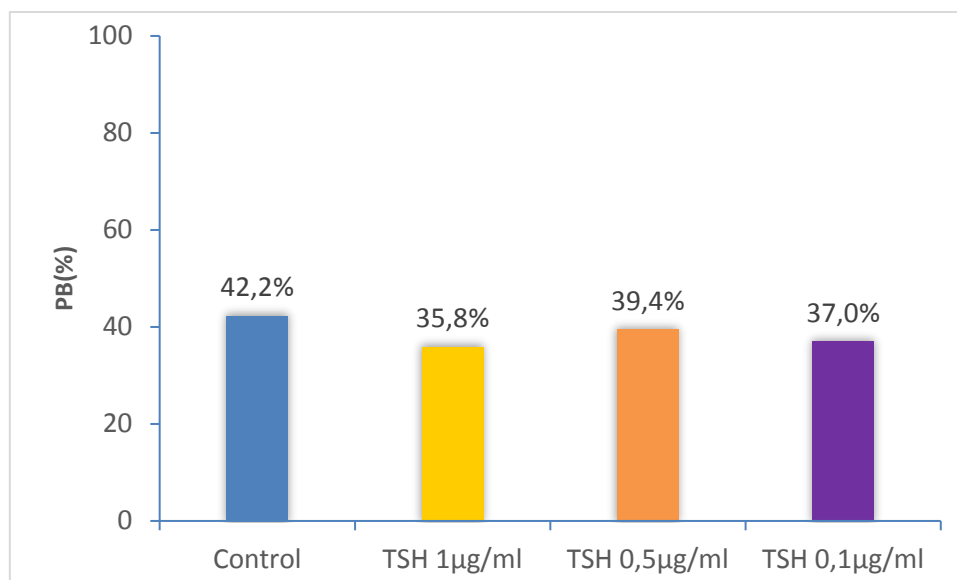
P b vs c : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$

P b vs d : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

P c vs d : p-value στη σύγκριση TSH 0,5 mg vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

Ποσοστό PB			
	all	PB	%
Control^a	244	103	42,2
TSH 1$\mu\text{g/ml}$^b	240	86	35,8
TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$^c	246	97	39,4
TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$^d	257	95	37,0
P a vs b	0,150		
P a vs c	0,531		
P a vs d	0,230		
P b vs c	0,413		
P b vs d	0,793		
P c vs d	0,569		

Γράφημα 1: Ποσοστά ωρίμων ωαρίων μετάφασης II (PB) για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (TSH 1 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$).



Η επίδραση της TSH στην ωρίμαση των ωαρίων αξιολογήθηκε σε ένα ακόμη μορφολογικό στάδιο που παρατηρείται κατά τη διαδικασίας ωρίμασης, εκείνο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (Germinal vesicle breakdown, GVBD) που αντιστοιχεί στη μετάφαση I. Τα ωάρια που άγγιζαν το στάδιο ωριμότητας GVBD καταγράφηκαν στην ομάδα ελέγχου (Control) και στις τρεις ομάδες με διαφορετικές συγκεντρώσεις TSH (1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Το ποσοστό των GVBD στην ομάδα ελέγχου ήταν 63,1%, στην ομάδα που χορηγήθηκε TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 73,3%, στην ομάδα που χορηγήθηκε TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 65,4% και στην ομάδα που χορηγήθηκε TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 65,8% (Πίνακας 2, Γράφημα 2).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I (στήλη «all») που εξελίχθηκαν σε ωάρια μετάφασης I (στήλη «GVBD») καθώς και τα ποσοστά εξέλιξης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Επίδραση της TSH στην εξέλιξη των ωαρίων πρόφασης I (GV) σε ωάρια μετάφασης I (GVBD)

Στήλη «all» : Οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I (GV) που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «GVBD» : Αριθμοί ωαρίων πρόφασης I (GV) που εξελίχθηκαν σε ωάρια μετάφασης I (GVBD) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «%» : Ποσοστά εξέλιξης των ωαρίων πρόφασης I (GV) σε ωάρια μετάφασης I (GVBD) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 1 µg/ml

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,5 µg/ml

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,1 µg/ml

P b vs c : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,5 µg/ml

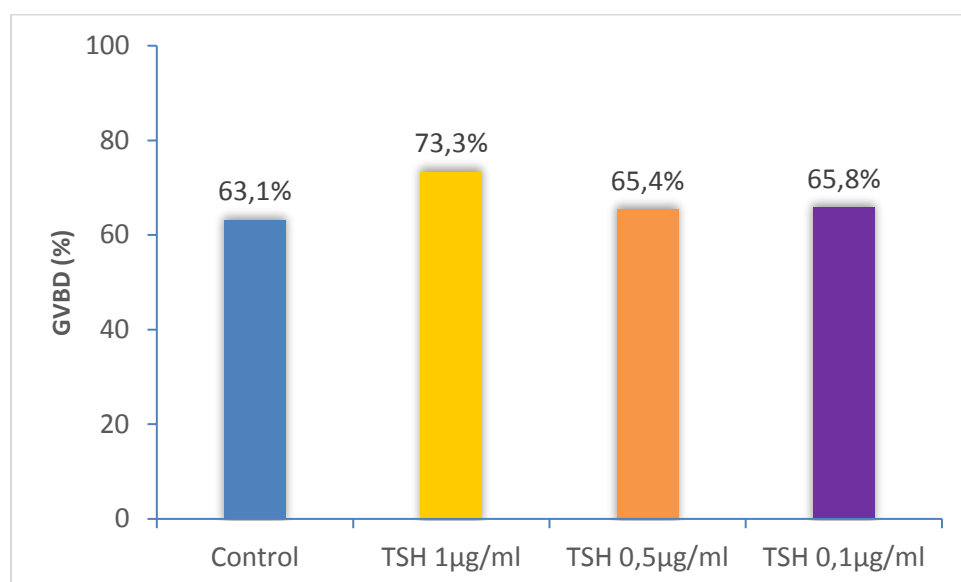
P b vs d : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,1 µg/ml

P c vs d : p-value στη σύγκριση TSH 0,5 mg vs TSH 0,1 µg/ml

Ποσοστό GVBD			
	all	GVBD	%
Control^a	244	154	63,1
TSH 1 µg/ml^b	240	176	73,3
TSH 0,5 µg/ml^c	246	161	65,4
TSH 0,1 µg/ml^d	257	169	65,8
P a vs b	0,016		
P a vs c	0,590		
P a vs d	0,537		
P b vs c	0,059		
P b vs d	0,067		
P c vs d	0,941		

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας TSH 1 $\mu\text{g/ml}$, με το ποσοστό να είναι σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). Επίσης, με τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,1$), υψηλότερο ήταν το ποσοστό GVBD στην ομάδα TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ σε σύγκριση με τις ομάδες TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 2).

Γράφημα 2: Ποσοστά ωρίων μετάφασης I (GVBD) για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (TSH 1 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$).



Για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της TSH στην ωρίμαση των ωρίων, εξετάστηκε το ποσοστό εξέλιξης των ωρίων μετάφασης I (GVBD) στο στάδιο της μετάφασης II (PB). Το ποσοστό εξέλιξης σε PB στην ομάδα ελέγχου ήταν 66,9%, στην ομάδα TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 48,9%, στην ομάδα TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 60,2% και στην ομάδα TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν 56,2% (Γράφημα 3).

Τα ωάρια της ομάδας ελέγχου είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τις ομάδες TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ και 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης, το ποσοστό της ομάδας TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ ήταν σημαντικά χαμηλότερο από το ποσοστό της ομάδας TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 3).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωαρίων μετάφασης I (στήλη «GVBD») που εξελίχθηκαν σε ώρια μετάφασης II (στήλη «PB») καθώς και τα ποσοστά εξέλιξης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Επίδραση της TSH στην εξέλιξη των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) σε ώριμα ώρια μετάφασης II (PB)

Στήλη «GVBD» : Οι αριθμοί των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «PB» : Αριθμοί ωαρίων μετάφασης I (GVBD) που εξελίχθηκαν σε ώριμα ώρια μετάφασης II (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

Στήλη «%» : Ποσοστά εξέλιξης των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) σε ώριμα ώρια μετάφασης II (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 1 $\mu\text{g/ml}$

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

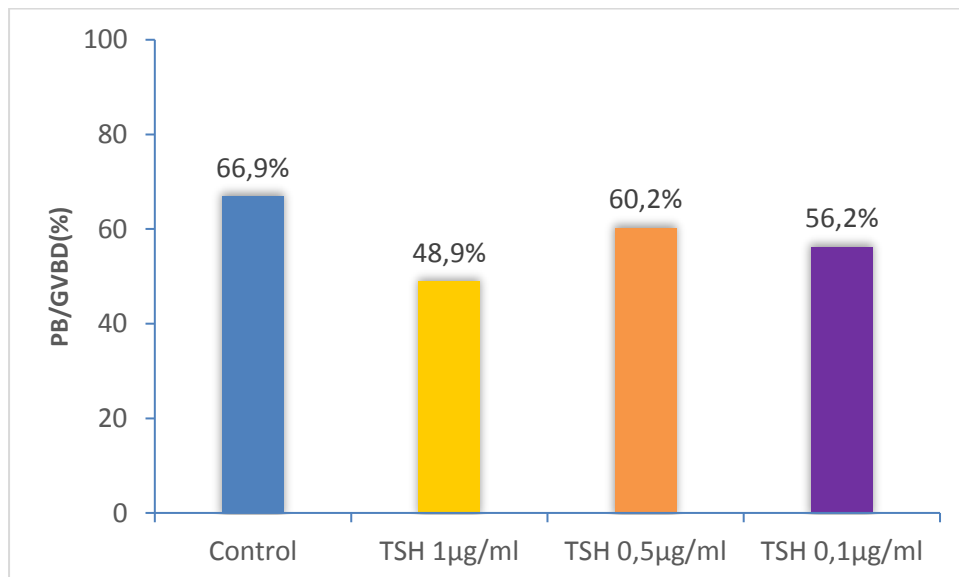
P b vs c : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$

P b vs d : p-value στη σύγκριση TSH 1 mg vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

P c vs d : p-value στη σύγκριση TSH 0,5 mg vs TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$

Ποσοστό PB/ GVBD			
	GVBD	PB	%
Control^a	154	103	66,9
TSH 1 $\mu\text{g/ml}$ ^b	176	86	48,9
TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ^c	161	97	60,2
TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ^d	169	95	56,2
P a vs b	0,001		
P a vs c	0,221		
P a vs d	0,049		
P b vs c	0,036		
P b vs d	0,172		
P c vs d	0,458		

Γράφημα 3: Ποσοστά ωρίμων ωαρίων μετάφασης II (PB) από ωάρια μετάφασης I (GVBD), για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση TSH (TSH 1 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,5 $\mu\text{g/ml}$, TSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$).



Γ.5.Β. ΕΠΙΔΡΑΣΗ Τ3 ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδικής ορμόνης Τ3 στην *in vitro* ωρίμαση ωαρίων πρόφασης Ι, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 789 ωοθυλάκια, τα οποία κατανεμήθηκαν στις τέσσερις ομάδες ως εξής:

- Ομάδα ελέγχου (Control) : 205 ωοθυλάκια
- Ομάδα Τ3 10^{-7} Μ : 214 ωοθυλάκια
- Ομάδα Τ3 10^{-8} Μ : 181 ωοθυλάκια
- Ομάδα Τ3 10^{-9} Μ : 189 ωοθυλάκια

Όπως και προηγουμένως, η αξιολόγηση της ωρίμασης των ωαρίων βασίστηκε στην αναγνώριση δύο διακριτών εξελικτικών μορφολογικών σταδίων (μετάφασης Ι [GVBD] και μετάφασης ΙΙ [PB]) και την καταμέτρηση του αριθμού των ωαρίων, που εισέρχονταν σε κάθε στάδιο, ξεχωριστά στην ομάδα ελέγχου και στις τρεις ομάδες διαφορετικής συγκέντρωσης Τ3 (10^{-7} Μ, 10^{-8} Μ, 10^{-9} Μ). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

Το ποσοστό των ωρίμων ωαρίων (PB) στην ομάδα ελέγχου ήταν 34,1%, στην ομάδα Τ3 10^{-7} Μ ήταν 37,4%, στην ομάδα Τ3 10^{-8} Μ ήταν 47,5% και στην ομάδα Τ3 10^{-9} Μ ήταν 36,5% (Πίνακας 4, Διάγραμμα 4). Το ποσοστό της ομάδας Τ3 10^{-8} Μ ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ($p < 0,05$) συγκρινόμενο με τα ποσοστά όλων των υπολοίπων ομάδων (Πίνακας 4).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης Ι (στήλη «all») που εξελίχθηκαν σε ώρια μετάφασης ΙΙ (στήλη «PB») καθώς και τα ποσοστά εξέλιξης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση Τ3 (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Επίδραση της Τ3 στην ωρίμαση ωαρίων πρόφασης Ι (GV) στο στάδιο της μετάφασης ΙΙ (στάδιο πολικού σωματίου, PB)

Στήλη «all» : Οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης Ι που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση Τ3

Στήλη «PB» : Αριθμοί ωαρίων πρόφασης Ι που εξελίχθηκαν σε ώριμα ώρια (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση Τ3

Στήλη «%»: Ποσοστά ωρίμασης ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10⁻⁷ M

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10⁻⁸ M

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10⁻⁹ M

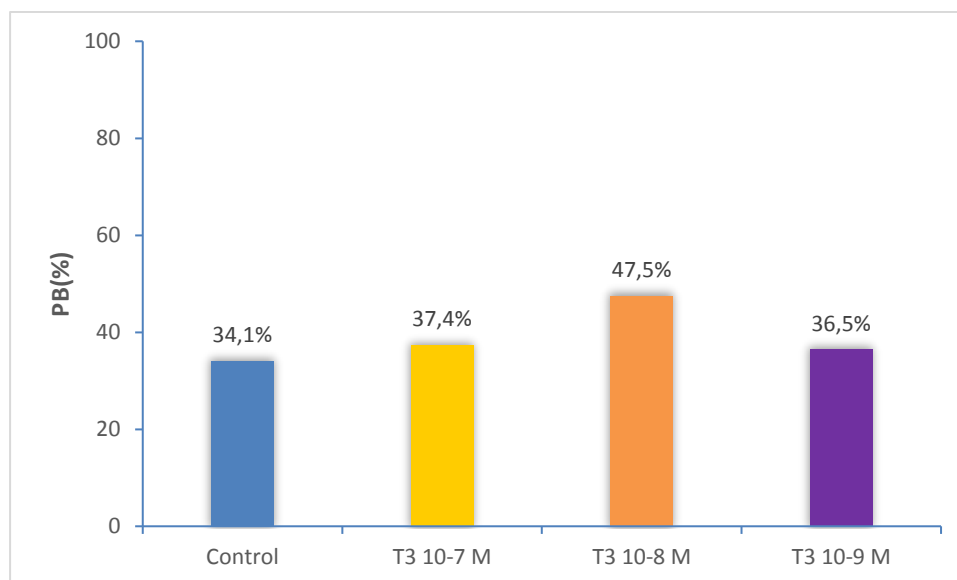
P b vs c : p-value στη σύγκριση T3 10⁻⁷ M vs T3 10⁻⁸ M

P b vs d : p-value στη σύγκριση T3 10⁻⁷ M vs T3 10⁻⁹ M

P c vs d : p-value στη σύγκριση T3 10⁻⁸ M vs T3 10⁻⁹ M

Ποσοστό PB			
	All	PB	%
Control^a	205	70	34,1
T3 10⁻⁷ M^b	214	80	37,4
T3 10⁻⁸ M^c	181	86	47,5
T3 10⁻⁹ M^d	189	69	36,5
P a vs b	0,490		
P a vs c	0,008		
P a vs d	0,624		
P b vs c	0,042		
P b vs d	0,856		
P c vs d	0,032		

Γράφημα 4: Ποσοστά ωρίμων ωαρίων μετάφασης II (PB) από ωάρια πρόφασης I (GV), για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3 (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M).



Σε ότι αφορά το ποσοστό των GVBD επί των συνολικών ωαρίων, στην ομάδα ελέγχου ήταν 51,2%, στην ομάδα T3 10^{-7} M ήταν 53,7%, στην ομάδα T3 10^{-8} M ήταν 63,0% και στην ομάδα T3 10^{-9} M ήταν 54,5% (Πίνακας 5, Γράφημα 5). Το ποσοστό της ομάδας T3 10^{-8} M ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο από το ποσοστό της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$) και έτεινε να είναι υψηλότερο και από τα ποσοστά των ομάδων T3 10^{-7} M και T3 10^{-9} M ($p < 0,1$) (Πίνακας 5).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I (στήλη «all») που εξελίχθηκαν σε ωάρια μετάφασης I (στήλη «GVBD») καθώς και τα ποσοστά εξέλιξης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3 (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Επίδραση της T3 στην εξέλιξη των ωαρίων πρόφασης I (GV) στο στάδιο της μετάφασης I (GVBD)

Στήλη «all» : Οι αριθμοί των ωαρίων πρόφασης I που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

Στήλη «GVBD» : Αριθμοί ωαρίων πρόφασης I που εξελίχθηκαν σε ωάρια μετάφασης I (GVBD) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

Στήλη «%» : Ποσοστά εξέλιξης των ωαρίων πρόφασης I (GV) σε ωάρια μετάφασης I (GVBD) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-7} M

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-8} M

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-9} M

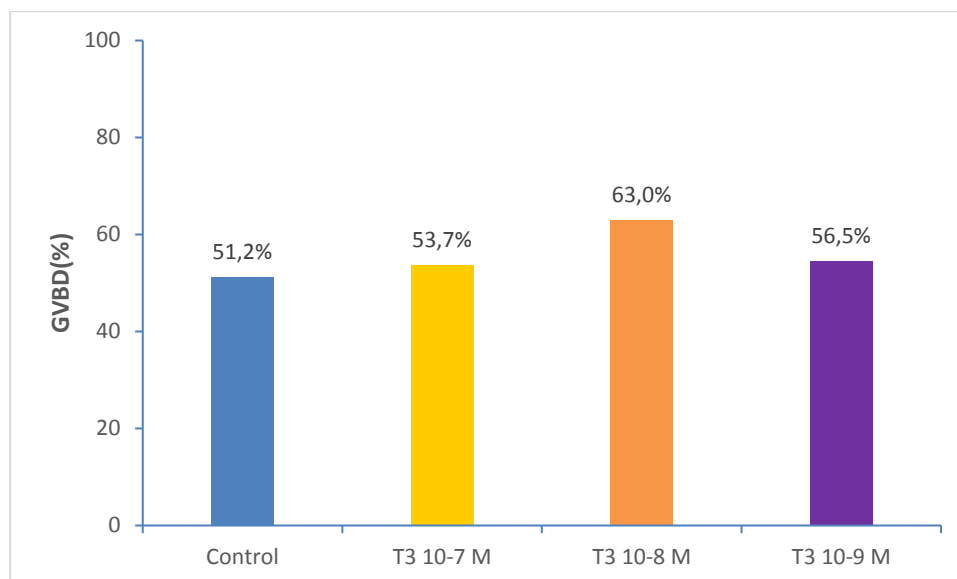
P b vs c : p-value στη σύγκριση T3 10^{-7} M vs T3 10^{-8} M

P b vs d : p-value στη σύγκριση T3 10^{-7} M vs T3 10^{-9} M

P c vs d : p-value στη σύγκριση T3 10^{-8} M vs T3 10^{-9} M

Ποσοστό GVBD			
	all	GVBD	%
Control^a	205	105	51,2
T3 10^{-7} M^b	214	115	53,7
T3 10^{-8} M^c	181	114	63,0
T3 10^{-9} M^d	189	103	54,5
P a vs b	0,606		
P a vs c	0,020		
P a vs d	0,515		
P b vs c	0,064		
P b vs d	0,879		
P c vs d	0,098		

Γράφημα 5: Ποσοστά ωρίων μετάφασης I (GVBD) για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3 (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M).



Τέλος σε ότι αφορά τα ποσοστά ωρίων ωρίων (PB) στο σύνολο των ωρίων μετάφασης I (GVBD), ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3, το ποσοστό των PB στο σύνολο των GVBD, στην ομάδα ελέγχου ήταν 66,7%, στην ομάδα T3 10^{-7} M ήταν 69,6%, στην ομάδα T3 10^{-8} M ήταν 75,4% και στην ομάδα T3 10^{-9} M ήταν 67,0% (Πίνακας 6, Γράφημα 6). Παρόμοια χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν τα ποσοστά PB στις 4 ομάδες ($p > 0,05$),

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι αριθμοί των ωρίων μετάφασης I (στήλη «GVBD») που εξελίχθηκαν σε ωρία μετάφασης II (στήλη «PB») καθώς και τα ποσοστά εξέλιξης (στήλη «%») ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3 (Πίνακας 6).

Πίνακας 6:

Επίδραση της T3 στην εξέλιξη των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) σε ώρια μετάφασης II (PB)

Στήλη «GVBD» : Οι αριθμοί των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) που μελετήθηκαν ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

Στήλη «PB» : Αριθμοί ωαρίων πρόφασης I που εξελίχθηκαν σε ώρια μετάφασης II (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

Στήλη «%» : Ποσοστά εξέλιξης των ωαρίων μετάφασης I (GVBD) σε ώρια μετάφασης II (PB) ξεχωριστά για την ομάδα ελέγχου και για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3

P a vs b : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-7} M

P a vs c : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-8} M

P a vs d : p-value στη σύγκριση Control vs T3 10^{-9} M

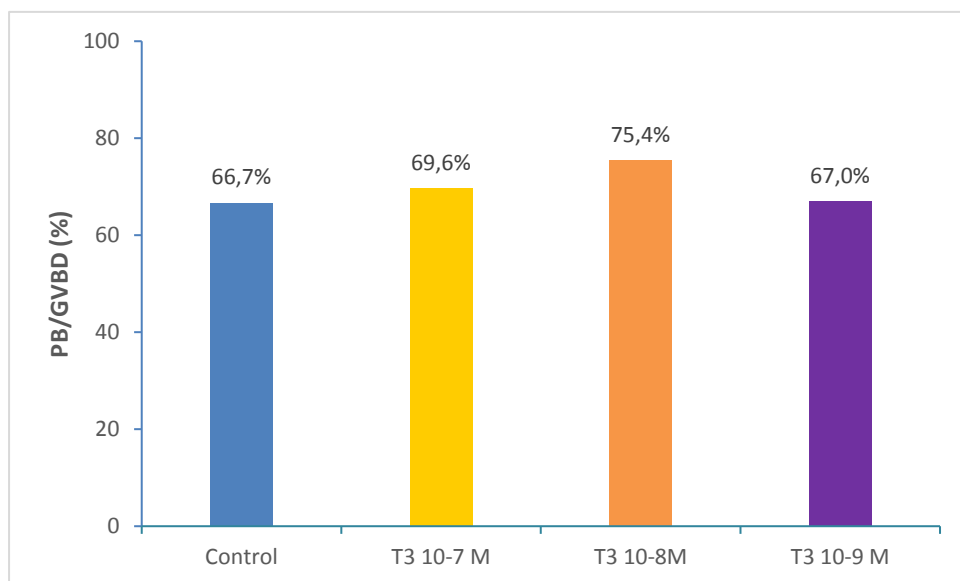
P b vs c : p-value στη σύγκριση T3 10^{-7} M vs T3 10^{-8} M

P b vs d : p-value στη σύγκριση T3 10^{-7} M vs T3 10^{-9} M

P c vs d : p-value στη σύγκριση T3 10^{-8} M vs T3 10^{-9} M

Ποσοστό PB/ GVBD			
	GVBD	PB	%
Control^a	105	70	66,7
T3 10^{-7} M^b	115	80	69,6
T3 10^{-8} M^c	114	86	75,4
T3 10^{-9} M^d	103	69	67,0
P a vs b	0,645		
P a vs c	0,152		
P a vs d	0,960		
P b vs c	0,320		
P b vs d	0,683		
P c vs d	0,169		

Γράφημα 6: Ποσοστά ωρίμων ωαρίων μετάφασης II (PB) από ωάρια μετάφασης I (GVBD), για την ομάδα ελέγχου (Control) και για καθεμιά από τις πειραματικές ομάδες με διαφορετική συγκέντρωση T3 (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M).



Γ.6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία προσανατολίζεται στις ενδιάμεσες επιδράσεις που έχει η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη TSH και η θυρεοειδική ορμόνη T3 στην ωοθυλακική ανάπτυξη και συγκεκριμένα στην ωρίμαση των ωαρίων.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες συμμετέχουν, αν και όχι καθοριστικά, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του γυναικείου γεννητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και πρώιμης νεογνικής περιόδου (75, 76). Η απορρύθμιση της θυρεοειδικής λειτουργίας, εκφραζόμενη είτε ως υπερ- είτε ως υποθυρεοειδισμός, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διαταραχών της εμμηνορρυσίας, αλλά και της γονιμότητας (75, 76), ενώ η υπο- ή υπερλειτουργία του θυρεοειδούς αδένος θεωρείται ότι συμβάλλει στις εκδηλώσεις αυτές μέσω των προκαλούμενων μεταβολών στην έκκριση των γοναδοτροπινών (38, 41, 77). Ωστόσο, η αναγνώριση της έκφρασης των υποδοχέων των θυρεοειδικών ορμονών στο ωοθυλάκιο, αφήνει να υπονοηθεί και ένας άμεσος ρόλος των ορμονών αυτών στη ρύθμιση της ωοθηκικής λειτουργίας.

Στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις TSH (1μg/ml, 0,5μg/ml και 0,1μg/ml) και T3 (10^{-9} M, 10^{-8} M και 10^{-7} M) που επιλέχθηκαν βασίστηκαν στο γεγονός ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις αναφέρονται τα περισσότερα δεδομένα στη βιβλιογραφία. Ως υλικό για την αξιολόγηση της επίδρασης των υπό εξέταση ορμονών επιλέχθηκαν τα ωάρια πρόφασης I (GV) και ως πειραματόζωο το ποντίκι, με δεδομένη την εμπειρία που έχει αποκτηθεί από προηγούμενες παρόμοιες μελέτες στο Εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του ΓΝΑ Αλεξάνδρα.

Η απομόνωση των ωαρίων πρόφασης I έγινε με μηχανικό διαχωρισμό με τη χρήση λεπτής βελόνας «ινσουλίνης» υπό το στερεοσκόπιο και η επιλογή του καλλιεργητικού μέσου (α-MEM), ο εμπλουτισμός του με γοναδοτροπίνες (FSH, LH), ορό εμβρύου βοός (FBS) και ITS και η επιλογή των καλλιεργητικών συνθηκών έγινε κατά τη συνήθη πρακτική του Εργαστηρίου, η οποία βασίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα και έχει πιστοποιηθεί με παρόμοιες μελέτες in vitro στο παρελθόν (88).

Η προσθήκη πηγής αζώτου (πρωτεΐνης) στο καλλιεργητικό μέσο θεωρείται αναγκαία για τις κυτταροκαλλιέργειες αυτού του είδους. Η παρασκευάστρια εταιρεία του ορού εμβρύου βοός (FBS) που χρησιμοποιήθηκε (Invitrogen) πληροφορεί για την παρουσία σε αυτό ελάχιστης ποσότητας ορμονών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και οι υπό μελέτη ουσίες TSH και T3. Ωστόσο, η προσθήκη μόλις 50 μl στο 1 ml καλλιεργητικού μέσου, που τοποθετείται σε κάθε τρυβλίο, καθιστά την ενδεχόμενη πρόσμιξη από τον ορό εμβρύου βοός αμελητέα, ενώ η προσθήκη της ίδιας ποσότητας τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στις ομάδες, που περιέχουν την υπό μελέτη ουσία στις διάφορες συγκεντρώσεις, δεν προβλέπεται να παρεμβαίνει στα αποτελέσματα της μελέτης.

Τα πειραματικά μας αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προσθήκη της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH στο καλλιεργητικό μέσο σε συγκέντρωση 1 μg/ml, 0,5 μg/ml και 0,1 μg/ml δεν έχει καμία επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων, όπως αυτή αξιολογείται από την παρατήρηση της μετάβασης στο στάδιο του πολικού σωματίου. Μπορεί στην ομάδα ελέγχου να είχε σχετικά υψηλότερα ποσοστά, ωστόσο αυτά δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά στις υπό εξέταση ομάδες.

Όσον αφορά την εκτίμηση του ποσοστού των ωοθυλακίων που φτάνουν στο στάδιο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD), το ποσοστό είναι παρόμοιο στην ομάδα ελέγχου και στις δυο ομάδες με μικρή συγκέντρωση θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH 0,5 μg/ml και TSH 0,1 μg/ml. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας TSH 1 μg/ml, με το ποσοστό να είναι υψηλότερο στην ομάδα TSH 1 μg/ml. Επίσης, με τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά, υψηλότερο ήταν το ποσοστό GVBD στην ομάδα TSH 1 μg/ml σε σύγκριση με τις ομάδες TSH 0,5 μg/ml και 0,1 μg/ml. Φάνηκε δηλαδή ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση TSH επέδρασε θετικά και «ώθησε» τα ωοθυλάκια να φτάσουν στο επόμενο στάδιο.

Σε προηγούμενη μελέτη που διενεργήθηκε στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριό μας, στην οποία αξιολογήθηκε η επίδραση της TSH στις ίδιες συγκεντρώσεις (1 μg/ml, 0,5 μg/ml και 0,1 μg/ml) σε μακράς διάρκειας καλλιέργεια προκοιλοτικών ωοθυλακίων επίμυος, δεν φάνηκε η παρουσία της να έχει επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων, όπως αυτή αξιολογήθηκε την

ημέρα 10 της καλλιέργειας, μετά την επαγωγή της ωοθυλακιορρηξίας από την hCG και τον EGF (78). Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι καθώς στη μελέτη αυτή, η επίδραση της TSH δεν αξιολογήθηκε σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας παρά μόνο στον τελικό σκοπό, στην ωρίμαση του ωαρίου του προκοιλοτικού ωοθυλακίου, πιθανές επιμέρους βραχυπρόθεσμες επιδράσεις της TSH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης δεν θα μπορούσαν να αποκαλυφθούν. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα δύνανται να λεχθεί ότι ίσως αποκάλυψαν μία τέτοια πιθανή ενδιάμεση θετική επίδραση της TSH στην εξέλιξη των ωαρίων πρόφασης I σε ώρια μετάφασης I (GVBD) στην υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (1μg/ml). Ωστόσο, η ευεργετική επίδραση της TSH δεν φάνηκε να συνεχίζεται στην μετέπειτα εξέλιξη των ωαρίων GVBD σε ώρια μετάφασης PB, αφού η μεγαλύτερη και η μικρότερη συγκέντρωση TSH (1μg/ml και 0,1μg/ml) είχαν αρνητική επίδραση, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω ερευνών.

Τα αποτελέσματά μας σε ότι αφορά τη θετική επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης TSH (1μg/ml) στην εξέλιξη των ωοθυλακίων πρόφασης I στο στάδιο GVBD, έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Upadhyaya και συνεργατών στον ιχθύ (Catfish *Mystus vitatus* - Bloch) (87) . Οι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση έξι υποφυσιακών ορμονών θηλαστικών στην ωρίμαση του ωαρίου, όπως αυτή εκφράζεται από το στάδιο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD). Η ορμόνη με τη μεγαλύτερη επίδραση ήταν η LH, ακολουθούσε η FSH, ενώ οι υπόλοιπες ορμόνες που εξετάστηκαν, μεταξύ των οποίων και η β υπομονάδα της TSH, δεν είχαν καμία επίδραση.

Η έρευνα μας περιορίζεται από το γεγονός ότι δεν μελετήθηκε η επίδραση της TSH στα επόμενα στάδια, της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στην προαναφερθείσα μελέτη από το Εργαστήριό μας, η TSH δεν φάνηκε να επηρεάζει την ωοθυλακιογένεση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, αν και διαπιστώθηκε μία τάση για στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση στην εξέλιξη στα εμβρυϊκά στάδια των 2- και 4-κυττάρων των γονιμοποιημένων ωαρίων, που προέκυψαν μετά την *in vitro* ανάπτυξη των προκοιλοτικών ωοθυλακίων με την παρουσία της εν λόγω συγκέντρωσης TSH (1 μg/ml)(78).

Στην έρευνα μας μελετήθηκε ακόμη η επίδραση της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στα δυο διακριτά μορφολογικά στάδια ωρίμασης των ωαρίων του επίμουσ (GVBD και PB). Η T3 στην ενδιάμεση συγκέντρωση 10^{-8} M είχε ευεργετική επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων πρόφασης I σε ωάρια μετάφασης II (PB). Συγκεκριμένα, το ποσοστό ώριμων ωαρίων στην ομάδα T3 10^{-8} M ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο συγκρινόμενο με τα ποσοστά τόσο της ομάδας ελέγχου όσο και με των υπολοίπων άλλων δύο ομάδων T3 (T3 10^{-7} M και T3 10^{-9} M). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο ποσοστό των ωαρίων που έφτασαν στο στάδιο της διάσπασης του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) με το ποσοστό της ομάδας T3 10^{-8} M να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο συγκρινόμενο με το ποσοστό της ομάδας ελέγχου και με τάση στατιστικής σημαντικότητας υψηλότερο συγκρινόμενο με τα ποσοστά των ομάδων T3 10^{-7} M και T3 10^{-9} M. Η θετική αυτή επίδραση της T3 δεν φάνηκε να εξακολουθεί στη μετάβαση από το στάδιο μετάφασης I (GVBD) στο στάδιο μετάφασης II (PB), αφού τα ποσοστά μετάφασης II (PB) στην ομάδα ελέγχου και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις T3 (T3 10^{-7} M, T3 10^{-8} M, T3 10^{-9} M) ήταν παρόμοια χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών διαφέρουν μεταξύ τους με κάποιες εξ'αυτών να συντάσσονται με τα δικά μας αποτελέσματα και άλλες να αντιτάσσονται σε αυτά.

Ειδικότερα, τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με την προαναφερθείσα μελέτη από το Εργαστήριό μας, στην οποία παράλληλα με την επίδραση της TSH, αξιολογήθηκε και η επίδραση της T3 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (T3 10^{-7} M, T3 10^{-8} M, T3 10^{-9} M) σε μακράς διάρκειας καλλιέργεια προκοιλοτικών ωοθυλακίων επίμουσ. Στη μελέτη αυτή, η παρουσία της T3 στην ενδιάμεση και στη χαμηλή συγκέντρωση (T3 10^{-8} M και T3 10^{-9} M) φάνηκε να έχει αρνητική επίδραση στην ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμαση των ωαρίων, όπως αυτή αξιολογήθηκε την ημέρα 10 της καλλιέργειας, μετά την επαγωγή της ωοθυλακιορρηξίας από την hCG και τον EGF (78). Στην υψηλή συγκέντρωση 10^{-7} M είχε μία τάση για στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ωρίμανσης των ωαρίων. Η περαιτέρω σύγκριση των ομάδων T3 10^{-9} M, T3 10^{-8} M και T3 10^{-7} M μεταξύ τους κατά ζεύγη δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Φάνηκε δηλαδή ότι η T3 επιδρά αρνητικά στην

ωοθυλακική ωρίμαση των προκοιλοτικών ωοθυλακίων, όπως αυτή εκφράζεται με την τελική ωρίμαση του αναπτυσσόμενου ωαρίου, με έμφαση στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 10^{-9} και 10^{-8} M. Ωστόσο, και πάλι θα πρέπει να αναφερθεί ότι καθώς στη μελέτη αυτή, η επίδραση της TSH δεν αξιολογήθηκε σε ενδιάμεσες χρονικές φάσεις κατά την διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας παρά μόνο στον τελικό σκοπό, στην ωρίμαση του ωαρίου του προκοιλοτικού ωοθυλακίου, πιθανές επιμέρους βραχυπρόθεσμες επιδράσεις της TSH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ανάπτυξης δεν θα μπορούσαν να αποκαλυφθούν. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα δύναται να λεχθεί ότι ίσως αποκάλυψαν μία τέτοια πιθανή ενδιάμεση θετική επίδραση της T3 στην εξέλιξη των ωαρίων πρόφασης I στο στάδιο της μετάφασης I (GVBD) και μετάφασης II (PB) στην ενδιάμεση από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($T3 10^{-8}$ M).

Αρνητική δόσοεξαρτώμενη επίδραση της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην ωρίμαση των ωαρίων στα επιμέρους στάδια και στην ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμαση βρήκαν οι Cecconi και συνεργάτες, όταν αυτή προστίθεται στο καλλιεργητικό μέσο παρουσία της FSH, η οποία έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και το σχηματισμό του ωοθυλακικού άντρου (72). Ωστόσο, η ανασταλτική δράση της T3 ήταν αναστρέψιμη, αφού η διακοπή της επίδρασης της για κάποια χρονική στιγμή στη διάρκεια των 6 ημερών της καλλιέργειας διέσωσε κάποια ωοθυλάκια, τα οποία αναπτύχθηκαν στο στάδιο του ωοθυλακίου με άντρο και τα ωοκύτταρά τους ολοκλήρωσαν την ωρίμασή τους στο στάδιό του πολικού σωματίου (72).

Αντίθετα, σε άλλη έρευνα τα αποτελέσματα στηρίζουν τη θετική επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας FSH και T3 στην ανάπτυξη ωοθυλακίων, παρόλο που η επίδραση μόνο της T3 δεν είχε καμία επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων (74).

Συμπερασματικά, στη μελέτη αυτή δείξαμε ότι η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη TSH στο καλλιεργητικό μέσο σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και 0,1 $\mu\text{g/ml}$ δεν έχει καμία επίδραση, ενώ η θυρεοειδική ορμόνη T3 στην ενδιάμεση συγκέντρωση 10^{-8} M έχει θετική επίδραση στην ωρίμαση των ωαρίων πρόφασης I σε ωάρια μετάφασης II (PB). Τα αντικρουόμενα δεδομένα που συχνά αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση ενός παράγοντα στην ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμαση, θα πρέπει να εξετάζονται

με σκεπτικισμό. Επιπλέον, ακόμη και η διαπίστωση της απουσίας επίδρασης του υπό μελέτη παράγοντα στην ωρίμαση, δεν δύναται να αποκλείσει την επίδραση σε άλλες λειτουργίες του ωοκυττάρου απαραίτητες για τα μετέπειτα στάδια της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Για παράδειγμα, είναι πιθανόν το mRNA των υποδοχέων της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και των θυρεοειδικών ορμονών και τα συνοδά πρωτεϊνικά προϊόντα να αποθηκεύονται στο ωοκύτταρο και να καθίστανται λειτουργικά μονάχα στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης (83). Ωστόσο, οι αντικρουόμενες αναφορές για την επίδραση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και της θυρεοειδικής ορμόνης T3 στην ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμαση στα διάφορα είδη ζώων, πιθανόν να απορρέουν από εγγενείς ιδιομορφίες της ωοθυλακιογένεσης μεταξύ των διαφόρων ειδών. Οι αντικρουόμενες αναφορές σε μελέτες, που αφορούν το ίδιο είδος, πιθανόν να αποδίδονται σε διαφορές του πειραματικού σχεδιασμού. Συγκεκριμένα, είναι δυνατόν οι επιδράσεις να διαφοροποιούνται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα της θήκης, συνδυασμός κοκκωδών κυττάρων και κυττάρων της θήκης, συμπλέγματα κοκκωδών κυττάρων-ωοκυττάρου [COCs], προκοιλιακά ωοθυλάκια), το θρεπτικό μέσο (πηγή πρωτεΐνης, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες), το στάδιο ωοθυλακίων και τη χρονική διάρκεια καλλιέργειας.

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει στη διάρκεια της καλλιέργειας, αφού σε κάποιες μελέτες η επίδραση των θυρεοειδικών ορμονών είναι εμφανής μετά από κάποιες ώρες ή ημέρες παρακολούθησης (89). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η θυρεοειδοτρόπος TSH και η θυρεοειδική ορμόνη T3 ασκούν μία απώτερη επίδραση, η οποία δύναται να εκδηλωθεί μεταγενέστερα αυξάνοντας ή μειώνοντας το συνολικό μεταβολικό δυναμικό των κυττάρων, γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώσουν στην καλλιέργεια ή να οδηγηθούν σε απόπτωση αντίστοιχα. Γενικά, οι διαφορές σχεδιασμού μεταξύ των μελετών φαίνεται ότι ευθύνονται για τις λιγότερο ή περισσότερο αποκλίνουσες παρατηρήσεις (78).

Δ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G Morvan-Dubois et al. *Curr Top DevBiol* 103, 365-396. 2013.
2. Aghajanova L, Hamilton A, Kwintkiewicz J, Vo KC, Giudice LC. Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal cells from women with versus without endometriosis. *Biol. Reprod.* 2009;80:105–114.
3. N.N. Costa, M.S. Cordeiro et al, Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes, *Theeriogenology*, 2013;80(4):295-301.
4. M. De Silva, A.W. Pearl et al., Thyroid stimulating hormone causes cumulus expansion in mouse oocytes, *Theeriogenology*, 1994; 41(4): 899-905.
5. Chaminda N. Walpita, Serge Van der Geyten et al, The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors, *Gen Comp Endocrinol.* 2007;152(2-3):206-14.
6. J. Larry Jameson «Harrison Ενδοκρινολογία», Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., Αθήνα, 2007, ISBN: 978-960-394-481-2
7. Lee Goldman, MD-J. Claude Bennet, MD «Cecil Νοσολογία, Φυσιοπαθολογία-Διάγνωση-Θεραπεία», 2ος τόμος, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2002, ISBN: 960-399-037-X
8. Susan E. Mulroney-Adam K. Myers «Βασικές αρχές φυσιολογίας του ανθρώπου», Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης Ε.Π.Ε., Αθήνα, 2010, ISBN: 978-960-489-069-9
9. Ελένη Χαρατσή-Γιωτάκη «Σύγχρονη Εσωτερική Παθολογία», Ιατρικές και Επιστημονικές Εκδόσεις Σιώκης, Αθήνα, 2010, ISBN: 978-960-7461-71-1
10. Μενέλαος Μπατρίνος «Σύγχρονη Ενδοκρινολογία, Για τον Γενικό Γιατρό», Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2007, ISBN: 978-960-399-531-9
11. Kumar Parveen-Clark Michael «Παθολογία», 2η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2007, ISBN: 978-960-372-091-7
12. G Michael Besser and Michael O Thorner «Comprehensive Clinical Endocrinology», 3rd edition, Mosby Elsevier Science Limited, Spain, 2002, ISBN: 0 7234 3185

13. Andreoli, Bennett, Carpenter, Plum Smith «Cecil Παθολογία», 3^η έκδοση, Βτόμος, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1996, ISBN: 960-7081-80-3
14. Nunez Miguel R, Sanders J, Jeffrey J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B & Furmaniak J 2004 Analysis of the TSH receptor–TSH interaction by comparative modelling. *Thyroid* 14 991–1011.
15. Baltoumas F.A., Theodoropoulou M.C., Hamodrakas S. J. Interactions of the alpha- subunits of heterodimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *Journal of Structural Biology* Vol. 182, No. 3(2013), pp. 209-218.
16. Kohn LD, Shimura H, Shimura Y, Hidaka A, Giuliani C, Napolitano G, et al. The thyrotropin receptor. *Vitam Horm.* 1995;50:287-384.
17. Kumar RS, Ijiri S, Kight K, Swanson P, Dittman A, Alok D, et al. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;167(1-2):1-9.
18. Yoshimura M, Hershman JM, Pang XP, Berg L, Pekary AE. Activation of the thyrotropin (TSH) receptor by human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone in Chinese hamster ovary cells expressing functional human TSH receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(4):1009-13.
19. Gosden R. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. In: Grudzinskas J, Yovich J, editors. *Gametes-The Oocyte*: Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 119-49.
20. Kobayashi M, Nakano R, Ooshima A. Immunohistochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the 'two-cell, two gonadotrophin' hypothesis of steroidogenesis in the human ovary. *J Endocrinol.* 1990;126(3):483-8.
21. Abell AN, McCormick DJ, Segaloff DL. Certain activating mutations within helix 6 of the human luteinizing hormone receptor may be explained by alterations that allow transmembrane regions to activate Gs. *Mol Endocrinol.* 1998;12(12):1857-69.
22. H. Maurice Goodman: Hormonal control of reproduction in the female: The menstrual cycle: in *Basic Medical Endocrinology*, 2009

23. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000;21(2):200-14.
24. Tsafiriri A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press; 1994. p. 817–60.
25. Jabbour, H.,N., Kelly, R.,W., Fraser H.,M, and Critchley H.,O.,D. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr. Rev.* 27:17-46, 2006
26. Mitchell P., Rosen MD, and Marcelle I. Cedars, MD. Female reproductive Endocrinology and infertility, in: Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology, 2007
27. Μπόντης, Μ. Ι. (2003). Βασικές γνώσεις Μαιευτικής και Γυναικολογίας. Θεσσαλονίκη: University Studio Press
28. Embryology. In: de Swiet M, Chamberlain G, Bennet P, editors. *Basic Science in Obstetrics and Gynaecology a textbook For MRCOG Part 1* 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 2007. p.21-46.
29. Tam PP, Snow MH. The in vitro culture of primitive-streak-stage mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1980;59:131-43.
30. Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1981 Jun;63:75-84.
31. van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005 Apr;1;63(6):1717-51.
32. B. Hogan, Constantini F, Lacy Elizabeth. Early mouse development. In: B. Hogan, Constantini F, Lacy Elizabeth, editors. *Manipulating the mouse embryo A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory; 1986. p. 19-70.
33. Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *AnatEmbryol (Berl).* 1997;195(4):327-36.
34. Pan H, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Dev Biol.* 2005;286(2):493-506.
35. Eppig JJ, O'Brien MJ. Waymouth Medium Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.* 1996;54(1):197-207.

36. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1151-8.
37. Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1181-8.
38. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction.* 2005;130(2):147-56.
39. Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod.* 1997;12(4):759-68.
40. Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod.* 1998;13(5):1292-302.
41. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update* 1998; 4:103-120.
42. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK et al. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction* 1995; 10:3243-3247.
43. Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 h. *Fertility and Sterility* 2000; 73:541-544.
44. Hovatta O, Silye R, Abir R et al. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction* 1997; 12:1032-1036.
45. Hovatta O, Wright C, Krausz T et al. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction* 1999; 14:2519-2524.
46. Moor RM, Dai Y, Lee C et al. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction Update* 1998; 4:223-236.

47. Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H et al. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; 53:69-77.
48. Davis JA, Linzer DH. Expression of multiple forms of the prolactin receptor. *Molecular Endocrinology* 1989; 3:674-680
49. Arden KC, Boutin JM, Djiane J et al. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1990; 53:161-165.
50. Shirota M, Banville D, Ali S et al. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 1990; 4:1136-1143.
51. Clarke DL, Linzer DI. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology* 1993; 133:224-232.
52. Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H et al. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; 53:69-77.
53. Kline JB, Roehrs H, Clevenger et al. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:35461-35468.
54. Hu ZZ, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of two novel isoforms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:41086-41094.
55. Bignon C, Binart N, Ormandy CJ et al. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. *Journal of Molecular Endocrinology* 2003; 19:109-120.
56. Ormandy CJ, Camus A, Barra J et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & Development* 1997; 11:167-178.
57. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 1998; 19:225- 268.

58. Yohkaichiya T, Fukaya T, Hoshiai H et al. Improvement of mouse embryo development in vitro by prolactin. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1988; 155:241-246.
59. Yoshimura Y, Hosoi Y, Iritani A et al. Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biology of reproduction* 1989; 41:26-33.
60. Yoshimura Y, Nakamura Y, Yamada H et al. Possible contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation. *Hormone Research* 1991; 35(Suppl 1):22-32.
61. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. The mechanism of growth-promoting effects of prolactin in embryogenesis-- links to growth factors. *Cells, tissues, organs* 1999; 164:2-13.
62. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis D et al. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Hormones* 2005; 4:155-160.
63. Izadyar F, Zhao J, Van Tol, HTA et al. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes(COCs) during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53:398-406.
64. Zhao J, Van Tol HTA, Taverne MAM et al. The effect of growth hormone on pre-antral follicles in vitro. *Zygote* 2000; 8:275-283.
65. Apa R, Lanzone A, Miceli F et al. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulusenclosed rat oocytes. *Molecular Cell Endocrinology* 1994; 106:207-212.
66. Liu X, Kazumichi A, Yokota H et al. Effects of growth hormone, activin and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998; 139:2342-2347.
67. Zhou J, Bondy C. Anatomy of the human ovarian insulin- like growth factor system. *Biology of Reproduction* 1993; 43:467-474.
68. Gomez E, Tarin JJ, Peicer A. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertility and Sterility* 1993; 60:40-46.
69. Hartshorne GM. In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod.* 1997;2(2):94-104.
70. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The in vitro growth and maturation Ricardo Núñez Miguel, Jane Sanders, Jennifer Jeffreys, Hilde

- Depraetere, Michele Evans, Tonya Richards, Tom L. Blundell, Dr. Bernard Rees Smith, and Jadwiga Furmaniak. Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid*. January 2004, 14(12): 991-1011. doi:10.1089/thy.2004.14.991.
71. Cortvrindt R, Smitz J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *ReprodDomest Anim*. 2001;36(1):3-9.
72. Cecconi S, Rossi G, Coticchio G, Macchiarelli G, Borini A, Canipari R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro. *FertilSteril*. 2004 Mar;81(Suppl 1):919-24.
73. Tamura K, Hatsuta M, Watanabe G, Taya K, Kogo H. Inhibitory regulation of inhibin gene expression by thyroid hormone during ovarian development in immature rats. *BiochemBiophys Res Commun*. 1998;242(1):102-8.
74. Kobayashi N, Orisaka M, Cao M, Kotsuji F, Leader A, Sakuragi N, et al. Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development. *Endocrinology*. 2009;150(112):5566-74.
75. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.
76. Bergh PA, Navot D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *J Assist Reprod Genet*. 1992;9(5):429-38.
77. Cha KY, Koo JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture invitro and their transfer in a donor oocyte program. *FertilSteril*. 1991;55(1):109-13.
78. Παρτσινέβελος, Γ. (2014). Μελέτη της επίδρασης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και των θυρεοειδικών ορμονών στην invitro ανάπτυξη πρώιμων πρωτογενών ωοθυλακίων επίμυος, στη γονιμοποίηση και στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη στο στάδιο της βλαστοκύστης και η ανίχνευση της έκφρασης των υποδοχέων τους στα διάφορα στάδια ωρίμασης των ωοθυλακίων. Doctoral dissertation. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).
79. Qvist R, Blackwell LF, Bourne H, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages in vitro. *J Reprod Fertil*. 1990;89(1):169-80.

80. Witschj E. Migration of the germ cells of the human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol.* 1948;36:67
81. Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: The cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod.* 1996;54(1):22-8.
82. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril.* 1997;67(3):481-6.
83. Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F. Biology and biotechnology of follicle development. *Scientific World Journal* 2012;938138.
84. Hardarson et al., 2003, ESHRE Embryology Atlas
85. Sadler T.W., Chapter 2. First week of Development: Ovulation to Implantation In: Langman's Medical Embryology 8th Ed, Suxan Kartz Editor, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp 31-48
86. Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1981 Jun;63:75-84.
87. Upadhyaya N, Haider S. Germinal vesicle breakdown in oocytes of catfish, *Mystus vittatus* (Bloch): in vitro effectiveness of mammalian pituitary hormones. *Gen Comp Endocrinol.* 1987;65(3):496-500.
88. Dinopoulou V, Drakakis P, Kefala S, et al. Effect of recombinant-LH and hCG in the absence of FSH on in vitro maturation (IVM) fertilization and early embryonic development of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes. *Reprod Biol.* 2016;16(2):138-146
89. Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Yamamoto T, Okada H, Mochizuki M. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 1987;121(4):1233-41