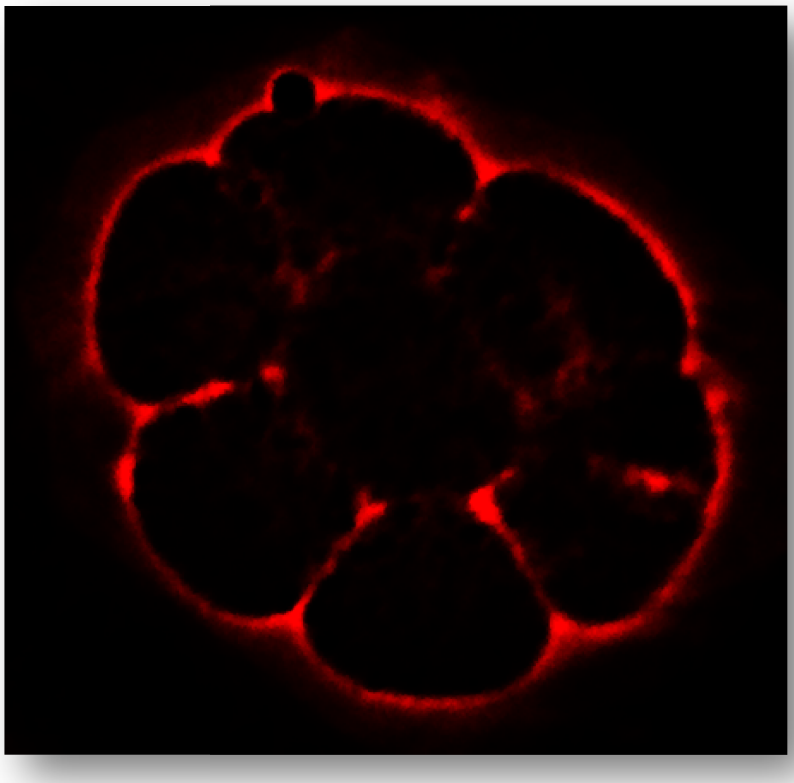
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ(INTEGRINS,CADHERINS) ΣΤΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΥΠΕΡΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ L-CARNITINE



ΑΝΥΦΑΝΤΑΚΗ ΑΛΙΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας, στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Επιβλέπων Καθηγητής: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΕΙΡΗΝΗ ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΧΡΗΣΤΟΣ ΤΣΑΤΣΑΝΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΕΙΡΗΝΗ ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΧΡΗΣΤΟΣ ΤΣΑΤΣΑΝΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ, ς Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΤΑΛΛΙΩΤΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης.

Στην κόρη μου Μαριάμ να θυμάται ότι:

Δεν πρέπει να παύουμε να εξερευνούμε

και το τέλος όλης της εξερεύνησης μας

θα είναι να φτάσουμε στο σημείο απ' όπου ξεκινήσαμε

και να γνωρίσουμε τον τόπο για πρώτη φορά.

"T.S Eliot"

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης για τη δυνατότητα εκπόνησης και επανεκκίνησης της διδακτορικής μου μελέτης.

Η μητέρα μου συνήθιζε να με πειράζει αποκαλώντας με" γεροντοφοιτήτρια". Όμως εγώ ήξερα ότι η γνώση είναι απεριόριστη και χωρίς χρονικά όρια. Μ' έμαθε να παλεύω όπως έκανε και η ίδια στη ζωή και στον θάνατο της σαν λιοντάρι. Μια από τις ιδιότητες του κλινικού εμβρυολόγου είναι το κυνήγι του θετικού αποτελέσματος και της εγκυμοσύνης με οποιοδήποτε κόστος σωματικό, ψυχικό, οικονομικό. Είκοσι έξι χρόνια ως κλινική εμβρυολόγος αισθάνομαι πάντα μέσα μου θλίψη και εν μέρη υπεύθυνη για κάθε γυναίκα που δεν κατορθώνει να κάνει το όνειρό της πραγματικότητα και ρωτάει, τι φταίει και δεν μένω έγκυος αφού μου είπατε ότι έχω καλής ποιότητας έμβρυα; Τις περισσότερες φορές δεν μπορούσα να βρω μια σαφή απάντηση αφού ουσιαστικά δεν υπήρχε. Η μελέτη μου με βοήθησε να ολοκληρώσω το δικό μου "πάζλ " να βρω τις δικές μου απαντήσεις.

Θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην κα Ε. Αθανασάκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την παρότρυνσή της για την επανεκκίνηση εκπόνησης της διατριβής που είχα ξεκινήσει το 2011, αλλά την οποία για τεχνικούς λόγους χρειάστηκε να σταματήσω. Η κα. Ε. Αθανασάκη είναι ένας άνθρωπος που έχει το χάρισμα να μεταδίδει τη γνώση και να ανάβει από το λυχνάρι της τα κεριά των άλλων, χωρίς να αλλοιώνεται πότε η φλόγα της. Με αγάπη για τον συνάνθρωπο της και με μεγάλο σεβασμό στη φύση, που όμως καθημερνά με βαθιά ευφορία προκαλεί την πραγματικότητα της και τα μυστήρια που κρύβονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και κυττάρων και επινοεί απαντήσεις σε άλυτα θέματα. Εκπληρώνει κάθε φιλοδοξία για γνώση ενός σπουδαστή η ερευνητή εμφανίζοντας μπροστά στα έκπληκτα μάτια τους σαν να το έβλεπαν για πρώτη φορά την επίγνωση των δυνατοτήτων τους. Την ευχαριστώ για την δυνατότητα που μού έδωσε να εργαστώ στο τμήμα της, την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη όλο αυτό το χρονικό διάστημα που συνεργαστήκαμε και τις πολύτιμες συμβουλές κατά την διάρκεια της συγγραφής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Α. Ζαφειρόπουλο του Τμήματος Ιατρικής, του Τομέα Κλινικής Ιολογίας - Βιολογίας εξωκυττάριου χώρου για το ενεργό και αμέριστο ενδιαφέρον για την παρούσα μελέτη όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ήταν πάντα γενναιόδωρος στη διάθεση του πολύτιμου χρόνου του, για να με κατευθύνει, να με καθοδηγήσει αλλά και να με εμψυχώνει.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ .Χ. Τσατσάνη του Τμήματος Ιατρικής, του Τομέα Κλινικής Χημείας για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, για τον χρόνο και την διαθεσιμότητά του.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Π., Θεοδωρόπουλο του Τμήματος Ιατρικής, του Τομέα Βιοχημείας, τον Καθηγητή κ. Ι. Ματαλλιωτάκη του Τμήματος Ιατρικής, του Τομέα Μαιευτικής-Γυναικολογίας, τον Καθηγητή κ. Γ Χαλεπάκη του Τμήματος Βιολογίας, τον Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο του Τμήματος Ιατρικής, του Τομέα Κλινικής Ιολογίας, για την προθυμία τους να ελέγξουν την παρούσα εργασία, επενδύοντάς την έτσι με το σημαντικό επιστημονικό κύρος τους.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Μ. Φραϊδάκη διευθυντή της ΜΙΥΑ Κέντρο Γονιμότητας Κρήτης και συνεργάτη μου για 26 χρόνια, έναν άρτιο, και οξυδερκή επιστήμονα που χάρη στην επιμονή και την εργατικότητά του ήταν ο πρώτος που πρόσφερε στα υπογόνιμα ζευγάρια της επαρχίας μας συνθήκες εφάμιλλες με τις καλύτερες ΜΙΥΑ διεθνώς. Στάθηκε δίπλα μου έμπρακτα στηρίζοντας την προσπάθεια μου από την αρχή έως το τέλος δείχνοντας πάντα εμπιστοσύνη στις δυνατότητές μου.

Ευχαριστώ όλες τις συναδέρφους και συνεργάτες από την ΜΙΥΑ Κέντρο Γονιμότητας Κρήτης γιατί όλοι τους συνέβαλαν, με το δικό τους τρόπο στην επίτευξη του στόχου μου, ιδιαίτερα τη Βιβή που ήταν πάντα πρόθυμη να μου συμπαρασταθεί.

Ευχαριστώ την Χρύσα για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και επισημάνσεις κατά την διάρκεια της συγγραφής.

Επιπλέον, να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας και ιδιαίτερα στους Χριστιάνα, Κική, Ειρήνη, Ιωάννα, Κατερίνα, Δημήτρη, Νίκο, Τάνια γιατί με αποδέχτηκαν, με δίδαξαν και μου επέτρεψαν να δανειστώ λίγο από τη φρεσκάδα και τον αυθορμητισμό της νιότης τους αποσυμφορίζοντας με από την καθημερινότητα του εργαστηρίου εμβρυολογίας. Εύχομαι η έξοχη επιστημονική τους κατάρτιση να τους βοηθήσει να εκπληρώσουν τις προσδοκίες τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του τμήματος Μικροσκοπίας για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσαν να δουλεύω προχωρημένες ώρες στο χώρο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αγαπημένα μου πρόσωπα που χωρίς αυτά θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Τις φίλες μου Μελτίνη, Νατάσσα, Πέρσα, Εύα, Ελένη που ήταν πάντα δίπλα μου εμψυχώνοντάς με, αλλά και προσφέροντάς απλόχερα τη βοήθεια τους σε καθημερινά μου προβλήματα.

Την αμέριστη ευγνωμοσύνη και το ευχαριστώ μου για τον Θεόδωρο και την Κατερίνα που στάθηκαν δίπλα μου με πολύ αγάπη και κατανόηση σε μια από τις πιο πιεσμένες περιόδους της ζωής μου.

Η μεγαλύτερη δυσκολία στην προσπάθεια μου αυτή ήταν η αγωνία μου για τις ώρες που στερούσα από την παρουσία μου στο παιδί μου, στο όποιο οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ, για την υπομονή και την αγάπη του, χωρίς αυτό δεν θα τα είχα καταφέρει. Το ευχαριστώ για τα πειράγματά του που συνοδευόταν πάντα από ένα τρανταχτό γέλιο "μαμά ακόμα γράφεις αυτή τη σελίδα δεν θα τελειώσεις ποτέ". Το όποιο, όπως έλεγε, το υπέρ νευρίαζα για τις ατέλειωτες ώρες που περνούσαμε τα σαββατοκύριακα στο εργαστήριο, έμαθε όλους τους διαδρόμους του Πανεπιστημίου. Εύχομαι να μπορέσει να περπατήσει στη ζωή της στους δικούς της διαδρόμους που θα την οδηγήσουν στην εκπλήρωση των στόχων και ονείρων της. Να μην ξεχνάει πότε ότι τα εμπόδια και οι τοίχοι που θα συναντήσει υπάρχουν για κάποιο λόγο. Δεν θα βρίσκονται εκεί για να την κρατήσουν απ' έξω, αλλά για να της δώσουν την ευκαιρία να αποδείξει πόσο πολύ θέλει κάτι, γιατί εάν μπορεί να το ονειρευτεί σημαίνει ότι μπορεί και να το κάνει.

Δημοσιεύσεις

1. Differential integrin expression in pre-implantation embryos developing under *in vivo* and *in vitro* conditions. Aliki Anyfantaki, Christiana Kyvelidou, Margarita Tsagkaraki, George Filippidis, Mattheos Fraidakis, Alexandros Zafiropoulos, IreneAthanassakis. Reproductive Biology. 18(3): 2018.

Συνέδρια

1. ***Study of the expression of intergnin αν β3 during embryo development.*** Anifantaki A., Magarakis L., Rolaki A., Koumantakis E., Fraidakis M., Makrigiannakis A. *5th MSRM annual meeting, 27 – 29 April 2007, Heraklion, Crete, Greece.*
2. ***Third harmonic generation in preimplantantation embryos.*** Kyvelidou C., Tserevelakis, J.G., Filippidis, G., Anifantaki A., Kakouri P., Fotakis, C., Athanassakis E. *14th International symposium for immunology of Reproduction (ISIR) Conference hosted by the American Society for Reproductive Immunology*, Boston, MA, US, *May 29-June 2, 2013.*
3. ***Embryonic αvb3 integrin expression in 2-cell and 4-cell mouse embryos after ovarian stimulation.*** Anifantaki A., Fraidakis M., Tsakoumi. P., Mathioudakis E., Neofytou E., Stathopoulou C., Athanassaki E. ***ESRI*** *Kos Island ,October2nd2017.*
4. ***Μελέτη της εμβρυικής έκφρασης της ιντεγκρίνης αvb3 σε έμβρυα ποντικιών 2 και 4 κυττάρων μετά από διέγερση ωοθηκών.*** Ανυφαντάκη Α., Φραιδάκης Μ., Τσακούμη Π., Κουκάκη Ε., Αποστολάκη Ζ., Σαχούλη Ε., Αθανασάκη Ε. *5ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Γονιμότητας & Στειρότητας Δεκέμβριος 2016, Θεσσαλονίκη – Ελλάδα.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Παρά τις βελτιώσεις της τεχνολογίας και της τεχνογνωσίας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στον άνθρωπο, τα ποσοστά εγκυμοσύνης παραμένουν χαμηλά λόγω της ανισορροπίας αλληλεπίδρασης εμβρύου και μήτρας μετά από διέγερση των ωοθηκών. Η φυσιολογική αναπαραγωγική διαδικασία ελέγχεται από ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται είτε μεταξύ των κυττάρων, είτε μεταξύ των κυττάρων και των στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ). Στις κυτταρικές αυτές αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται κύτταρα, συνδετικά μόρια, μόρια προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους και μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καθώς και τους υποδοχείς αυτών. Η πιο σημαντική ομάδα αυτών των υποδοχέων είναι οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως μόρια συνάφειας που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι ιντεγκρίνες είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται τόσο στις διακυτταρικές συνδέσεις όσο και στις συνδέσεις με μόρια του εξωκυττάριου χώρου, επιτρέποντας έτσι την οργάνωση των κυττάρων και των ιστών. Από τα ασπόνδυλα έως τα σπονδυλωτά, οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση, την ανάπτυξη των εμβρύων και την πλακουντοποίηση. Ειδικά στα θηλαστικά, οι αλληλεπιδράσεις ΕΘΟ με το επιθήλιο που φιλοξενεί κάθε εμβρυϊκό στάδιο διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην τύχη του αναπτυσσόμενου εμβρύου, την ικανότητά του να μεταναστεύει στη μήτρα, να εμφυτευτεί και να αναπτυχθεί μέχρι τη γέννηση. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται νέα δεδομένα για την συμμέτοχη των μορίων συνάφειας στην αναπαραγωγική διαδικασία. Στο πλαίσιο της διερεύνησης του ρόλου των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του εξωκυττάριου χώρου κατά την αναπαραγωγική διαδικασία μελετήσαμε την επίδραση του πρωτόκολλου διέγερσης των ωοθηκών και της βιοψίας εμβρύου στην εμβρυική έκφραση των ιντεγκρινών και καδερινών, καθώς και την πιθανή ρύθμιση της έκφραση αυτών παρουσία της L-καρνιτίνης (L-Cn). Επικεντρωθήκαμε στην έκφραση των ιντεγκρινών αvb3, α5b1, αv, α6b1και της Ε-καδερίνης σε ζυγώτες και διαφορετικά στάδια εμβρύων που αναπτύχθηκαν σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας ή απομονώθηκαν απευθείας από το ζώο *in vivo.* Μόνο τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα εμφάνισαν συγκεκριμένη και πολωμένη κατανομή αυτών των μορίων, υποδεικνύοντας την πιθανή επιτυχή αλληλεπίδρασή τους με το ενδομήτριο. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή τη μελέτη κατέδειξαν ότι το έμβρυο που θεωρείται υγιές σύμφωνα με τα μορφολογικά κριτήρια με μικροσκοπική παρατήρηση, μπορεί να είναι ακατάλληλο για εμφύτευση λόγω της μη φυσικής έκφρασης των μορίων συνάφειας. Η παρατήρηση ότι η βιοψία των εμβρύων μειώνει την έκφραση των μορίων συνάφειας πιθανότατα λόγου του επεμβατικού χαρακτήρα της τεχνικής θα μπορούσε να εξηγήσει την αποτυχία εμφύτευσης μορφολογικά και γενετικά υγιών εμβρύων. Η προσθήκη της L-Cn στο μέσο εμβρυϊκής καλλιέργειας, ως παράγοντα παροχής

ενέργειας, έδειξε ότι εντείνει την έκφραση μορίων συνάφειας στα προεμφυτευτικά έμβρυα, προσομοιάζοντας τον *in vivo* φαινότυπο έκφρασης μορίων συνάφειας των αναπτυσσόμενων εμβρύων, γεγονός το οποίο είναι σημαντικό για την ανάπτυξη της πρώιμης πολικότητας. Η πρώιμη πολικότητα καθορίζει την επακόλουθη ανάπτυξη του εμβρύου και την επιτυχή εμφύτευση του. Στον οργανισμό, αυτή η πολικότητα υπαγορεύεται από τα κύτταρα του επιθηλίου της σάλπιγγας μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μόρια συνάφειας, γεγονός που δεν παρατηρείται στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Περαιτέρω ανάπτυξη της τεχνολογίας θα μπορούσε να προσφέρει βιομιμητικές επιφάνειες ικανές να προσομοιάσουν το κροσσωτό περιβάλλον της σάλπιγγας, παρέχοντας έτσι ένα φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης για τα έμβρυα, και συνεπώς μια βελτιωμένη έκβαση εμφύτευσης των εμβρύων.

ABSTRACT

Despite the improvements in technology and know-how in human assisted reproduction, pregnancy rates remain low due to an imbalanced interaction between the embryo and the uterus upon ovarian stimulation. The normal reproductive process is controlled by a set of interactions that take place either among cells or between cells and the extracellular matrix (ECM). Such interactions involve cells, ligands, cell adhesion molecules, adhesion molecules that mediate cell-to-cell and cell-to-ECM interactions, as well as their receptors. The most important groups of these receptors are integrins and cadherins, which are characterized as adhesion molecules located on the cell surface. Integrins are a family of cell surface glycoprotein receptors that are involved in both intercellular and extracellular molecule binding, thereby allowing the organization of cells and tissues. From invertebrates to vertebrates, integrins and cadherins have been shown to play an important role in fertilization, embryo development and placentation. Specifically in mammals, ECM interactions with the epithelium hosting each embryonic stage play a critical role in the fate of the developing embryo, its ability to migrate to the uterus, to implant and grow until birth. This study presents new data on the involvement of adhesion molecules in the reproductive process. In order to investigate the role of cellular interactions with extracellular space molecules in the reproductive process, we studied the effect of the ovarian stimulation protocol and embryo biopsy on the expression of fetal integrins and cadherins, as well as their possible regulation of expression in the presence of L-carnitine (L-Cn). We focused on the expression of the integrins avb3, α5b1, av, α6b1 and E-cadherin in zygotes and different stages of embryos grown in vitro or isolated directly from the animal in vivo. Only the *in vivo* developing embryos showed a specific and polarized distribution of these molecules, indicating their possible successful interaction with the endometrium. The results presented in this study showed that an embryo that is considered to be healthy, according to the morphological criteria by microscopic observation, may be unsuitable for implantation due to the abnormal expression of adhesion molecules. The observation that fetal biopsy reduces the expression of adhesion molecules, most likely due to the invasive nature of the technique, could explain the failure of morphologically and genetically healthy embryos to implant. The addition of L-Cn to the embryonic culture medium, as a powerful energy generating factor, has been shown to enhance the expression of adhesion molecules in pre-implantation embryos, simulating thus the in vivo phenotype of adhesion molecules in the developing embryos, which is important for the acquisition of early embryo polarisation. Early polarity determines the subsequent development of the embryo and its successful implantation. Within the organism, such polarity is dictated by the tubal epithelial cells through interactions with the adhesion molecules, which is not observed in the *in vitro* developing embryos. Further development of the technology could provide biomimetic surfaces resembling the tubal environment, thereby providing a natural developmental environment for the embryos, and thus an improved embryo implantation outcome.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΓΑΓ: Γλυκοζ**α**μινο**γ**λυκάνες

ΕΘΟ/ECM: **Ε**ξωκυττάρια **Θ**εμέλια **Ο**υσία/**E**xtracellular **C**ell **M**atrix

ΠΓ/PG: **Π**ρωτεο**γ**λυκάνες/**P**roteo**g**lycans

CAMs: Cell-**C**ell **A**dhesion **M**olecule**s**/Μόρια διαμεσολάβησης κυτταρικής προσκόλλησης

FBN: **F**i**b**ro**n**ectin/φιμπρονεκτίνη

FSH: Follicle-**S**timulating **H**ormone/θυλακιοτρόπος ορμόνη

GnRH: Gonadotropin-**R**eleasing **F**actor/εκλυτικός παράγοντας γοναδοτροπινών

hCG: human **C**horionic **G**onadotropin/ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη

ICM: Inner **C**ell **M**ass/εσωτερική μάζα κυττάρων

Igs: Immuno**g**lobulin**s**/ανοσοσφαιρίνες

LC: L-carnitin/L-καρνιτίνη

LH: Luteinizing **H**ormone/Ωχρινοτρόπος ορμόνη

RGD: τριπεπτίδιο αργινίνη-γλυκίνη-ασπαραγίνη

VTN: Vi**t**ro**n**ectin/βιτρονεκτίνη

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ……..... **9**

ABSTRACT ……..... **10**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ……..... **11**

1. Εισαγωγή **14**

1.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ) 15

1.2 Εξωκυττάριες ουσίες..... 15

1.3 Ιστορία των Ιντεγκρινών..... 18

1.4 Ταξινόμηση και γονιδιακή έκφραση ιντεγκρινών 20

1.5 Δομή ιντεγκρινών 21

1.6 Προσδέτες ιντεγκρινών και μεταγωγή σήματος. 24

1.7 Μεταγωγή σήματος από το εσωτερικό του κυττάρου στον εξωκυττάριο χώρο (inside-out signaling)..... 25

1.8 Μεταγωγή σήματος από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου (outside-in signaling)..... 27

1.9 Καδερίνες/Cadherins 30

1.10 Αναπαραγωγή 33

1.11 Ωοθυλακική ανάπτυξη 33

1.12 Γονιμοποίηση και πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου..... 41

1.13 Εμφύτευση 55

1.14 Μη διεισδυτική εμφύτευση..... 56

1.15 Πλακουντοποίηση..... 58

1.16 Ο ρόλος της L-καρνιτίνης (L-carnitine, LC) στην ωρίμανση των γαμετών..... 59

1.17 Απόπτωση στο έμβρυο..... 60

1.18 Σκοπός της μελέτης..... 65

2. Υλικά και Μεθοδολογία **67**

2.1 Πειραματική Προσέγγιση 67

2.2 Πειραματόζωα..... 67

2.3 Ωοθηκική διέγερση και αναπαραγωγή 67

2.4 L-Καρνιτίνη 68

2.5 Συλλογή εμβρύων *in vivo* 68

2.6 Συλλογή εμβρύων από τη μήτρα 70

2.7 Τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης 71

2.8 Βιοψία εμβρύου 80

2.9 Πειράματα ανοσοφθορισμού σε προεμφυτευτικά εμβρύα 83

2.10 Μικροσκόπια φθορισμού 84

3. Αποτελέσματα 86

3.1 Σύγκριση ποσοστού επιβίωσης εμβρύων σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες. Επίδραση της ωοθηκικής διέγερσης στην επιβίωση των υπό μελέτη εμβρύων. 86

3.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση με και χωρίς ωοθηκική διέγερση 88

3.3 Επίδραση διαφορετικών συστημάτων καλλιέργειας στην *in vitro* ανάπτυξη εμβρύων με και χωρίς ωοθηκική διέγερση. 90

3.4 Έκφραση των μορίων συνάφειας 92

3.5 Βιοψία εμβρύων 96

3.6 Επίδραση της L-Καρνιτίνης (L-Cn) στην ανάπτυξη προ-εμφυτευτικών εμβρύων *in vitro* 99

4. Συζήτηση 104

4.1 Επίδραση της διέγερσης των ωοθηκών στην ποιότητα ωαρίων και στο ρυθμό εξέλιξης των εμβρύων 104

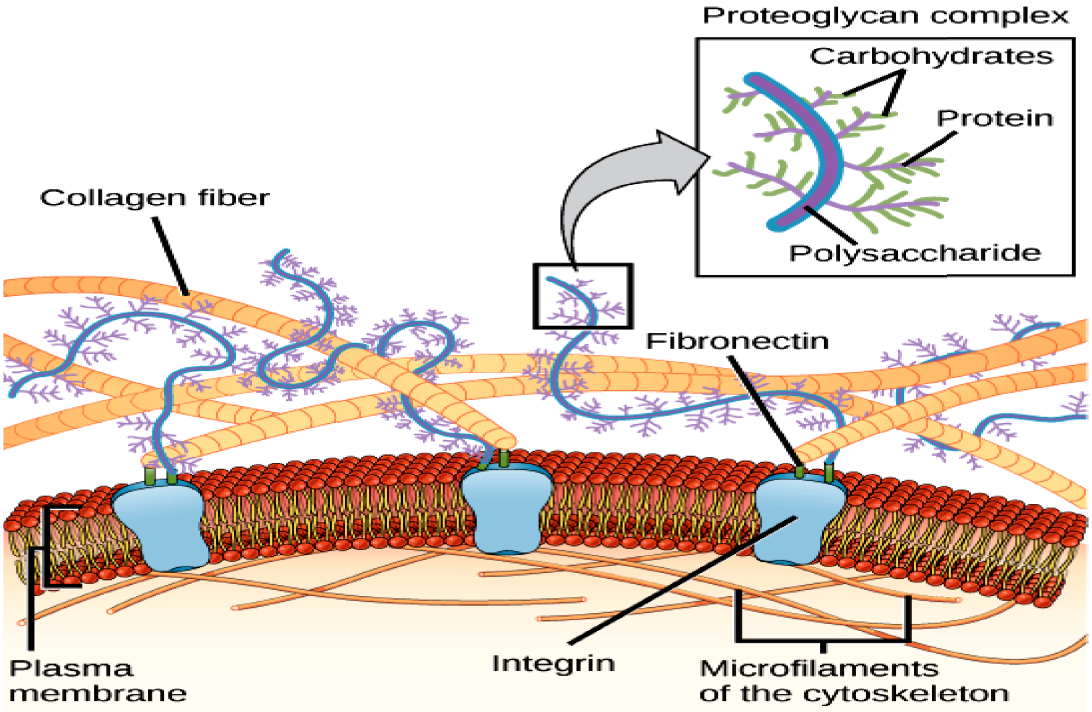
4.2 Έκφραση των μορίων συνάφειας σε προεμφυτευτικά έμβρυα μετά από βιοψία . 106

4.3 Έκφραση των μορίων συνάφειας σε έμβρυα *in vitro* και *in vivo* και επίδραση της L-Cn στην ανάπτυξη του εμβρύου 107

5. Βιβλιογραφία 110

1. Εισαγωγή

Η φυσιολογική αναπαραγωγική διαδικασία ελέγχεται από ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται είτε μεταξύ των κυττάρων (cell-cell interactions), είτε μεταξύ των κυττάρων και των στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ΕΘΟ, (**E**xtracellular **C**ell **M**atrix, ECM) και περιλαμβάνει τα στάδια της γονιμοποίησης, της ανάπτυξη, της διαφοροποίησης (πολικότητα) και της εμφύτευσης (ή της απόρριψης αυτής) του εμβρύου. Στις κυτταρικές αυτές αλληλεπιδράσεις εμπλέκονται κύτταρα, συνδετικά μόρια, μόρια προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους (**C**ell-**C**ell **A**dhesion **M**olecules, CAMs) και μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις του κυττάρου με στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (**C**ell-**S**ubsrtatum **A**dhesion **M**olecules, SAMs) και τους υποδοχείς αυτών. Σ 'αυτούς τους υποδοχείς περιλαμβάνονται κυρίως οι ιντεγκρίνες (integrins) που μαζί με τις καδερίνες (cadherins) , σελεκτίνες (selectins) και συνδεκάνες (syndecans), εμπλέκονται τόσο στις διακυτταρικές συνδέσεις όσο και στις συνδέσεις με μόρια του εξωκυττάριου χώρου, επιτρέποντας την οργάνωση των κυττάρων και των ιστών [1], όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 1**.



Εικόνα 1. Συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ). Υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών όπως οι ιντεγκρίνες (Integrins) αλληλεπιδρούν με κύριες ινώδεις πρωτεΐνες της ΕΘΟ όπως το κολλαγόνο (collagen) και οι φιμπρονεκτίνες (fibronectins) και ρυθμίζουν σε ιστοειδικό επίπεδο την διακυτταρική επικοινωνία και την μετανάστευση των κυττάρων.

1.1 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ)

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελεί ένα φυσικό ικρίωμα για την κυτταρική προσκόλληση και είναι εξαιρετικά σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, καθώς ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διαφοροποίησή τους. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται από ένα οργανικό υπόστρωμα που ονομάζεται 'θεμέλια ουσία', εντός τις οποίας εντοπίζεται μια ποικιλία από ίνες. Οι κύριες ινώδεις πρωτεΐνες της ΕΘΟ είναι το κολλαγόνο (collagen), οι ελαστίνες (elastins), οι φιμπρονεκτίνες (fibronectins) καθώς και οι λαμινίνες (laminins)[2].

Μία ομάδα δομικών γλυκοπρωτεϊνών αποτελεί το τρίτο συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας. Τα μόρια των γλυκοζαμινογλυκανών (ΓΑΓ) (glycosaminoglycans, GAG) απαντώνται με τη μορφή του υαλουρονικού οξέος και των πρωτεογλυκανών (ΠΓ-proteoglycans, PG) είναι υδρόφιλα αλληλοδιαπλέκονται και ενώνονται ηλεκτροστατικά τόσο μεταξύ τους όσο και με τα μόρια του νερού που αποτελεί βασικό τους διαλύτη. Σχηματίζεται έτσι μια εύκαμπτη ζελατινώδης ουσία που διευκολύνει τη διάχυση των μεταβολιτών που ασκούν μεσολαβητικό ρόλο μεταξύ των κυττάρων και των υπόλοιπων συστατικών[3].

Παλαιότερα θεωρούνταν ότι οι κύριες λειτουργίες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ήταν η εξασφάλιση της μηχανικής στήριξης, η προσκόμιση θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα και η απομάκρυνση των μεταβολικών τους παραπροϊόντων. Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει ότι αν και τα κύτταρα εκκρίνουν εξωκυττάριες ουσίες, επηρεάζονται και ενίοτε ελέγχονται με τη σειρά τους από τα μόριά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, επομένως υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Η φυσική, τοπολογική και βιοχημική σύνθεση της ΕΘΟ δεν είναι μόνο ιστοειδική, αλλά είναι επίσης αξιοσημείωτα ετερογενής. Η προσκόλληση των κυττάρων στην ΕΘΟ προκαλείται από υποδοχείς της ΕΘΟ, όπως οι ιντεγκρίνες[4–7]. Η προσκόλληση προκαλεί κυτταροσκελετική σύζευξη και εμπλέκεται στη σηματοδότηση που ελέγχει την μετανάστευση κυττάρων μέσω της ΕΘΟ[8]. Επιπρόσθετα, η ΕΘΟ κατευθύνει την απαραίτητη μορφολογική οργάνωση και τη φυσιολογική λειτουργία μέσω των αυξητικών παραγόντων δέσμευσης (**G**rowth **F**actors-GFs) και της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών για να προκαλέσει μεταγωγή σήματος και να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση[9].

1.2 Εξωκυττάριες ουσίες

Οι εξωκυττάριες ουσίες περιλαμβάνουν 3 είδη πρωτεϊνών, α) δομικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη, β) συγκολλητικές (ή συνδετικές) πρωτεΐνες, όπως η φιμπρονεκτίνη (Fibronectin, FBN), η λαμινίνη (laminin), το ινωδογόνο (Fibrinogen) και η βιτρονεκτίνη (Vitronectin, VNT), καθώς και γ)

πρωτεογλυκάνες. Μία από τις ιδιότητες των εξωκυττάριων ουσιών είναι η δημιουργία συμπλόκων με υποδοχείς στη μεμβράνη του κυττάρου. Η σύνδεση μεταξύ δομικών πρωτεϊνών, πρωτεογλυκανών και συνδετικών πρωτεϊνών διευκολύνει τη διακυτταρική επικοινωνία. Ενώ μελέτες στη δεκαετία του 1980 υποστήριζαν τον περιορισμένο ρόλο των εξωκυττάριων ουσιών στη μηχανική στήριξη του κυττάρου, νεότερες μελέτες εισάγουν επιπρόσθετους ρόλους αυτών, σχετικούς με την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Έτσι διαφαίνεται πως εξωκυττάριες ουσίες επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), την αγγειογένεση, ενώ εμπλέκονται και στη ρύθμιση της λειτουργίας ενζύμων, όπως οι πρωτεάσες συμβάλλοντας συν τοις άλλοις στη ρύθμιση και της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

1.2.1 Δομικές πρωτεΐνες

Το κολλαγόνο αποτελεί μια ομάδα ινωδών πρωτεϊνών που αποτελούν το βασικό συστατικό του συνδετικού ιστού. Η δομή του μορίου είναι η τριπλή έλικα που σχηματίζεται όταν οι τρεις πεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη. Αυτή η δομή σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων. Οι πιο καλά μελετημένοι τύποι κολλαγόνου είναι οι I, II, III και IV. Οι τρεις πρώτοι είναι ινιδιακής μορφής και αποτελούν συστατικό όλων των τύπων συνδετικού ιστού. Αντίθετα στις βασικές μεμβράνες εντοπίστηκε το κολλαγόνο IV που μαζί με τη λαμινίνη αποτελεί το σκελετό των βασικών μεμβρανών και συμμετέχει στην αλληλεπίδραση κυττάρων με τις βασικές μεμβράνες[10–12].

Η ελαστίνη περιβάλλεται από μικρονήματια, των οποίων το κύριο συστατικό είναι η ινιδίνη. Η ελαστίνη περιέχει δύο χαρακτιριστικά συστατικά: τη δεσμοσίνη (desmosine) και την ισοδεσμοσίνη (isodesmosine), που αποτελούν τη χημική ένωση που συνδέει ομοιοπολικά διαφορετικά μόρια ελαστίνης μεταξύ τους και στα οποία οφείλεται η ελαστικότητά τους. Οι ελαστικές ίνες δεν παρουσιάζουν περιοδικότητα και απαντώνται σε περιοχές του σώματος που απαιτούν σημαντική ευκαμψία και ελαστικότητα[13].

1.2.2 Συνδετικές πρωτεΐνες

Η φιμπρονεκτίνη (FBN) είναι μία γλυκοπρωτείνη μεγάλου μοριακού βάρους[14–16] συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, τη διαφοροποίηση, τη μορφογένεση και την προσκόλληση των κυττάρων. Αποτελείται από πολλαπλές δομικές και λειτουργικές περιοχές, ανήκει στις α2-σφαιρίνες, με μοριακό βάρος περίπου 450 kD. Αποτελεί ένα ασύμμετρο διμερές με δύο παρόμοιες υποομάδες, μοριακού βάρους 220-250 kD που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, κοντά στα καρβοξυλικά τους άκρα[17]. Στη δομή της φιμπρονεκτίνης υπάρχει μια μεγάλη σειρά

επαναλαμβανομένων ομοειδών ομάδων που διαιρούνται σε τρείς τύπους, τους 1,2 και 3. Ο τύπος 1 αποτελείται από σειρά 45 αμινοξέων και συμπληρώνει το αμινικό και καρβοξυλικό άκρο του πολυπεπτιδίου.Ο τύπος 2 αποτελείται από σειρά 60 αμινοξέων και αποτελείται από δύο μορφές οι οποίες διακόπτουν μια σειρά από επαναλαμβανόμενες ομάδες τύπου 1 στο αμινικό άκρο της αλυσίδας.Τέλος, ο τύπος 3 αποτελείται από σειρά 90 περίπου αμινοξέων, περιλαμβάνει 15-17 μορφές και συμπληρώνει το μέσον της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Συνολικά, όλο το πολυπεπτίδιο αποτελείται από 17 διαφορετικά αμινοξέα τα οποία συνθέτουν σειρά 2500 αμινοξέων. Από το μόριο της FBN λείπουν η 4-υδροξυπρολίνη, η 1-4 ισοδεσμοσίνη και η 1-4 δεσμοσίνη[18].

Η φιμπρονεκτίνη (FBN) υπάρχει σε δύο μορφές, τη διαλυτή και την αδιάλυτη, ή αλλιώς κυτταρική. Έχει ανιχνευτεί στο συνδετικό ιστό, στην επιφάνεια των κυττάρων, στο πλάσμα και σε άλλα σωματικά υγρά.

Αλληλεπιδρά με μία ποικιλία μακρομορίων και αποτελεί εξωκυττάρια ουσία πρόσδεσης για πολλούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η γενετική πληροφορία για την παραγωγή της FBN στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2. Αποδεικνύεται ότι διαφορετικά μετάγραφα κωδικοποιούν την FBN πλάσματος και την FBN στην κυτταρική της μορφή[19]. Αν και η γενική δομή των δύο μορφών της FBN (διαλυτής ή αδιάλυτης) είναι όμοια και έχουν ανοσολογικά διασταυρούμενη αντίδραση, υπάρχουν σημαντικές βιοχημικές διαφορές[20]. Ειδικότερα, η FBN πλάσματος είναι διαλυτή σε ουδέτερο pH, ενώ η κυτταρική δεν παρουσιάζει παρόμοια διαλυτότητα. Επίσης, οι δομικές υποομάδες της κυτταρικής FBN είναι μεγαλύτερες από εκείνες της FBN του πλάσματος. Η παραγωγή των διαφορετικών μορφών FBN οφείλεται στις 3 περιοχές του γονιδίου FN1 που υπόκεινται σε μηχανισμούς εναλλακτικού ματίσματος και παράγουν δυνητικά 20 διαφορετικά μετάγραφα, εκ των οποίων ένα τολάχιστο κωδικοποιεί για την ισομορφή που υποβάλλεται σε προτεολυτική επεξεργασία.

Η ιδιότητα της FBN να συνδέεται με τις κυτταρικές επιφάνειες οφείλεται στο τριπεπτίδιο αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ (Arg-Gly-Asp, RGD), το οποίο βρίσκεται στο τμήμα εκείνο της φιμπρονεκτίνης που συνδέεται με το κύτταρο. Οι ιντεγκρίνες συνδέουν τα ινίδια FN με τον κυτταροσκελετό, ενώ πολλές αντιδράσεις ιντεγκρινών- υποδοχέων γίνονται διαμέσου της αναγνώρισης του τριπεπτιδίου RGD[21,22].

Οι λαμινίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους και συνιστούν ομάδα τριών πολυπεπτιδίων που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό, την α, β και γ αλυσίδα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η λαμινίνη είναι η πρώτη πρωτεΐνη που ανιχνεύεται στις εξωκυττάριες ουσίες και έχει περιγραφεί σε έμβρυα πολλών οργανισμών[23–27].

Η βιτρονεκτίνη (vitronectin, VTN) είναι μία μείζονα γλυκοπρωτεΐνη προσκόλλησης της οικογένειας των αιμοπηκτινών. Το μοριακό της βάρος ανέρχεται στα 75 kDa, αποτελείται από 459 αμινοξέα και έχει

ανιχνευθεί στον ορό, στην ΕΘΟ και στα οστά[28]. Στον άνθρωπο η γενετική πληροφορία για την έκφραση της βιτρονεκτίνης κωδικοποιείται από το γονίδιο VTN[29]. Περίπου το ένα τρίτο της μοριακής μάζας της πρωτεΐνης αποτελείται από υδατάνθρακες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η πρωτεΐνη αποδομείται σε δύο αλυσίδες που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό.

Η πρωτεΐνη αποτελείται από 3 περιοχές: ένα αμινοτελικό άκρο, την περιοχή της σωματομεδίνης β, έναν κεντρικό τομέα με ομολογία προς την αιμοπηκτίνη και ένα καρβοξυτελικό άκρο με ομολογία επίσης προς την αιμοπηκτίνη[30]. Η βιτρονεκτίνη είναι διαμορφωτικά ασταθές μόριο διαθέτει μόνο μία απλή ακολουθία σήματος RGD (45-47), η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης για τις ιντεγκρίνες και μία κρυπτική θέση δέσμευσης ηπαρίνης η οποία δεν εκφράζεται στη διαλυτή μορφή της βιτρονεκτίνης, αλλά εμφανίζεται όταν η βιτρονεκτίνη προσκολλάται σε επιφάνειες στερεάς φάσης.

Η δέσμευση της βιτρονεκτίνης στις κυτταρικές επιφάνειες μπορεί να διαμεσολαβείται από ενανυποδοχέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA), με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από την ακολουθία RGD. Οι υποδοχείς uPA έχουν ανιχνευθεί στην πλασματική μεμβράνη ενός μεγάλου αριθμού κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων και κερατινοκυττάρων[31,32]. Τα σπερματοζωάρια ποντικών έχει αποδειχτεί ότι δεσμεύουν τον υποδοχέα υPA που εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του σπερματικού πόρου[33].

1.3 Ιστορία των Ιντεγκρινών

Η ενδοκυτταρική συνοχή είναι κρίσιμη για την οργάνωση, τη δομή και τη διακυτταρική επικοινωνία των πολυκύτταρων οργανισμών. Η προέλευση της κυτταρικής προσκόλλησης φαίνεται να προηγήθηκε της οργάνωσης πολυκυτταρικών δομών. Η οικογένεια γονιδίων των ιντεγκρινών εμφανίστηκε κατά την εξέλιξη των μετάζωων πριν από 600 εκατομμύρια χρόνια[34]. Κάποια πρώιμα μετάζωα θα πρέπει να ανέπτυξαν μια μορφή ιντεγκρίνης υποδοχέα της λαμινίνης και μια ιντεγκρίνη που αναγνώριζε το τριπεπτίδιο RGD τα οποία αμφότερα έχουν διατηρηθεί εξελικτικά στα μετάζωα[35].

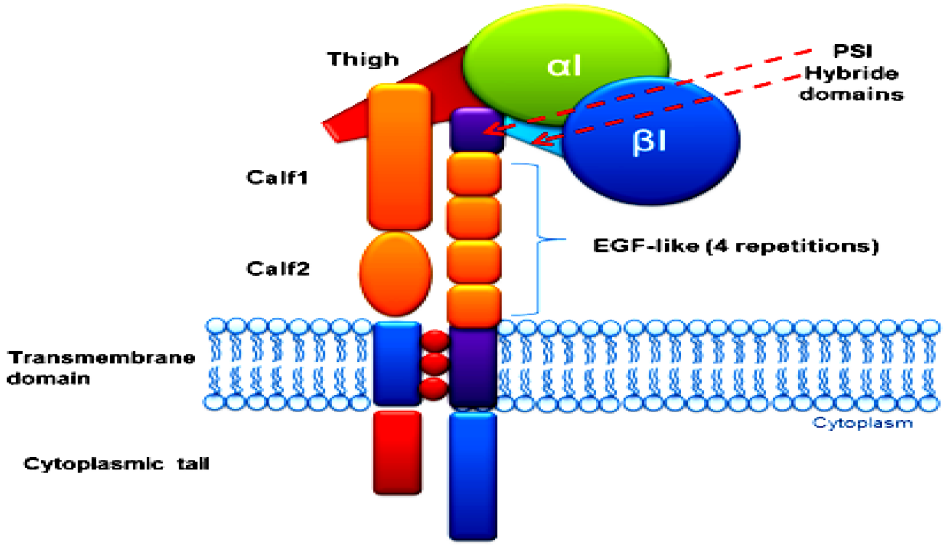
Με την εξέλιξη των σπονδυλωτών, η οικογένεια των ιντεγκρινών έχει επεκταθεί σημαντικά. Πολλές διαφορετικές ιντεγκρίνες δέσμευσης με λαμινίνες και το τριπεπτίδιο RGD εξελίχθηκαν, ενώ εμφανίστηκε μια νέα ομάδα ιντεγκρινών που έχουν επιπλέον μια εισαχθείσα περιοχή I στην εξωκυτταρική τους επικράτεια που περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τα ινίδια κολλαγόνου και τις λευκοκυτταρικές β2 ιντεγκρίνες[36].

Οι ιντεγκρίνες είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας μέσω των οποίων πραγματοποιείται η προσκόλληση των κυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (ΕΘΟ), αλλά και οι διάφορες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά

πριν από μια εικοσαετία περίπου για να δηλώσει το βασικό τους ρόλο στην διασύνδεση (integration) των κυττάρων με τις εξωκυττάριες πρωτεΐνες[14,37]. Οι ιντεγκρίνες παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά επίσης και από άλλους τύπους κυττάρων, που προέρχονται και από τα τρία βλαστικά δέρματα. Ρυθμίζουν την πρόσδεση του κυττάρου σε μόρια της εξωκυττάριας ύλης, αλλά αλληλεπιδρούν και με διαλυτούς προσδέτες ή προσδέτες της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ιντεγκρίνες διαφέρουν από άλλους υποδοχείς που υπάρχουν στην κυτταρική επιφάνεια στο ότι δεσμεύουν τον προσδέτη τους με χαμηλή χημική συγγένεια διευκολύνοντας την κινητικότητα των κυττάρων. Επιπρόσθετα, είναι πολλαπλάσιες στον αριθμό (10-100 φορές) σε σύγκριση με άλλους κυτταρικούς υποδοχείς.

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα 18 διαφορετικές υπομονάδες α και 8 διαφορετικές υπομονάδες β του μορίου της ιντεγκρίνης, ο διαφορετικός συνδυασμός των οποίων μπορεί να επιφέρει τον σχηματισμό έως και 24 διαφορετικών υποδοχέων ιντεγκρίνης με διακριτούς βιολογικούς ρόλους για καθένα από αυτούς[38]. Το κυτταροπλασματικό κομμάτι του υποδοχέα της ιντεγκρίνης φέρει θέσεις δέσμευσης διαφόρων μορίων, λειτουργώντας ως μεταγωγέας σήματος (**Εικόνα 2**).

Οι ιντεγκρίνες έχουν βρεθεί σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους των θηλαστικών, αλλά κανένας από αυτούς δεν εκφράζει ταυτόχρονα όλα τα ετεροδιμερή που υπάρχουν στην φύση. Η καθορισμένη ομάδα υποδοχέων που εκφράζεται από κάθε κύτταρο ρυθμίζει την δυνατότητα προσκόλλησής του σε ουσίες του εξωκυττάριου χώρου, ενώ επηρεάζει ταυτόχρονα τη διασύνδεσή του με γειτονικά κύτταρα και τη διακυτταρική μεταγωγή σημάτων.



Εικόνα 1. Βασική δομή ιντεγκρίνης. Το ετεροδιμέρες της ιντεγκρίνης διαθέτει εξωκυτταρική θέση δέσμευσης των μορίων της ΕΘΟ και κυτταροπλασματικές θέσεις πρόσδεσης στο κυτταροσκελετό. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας απομονωμένων υποδοχέων επιβεβαιώνουν την παραπάνω διαμόρφωση, δείχνοντας την προεξοχή 20nm της βασικής κεφαλής του υποδοχέα από τα όρια της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας του κυττάρου.

Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών, η οποία ελέγχεται από τοπικά σήματα. Καθένας από τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς μπορεί και προσδένεται σε περισσότερους από έναν προσδέτες. Το σημείο αναγνώρισης για τις πρωτείνες του εξωκυττάριου χώρου είναι το τριπεπτίδιο αργινίνης/γλυκίνης/ασπαρτικού οξέος, μια αμινοξική αλληλουχία που απαντάται στη φιμπρονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη και την οστεοποντίνη (osteopontin, OPN)[14]. Η κυτταροπλασματική επικράτεια των ιντεγκρινών αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως α-ακτινίνη (α-actinin), ταλίνη (talin), φιλαμίνη (filamin), παρέχοντας έτσι μια φυσική σύνδεση μεταξύ της εξωκυττάριας ουσίας (ΕΘΟ) και των κυτταροσκελετικών δομών και συμβάλλοντας στην επιβίωση των κυττάρων.

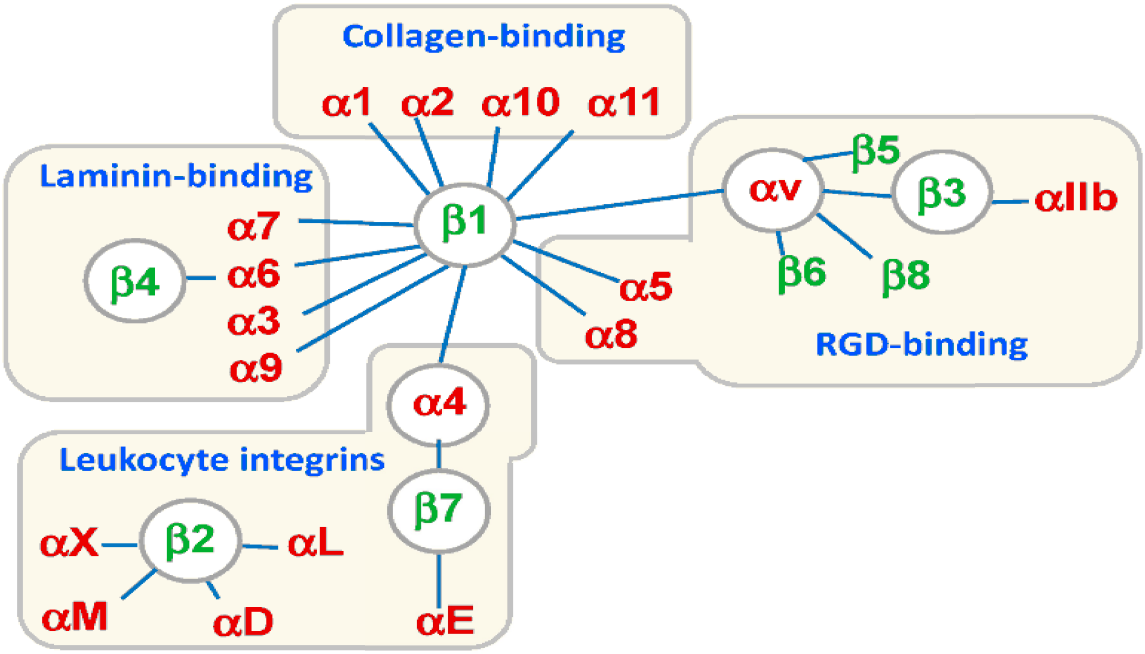
1.4 Ταξινόμηση και γονιδιακή έκφραση ιντεγκρινών

Η αρχική ταξινόμηση των ιντεγκρινών γινόταν με βάση τη β-υπομονάδα τους. Επειδή όμως είναι δυνατόν μερικές α-υπομονάδες να συνδέονται με περισσότερους από έναν τύπους β-αλυσίδων, πιο πρόσφορη ταξινόμηση θεωρείται η λειτουργική ταξινόμησή τους με βάση τη σύνδεση με μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας. Με βάση τη λειτουργική ταξινόμηση, οι ιντεγκρίνες ταξινομούνται σε 4 μεγάλες κατηγορίες: α) εκείνες που προσδένονται με το κολλαγόνο, β) τις ιντεγκρίνες που αναγνωρίζουν το τριπεπτίδιο RGD, γ) τις ιντεγκρίνες που συνδέονται με την λαμινίνη και τέλος δ) τις ιντεγκρίνες που εκφράζονται ειδικά στα λεμφοκύτταρα[39].

Όλες οι γνωστές ιντεγκρίνες παρουσιάζονται ως ετεροδιμερή, αποτελούμενες από 2 μη ομόλογες υπομονάδες την α και τη β. Το ποσοστό ομολογίας αλληλουχίας των υπομονάδων είναι περίπου 30% για την α και 45% για την β, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι γονιδιακές οικογένειες για τις υπομονάδες α και β εξελίχθηκαν με αλληλοεπικάλυψη των γονιδίων τους. Στους ανθρώπους, τα γονίδια για τις α και β υπομονάδες βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Ωστόσο, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ιντεγκρίνες που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα (υπομονάδες αM, αD, και αX) συγκεντρώνονται στη χρωμοσωμική περιοχή 16p11, τα γονίδια που εκφράζονται στα αιμοπετάλια και στο ενδοθήλιο (αIIb ή β3) στην αντίστοιχη περιοχή 17q21.32, ενώ τα γονίδια των υπομονάδων που εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (α6, α4, αV) εντοπίζονται στη συστοιχία 2q31.

Οι μισές από τις 18 διαφορετικές υπομονάδες α (αD, αE, αL, αM, αX, α1, α2, α10, α11) περιέχουν τη δομή I (insertion/interaction) που είναι γνωστή ως δομή του παράγοντα Von Willebrand A ή απλά ως δομή A[40]. Όταν μια δομή I είναι σε υπομονάδα α, αυτή είναι σχεδόν πάντα κοντά στην περιοχή του προσδέτη. Όταν η δομή I είναι απούσα από την υπομονάδα α (όπως στην α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, αν και αIIb), τότε η δομή πρόσδεσης σχηματίζεται από την περιοχή β-δομής της υπομονάδας α και τη δομή I

της υπομονάδας β. Η γονιδιωματική ανάλυση μεταξύ των 24 ειδών ιντεγκρίνης τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά, αποκάλυψε ότι η δομή α και β του μορίου της ιντεγκρίνης είναι συντηρημένη εξελικτικά[40].



Εικόνα 2. Συνδυασμοί των α και β υπομονάδων ιντεγκρινών και ταξινόμησή τους με βάση τη σύνδεση τους με μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (κολλαγόνο, λαμινίνη, RGD τριπεπτίδιο, λεμφοκύτταρα).

1.5 Δομή ιντεγκρινών

Το μοριακό βάρος των ιντεγκρινών κυμαίνεται μεταξύ 90 και 160 kDa. Οι δυο υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε υπομονάδα περιέχει μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή που αποτελείται από 700-1000 αμινοξέα, μια μικρή διαμεμβρανική και ένα καρβοξυτελικό άκρο, το μέγεθος του οποίου ποικίλλει. Οι εξωκυττάριες περιοχές των δύο υπομονάδων συνδυάζονται σχηματίζοντας την επικράτεια υποδοχής του προσδέτη, ενώ το κυτταροπλασματικό άκρο προσδένεται συνήθως σε πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού[41,42]. Αντίστοιχα, η εξωκυτταρική επικράτεια είναι διαφορετική μεταξύ των α και των β υπομονάδων.

Οι α ιντεγκρινικές υπομονάδες αποτελούνται από 7 ομόλογες επαναλαμβανόμενες επικράτειες με δομή έλικα πάνω στις οποίες δεσμεύεται ο προσδέτης[43]. Μεταξύ των ομόλογων επικρατειών 2 και 3 υπάρχει μια αλληλουχία που ονομάζεται I ή A (I/A domain) η οποία περιέχει μία MIDAS επικράτεια πρόσδεσης (**M**etal-**I**on-**D**ependent **A**dhesive **S**ite) που ρυθμίζεται από ιόντα μετάλλου[44,45].

Όλες οι α- υπομονάδες έχουν την ίδια χαρακτηριστική αλληλουχία 5 αμινοξέων (GFFKR) μέσα στο κυτταρόπλασμα, ακριβώς κάτω από την περιοχή που διαπερνούν την μεμβράνη, η οποία είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή τους με την κυτταροπλασματική επικράτεια των β υπομονάδων. Η τελευταία περιέχει τη χαρακτηριστική αλληλουχία NPxY/F (όπου x οποιοδήποτε αμινοξύ), με τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης να είναι απαραίτητη στην αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες και το σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης[46].

Οι α υπομονάδες διαχωρίζονται σε δύο ομάδες βάσει ορισμένων δομικών διαφορών τους. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις , αD, αE, αL α1,α2,α10, α11 ,αM και αX. Η δομική ομοιότητα τους έγκειται στην κοινή παρουσία μιας περιοχής 180 αμινοξέων (I- περιοχή) μεταξύ της δεύτερης και τρίτης επανάληψης αμινοξέων και περιέχει μια συντηρημένη περιοχή (MIDAS) που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεσμεύει κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) η οποία πιθανότατα εμπλέκεται στη δέσμευση του προσδέτη[40].

Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τις υπομονάδες α3 ,α5, α6, α7, α8, α9, αIIЬ, αv και αlLEb. Αυτές αποτελούνται από δύο αλυσίδες, μια ελαφριά, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, διαπερνά τη μεμβράνη και εκτείνεται και στην εξωκυττάρια περιοχή (περίπου 25kD) και μια βαριά που καταλαμβάνει την υπόλοιπη εξωκυττάρια περιοχή (περίπου 120 kD). Οι δύο υπομονάδες συναντώνται σε πολλούς ιστούς, όπως τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα λευκά αιμοσφαίρια και οι οστεοκλάστες[4].

Οι υπομονάδες β (β1-β8) έχουν πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως η επανάληψη 4 κυστεϊνικών περιοχών στο C-τελικό άκρο τους που μοιάζουν στον EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor-like domains). Περιέχουν 8 εξωκυτταρικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένης και μιας δομής I και μια κυτταροπλασματική περιοχή ποικίλου μεγέθους. Η δομή I της υπομονάδας β έχει παρόμοια δομή με την υπομονάδα α, αλλά με τρεις περιοχές MIDAS και LIMBS (**L**igand-**I**nduced **M**etal-**B**inding **S**ite) ενεργοποιούμενες από τον προσδέτη[47]. Η δέσμευση του δισθενούς ιόντος μπορεί, είτε να ενισχύει, είτε να αναστέλλει τη δέσμευση του προσδέτη, ή ακόμη να μεταβάλλει την ειδικότητα της ιντεγκρίνης για τον εκάστοτε προσδέτη. Τα ιόντα Mn^{2+} και Mg^{2+} ευνοούν τη δέσμευση του προσδέτη στην ιντεγκρίνη και την ενεργοποίησή της, ενώ τα ιόντα Ca^{2+} προκαλούν την απελευθέρωση του προσδέτη και την απενεργοποίηση της ιντεγκρίνης[48].

Οι κυτταροσκελετικές περιοχές των υπομονάδων α και β είναι όλες σχετικά μικρές (20-50 αμινοξέα), με εξαίρεση τη β4, που έχει μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή περίπου 1000 αμινοξέων και περιέχει τέσσερις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τύπου φιμπρονεκτίνης III και παρουσιάζουν δράση κινάσης τυροσίνης[49]. Η συγγένεια και η αυστηρή εξειδίκευση των ιντεγκρινών για τους συνδέτες τους, είναι

εξαιρετικής σημασίας εφόσον η σύνδεση αυτή καταλήγει σε ένα καθορισμένο μονοπάτι μεταγωγής μηνύματος με τέτοια δυναμική που μπορεί να αλλάξει την τύχη του κυττάρου. Η αυστηρά προκαθορισμένη αυτή σύνδεση είναι υπεύθυνη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και πολλές άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η λειτουργία της κυτταρικής αύξησης και κινητικότητας, της άμυνας και της επιβίωσης[50–53]. Αντίθετα, δυσλειτουργικές αλληλεπίδρασης των ιντεγκρινών με τους συνδέτες τους ενοχοποιούνται για πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του μεταστατικού καρκίνου, θρομβώσεων και αυτοάνοσων νοσημάτων.

Η α5 (ITGA5) υπομονάδα ιντεγκρίνης γνώστη και ως CD49e, VLA-5, VLA5A (very late antigen) ενώνεται με την β1 σχηματίζοντας το ετεροδιμέρες α5β1 με εξωκυττάρια ουσία πρόσδεσης την φιμπρονεκτίνη, μεταφέρεται στο εσωτερικό των κύτταρων μέσω κινεσίνης (kinesin) κατά μήκος των μικροσωληνίσκων. Η α5β1 ιντεγκρίνη και φιμπρονεκτίνη σχηματίζουν ένα ζευγάρι ιντεγκρίνης-προσδέτη πολύ σημαντικό για τη ρύθμιση του σχηματισμού ινιδίων φιμπρονεκτίνης και για την καθοδήγηση της συνάθροισης της εξωκυττάριας ύλης[40,54–56]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των α5β1 και της φιμπρονεκτίνης είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη, ενώ η απουσία της οδηγεί σε πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα[57,58]. Τα VLA αντιγόνα εντοπίζονται κυρίως στα λεμφοκύτταρα μερικές ημέρες μετά από την ενεργοποίησή τους με μιτογόνους παράγοντες[59]. Η β1, ή VLAε είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο ITGB1. Οι έκφραση των β1-ιντεγκρινών μπορεί να ελεγθεί πειραματικά με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD49b, CD49c, για τα τμήματα Ia και Ic αντίστοιχα και με το αντίσωμα CD29 για το τμήμα IIa[60–62]. Η β1 υπομονάδα μπορεί να υπάρχει σε διαφορετικές ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing), ενώ για το γονίδιο αυτό έχουν βρεθεί έξι εναλλακτικές ισομορφές που κωδικοποιούν πέντε πρωτεΐνες με εναλλασσόμενες C-τελικές περιοχές εκφραζόμενες από μια ποικιλία κυτταρικών τύπων[63].

Οι β2 ιντεγκρίνες κυρίως συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο έναντι κυττάρου-ΕΘΟ, αναγνωρίζοντας ειδικούς προσδέτες σε άλλα κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά. Ως προσδέτες, των β2 ιντεγκρινών λειτουργούν μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulins, Igs), η αλληλεπίδραση των οποίων με β2 ιντεγκρίνες επιτρέπει στα λευκά αιμοσφαίρια την ανάπτυξη σταθερής σύνδεσης με ενδοθηλιακά κύτταρα, διευκολύνοντας έτσι την κινητικότητα και μεταφορά τους σε θέσεις φλεγμονής, διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων[4].

Οι β3 ιντεγκρίνες εκφράζονται από μεγαλύτερο αριθμό κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων. Η ιντεγκρίνη ανβ3 αποτελεί πρωτίστως έναν υποδοχέα βιτρονεκτίνης, ενώ αναγνωρίζει επίσης τη φιμπρονεκτίνη (FBN), το ινωδογόνο (fibrinogen), την οστεοποντίνη (osteopontin), την Cyr61 και την θυροξίνη (thyroxine), εκφράζεται σε διαφορετικά είδη κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, αλλά η

έκφρασή της περιορίζεται σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και μερικούς πληθυσμούς αιματοποιητικών κυττάρων των ενήλικων ατόμων. Είναι ένας υποδοχέας για τη φαγοκυττάρωση σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται ως απάντηση στην αγγειακή βλάβη, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης και σε ορισμένους τύπους κακοήθειας, ενώ εκφράζεται έντονα κατά την φαγοκυττάρωση των οστών από τους οστεοκλάστες[64]. Αυτός ο τύπος ιντεγκρίνης, μαζί με τα ετεροδιμερή α5β1, α4β1, α6β1 και α7β1 θεωρούνται ότι εκφράζονται συνεχώς καθόλη τη διάρκεια της εμφύτευσης[65].

Η αναστολή της δράσης της με μικρά μόρια ή αντισώματα αναστέλλει την αγγειογένεση σε διάφορα ζωικά μοντέλα[66]. Οι ιντεγκρίνες που μοιράζονται την υπομονάδα αν, αναγνωρίζουν μια ποικιλία συνδέτων περιλαμβανομένης της VTN, της FBN, της οστεοποντίνης, της σιαλοπρωτεΐνης (sialoprotein) των οστών, της θρομβοσπονδίνης (thrombospodin), του ινωδογόνου, αλλά και του παράγοντα von Willebrand, της τενασχίνης (tenascin) και της αγρίνης (agrin). Η αφαίρεση του γονιδίου αν σε ποντίκια οδηγεί σε θνησιμότητα, εφόσον επιτρέπει κυρίως τη αγγειογένεση[67].

Η ιντεγκρίνη α6β1 είναι ο κύριος υποδοχέας για τις αγγειακές λαμινίνες και παίζει ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, την ενεργοποίηση και την αρτηριακή θρόμβωση[68]. Θεωρείται ότι ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια με την εκκίνηση σημάτων που προάγουν την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, την εκβολή φυλλοποδίων, τον σχηματισμό λαμελλιπόδων και την μετανάστευσή τους[68]. Η ικανότητα των ιντεγκρινών να συσσωματώνονται και να αλληλεπιδρούν με κινάσες, όπως οι FAK[69], Src[70], PI3K[71] και οι p21-εξαρτώμενες κινάσες (PDKs)[72], παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος καθοδικά των ιντεγκρινών.

1.6 Προσδέτες ιντεγκρινών και μεταγωγή σήματος.

Οι ιντεγκρίνες λειτουργούν σαν υποδοχείς που μπορούν να δέχονται και να ανιχνεύουν μεταβολές στις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στον εξωκυττάριο χώρο. Οι αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση των ιντεγκρινών επάγουν τη μεταγωγή σήματος από το εσωτερικό του κυττάρου προς τον εξωκυττάριο χώρο (inside-out signaling) ή και αντίστροφα (outside-in signaling)[73]. Με τον τρόπο αυτό λειτουργούν ως διαμεμβρανικές συνδέσεις ανάμεσα στους εξωκυτταρικούς προσδέτες (άλλα κύτταρα ή εξωκυττάρια ύλη) και στα ινίδια του κυτταροσκελετού της ακτίνης, των οποίων τη λειτουργία ρυθμίζουν και τροποποιούν.

Οι θέσεις αναγνώρισης προσδετών των ιντεγκρινών περιέχουν βραχείες αλληλουχίες (3-4 αμινόξεα), ο ακριβής ρόλος των οποίων παραμένει απροσδιόριστος μέχρι σήμερα[74]. Η πιο γνωστή βραχεία ακολουθία, υπεύθυνη για την προσκόλληση πλήθους πρωτεϊνών της ΕΘΟ, όπως το ινωδογόνο, η ινοσυνδετίνη, η

λαμινίνη, η βιτρονεκτίνη και ο παράγοντας vWF, είναι το τριπεπτίδιο RGD[75]. Η βιολογική σπουδαιότητα του RGD έγκειται στο ότι αλλάζει την διαμόρφωση της ιντεγκρίνης. Η σύνδεση ιντεγκρίνης με λαμινίνες και κολλαγόνο σε διαφορετικά, κρυπτικά μοτίβα αναγνώρισης (κρυπτικές θέσεις RGD) μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά από πρωτεολυτική διάσπαση. Πρόσφατες μελέτες σε περιοχές σύνδεσης της φιμπρονεκτίνης και σε μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών υπέδειξαν μια δεύτερη, κοινή αμινοξική ακολουθία την LDVP (λευκίνη, ασπαρτικό οξύ, βαλίνη, προλίνη). Μάλιστα, ενώ η αλληλουχία των ακολουθιών RGD παραμένει αμετάβλητη, η αλληλουχία της LDVP ποικίλει με εναλλακτικούς συνδιασμούς να απαντώνται εξίσου [L/I (ισολευκίνη), D/E(γλουταμικό οξύ), S (σερίνη), T (θρεονίνη), V-P/S][4].

Στην περίπτωση δράσης των ιντεγκρινών ως μορίων προσκόλλησης κυττάρου προς κύτταρο, οι ιντεγκρίνες προκαλούν προσκόλληση ετεροτυπικού χαρακτήρα συνδεόμενες κυρίως με κάποια μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, όπως είναι το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης -1/-2 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1 /ICAM-2) και το αγγειακό μόριο προσκόλλησης (vascular adhesion molecule, VCAM). Άλλες τέτοιου τύπου γνωστές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται με μέλη της οικογένειας των σελεκτινών, όπως το ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης των λευκοκυττάρων-1 (**E**ndothelial **L**eukocyte **A**dhesion **M**olecule-1/ELAM-1 ή L-σελεκτίνη)[76–78].

1.7 Μεταγωγή σήματος από το εσωτερικό του κυττάρου στον εξωκυττάριο χώρο (inside-out signaling)

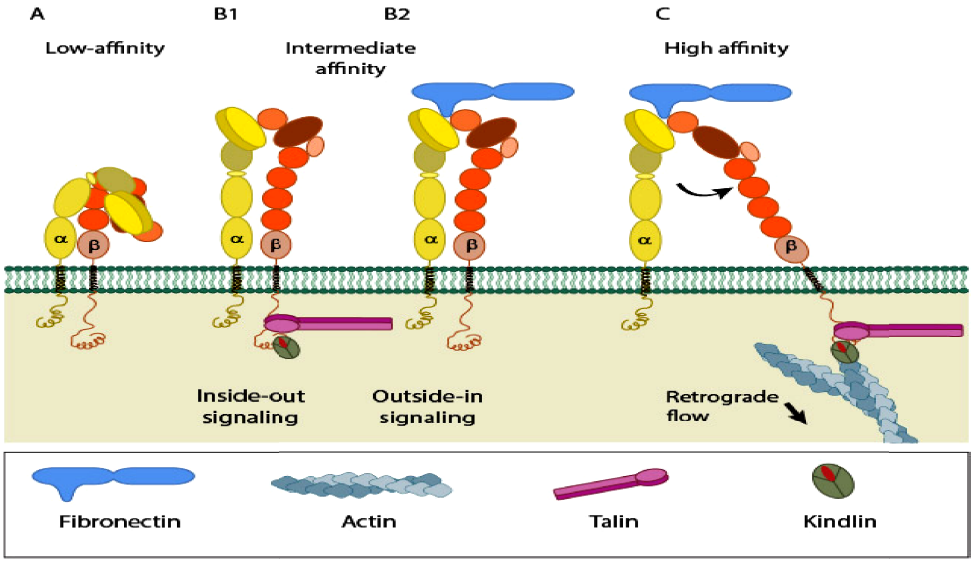
Η αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών περιοχών ανάμεσα στην υπομονάδα α και β φαίνεται απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί η ιντεγκρίνη σε ανενεργή κατάσταση. Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλεται παρουσία αγωνιστών, όπως χημειοκίνες, οι οποίες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες μέσω σηματοδότησης από υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες[79]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα των ιντεγκρινών μπορεί να οδηγήσει σε φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής επικράτειας των β υπομονάδων.

Η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της συγγένειας πρόσδεσης των ιντεγκρινών. Δέσμευση της κεφαλής της ταλίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή της υπομονάδας β οδηγεί σε αποδιάταξη της σύνδεσης των κυτταροπλασματικών περιοχών των υπομονάδων α και β της ιντεγκρίνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του εξωκυττάριου τμήματος της ιντεγκρίνης που αυξάνει τη συγγένεια με τον προσδέτη[80]. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί δυο μοντέλα για την αλλαγή αυτής της συγγένειας. Και στα δυο, η ανενεργή ιντεγκρίνη κάμπτεται, με την κεφαλή προς τη

μεμβράνη. Στο μοντέλο της ακαμψίας (deadbolt model), αυτή η κάμψη διατηρείται και στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη.

Κινήσεις των διαμεμβρανικών περιοχών δημιουργούν ολίσθηση των εξωκυτταρικών τμημάτων των υπομονάδων α και β και χαλάρωση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης[81]. Στο άλλο μοντέλο (switchblade model), η αποδιάταξη των κυτταροπλασματικών και διαμεμβρανικών περιοχών των υπομονάδων α και β οδηγεί σε αντίστοιχη μετακίνηση ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου (EGF-like repeat) στην υπομονάδα β, η οποία επάγει την κάμψη της κεφαλής εξωτερικά[47]. Και στα δυο μοντέλα, τα προτεινόμενα γεγονότα αλλάζουν μέσα σε δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές στην κεφαλή της ιντεγκρίνης, που αυξάνουν τη συγγένεια με τον προσδέτη[40].

Η συγγένεια δέσμευσης ρυθμίζει άμεσα τη φύση της δέσμευσης με τον προσδέτη και επηρεάζει το βαθμό και την κινητική της κυτταρικής προσκόλλησης. Στα λευκοκύτταρα, για παράδειγμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η μέση συγγένεια πρόσδεσης της ιντεγκρίνης αLβ2 με προσδέτες του ενδοθηλίου μπορεί να επιβραδύνει την κύληση των λευκοκυττάρων κατά μήκος του αγγειακού τοιχώματος χωρίς να προκαλεί την ενεργοποίησή τους. Κάτω από συνθήκες φλεγμονής όμως, η έκφραση κυτοκινών και ανοσοδιεγερτικών υποδοχέων από το επιθήλιο των αγγείων οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις υψηλής συγγένειας με τους υποδοχείς ιντεγκρινών δεσμεύοντας και σηματοδοτώντας την ενεργοποίηση και μεταφορά των λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής (**Εικόνα 3**)[82].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση ενεργοποίηση ιντεγκρίνης από το εσωτερικό του κυττάρου (inside-outsignaling), από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες , ή από ενεργοποίηση από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου (outside-in signaling). Η ενεργοποίηση αυτή πραγματοποιείται μέσω δέσμευσης με προσδέτες της ΕΘΟ. Και τα δύο οδηγούν σε πλήρη επέκταση των εξωκυτταρικών περιοχών. Η συγγένεια μιας ιντεγκρίνης με τον προσδέτη της καθορίζει την έκταση της σηματοδότησης.

1.8 Μεταγωγή σήματος από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου (outside-in signaling)

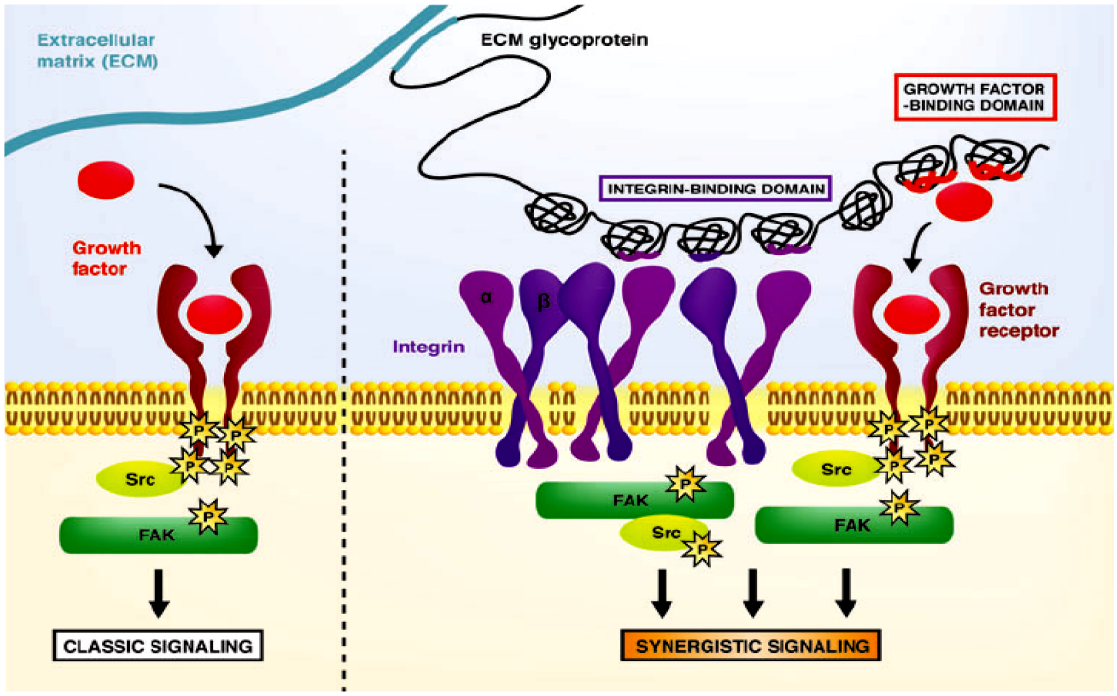
Έχει προταθεί ότι με τη δέσμευση εξωκυτταρικών προσδετών, οι ιντεγκρίνες συσσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη και μετάγουν σηματοδότηση στο εσωτερικό του κυττάρου (outside-in signaling). Η πρόσδεση εξωκυτταρικών προσδετών επάγει διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν σε αλληλεπίδραση της κυτταροπλασματικής περιοχής της ιντεγκρίνης με ενδοκυτταρικά μόρια μεταγωγής σήματος, κατόπιν του διαχωρισμού των κυτταροπλασματικών τμημάτων των υπομονάδων α και β [81]. Αυτά τα μόρια μπορεί να είναι ένζυμα ή πρωτεΐνες προσαρμογής που αλληλεπιδρούν με δομές δυναμικής προσκόλλησης, όπως οι εστίες προσκόλλησης και τα ποδοσώματα (μικρές προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης). Με αυτόν τον τρόπο, η συγγένεια μιας ιντεγκρίνης με τον προσδέτη της καθορίζει την έκταση της σηματοδότησης στις εστίες προσκόλλησης. Αυτές οι εστίες είναι ενεργά σημεία που μεταδίδουν πληροφορίες όπως η πυκνότητα του εξωκυττάριου προσδέτη, αλλά και η ένταση και η κατεύθυνση των εξωκυτταρικών δυνάμεων πάνω στο κύτταρο. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται οι ιντεγκρίνες είναι μέσω πρόσδεσης δισθενών ιόντων στην ειδική περιοχή των δομών I των υπομονάδων α και β[40]. Το σημείο πρόσδεσης της αλληλουχίας RGD έχει βρεθεί στα ετεροδιμερή των ιντεγκρινών αvβ3[81] και αIIbβ 3[83]. Πιο συγκεκριμένα, το σημείο πρόσδεσης αποτελείται από τη β-έλικα της υπομονάδας α και τη δομή I της υπομονάδας β. Η κρυσταλλική δομή της ιντεγκρίνης αvβ3 έδειξε ότι η κάμψη της κεφαλής συνδυάζεται με μικρή συγγένεια για τον προσδέτη[84]. Για το λόγο αυτό προτάθηκε ότι όταν η ιντεγκρίνη βρίσκεται σε αυτή τη διαμόρφωση, δεν μπορεί να δεσμευθεί με προσδέτη ή να πραγματοποιήσει μεταγωγή σήματος από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου. Παρόλα αυτά, βρέθηκε ότι όταν η ιντεγκρίνη αvβ3 είναι σε αυτή τη μορφή μπορεί να δεσμεύσει τη φιμπρονεκτίνη[85]. Έκτοτε, έχουν προταθεί αρκετές ενδιάμεσες διαμορφώσεις των ιντεγκρινών που επάγουν τη δέσμευση με προσδέτες και οδηγούν σε διαφορετικές ικανότητες προσκόλλησης ή διαφοροποίησης[86].

1.8.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος ιντεγκρινών

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις ιντεγκρίνες και τα οποία έχουν μελετηθεί καλύτερα είναι αυτά που περιλαμβάνουν τις κινάσες FAK (Focal adhesion kinasi) και ILK (integrin-linked kinase)[87,88]. Η κινάση εστιακής προσκόλλησης, FAK, συνδέει τα σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά της ενεργοποίησης των υποδοχέων ιντεγκρινών, όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF και του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor)[89,90].

Η FAK αποτελεί σημείο σύγκλισης ανάμεσα στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGFR-2 (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor) και την ιντεγκρίνη ανβ3 και ρυθμίζει τη συγκρότηση των εστιών προσκόλλησης που είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτοφωσφορυλίωση της β υπομονάδας της ιντεγκρίνης στην Tyr397 επάγει τη δέσμευση των πρωτεϊνών SRC ή FYN. Η SRC αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η παξιλίνη και πρωτεΐνες-προσαρμοστές, όπως η p130CAS. Η φωσφορυλίωση της FAK στην Tyr925 από την SRC οδηγεί στη δέσμευση του συμπλόκου που αποτελείται από τη δεσμευμένη σε υποδοχέα αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνη-2 (**G**rowth **F**actor **R**eceptor-**B**ound **P**rotein 2/GRB2) και τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (**S**on **O**f **S**evenless, SOS). Εν συνεχεία, οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAPKs[91], ενώ η φωσφορυλίωση της FAK στην Tyr397 από την SRC επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με την υπομονάδα p85 της PI3K που οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT/PKB. Εναλλακτικά, η FYN που ενεργοποιείται μετά από αλληλεπίδρασή της με τις β1 ιντεγκρινικές υπομονάδες και φωσφορυλιώνει την SHC. Κατόπιν, η SHC αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο GRB-2/SOS και ενεργοποιεί το μονοπάτι των πρωτεϊνών RAS και RAF αλλά και τις MAPKs[92].

Το άλλο κύριο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των ιντεγκρινών εκκινείται από την αλληλεπίδραση της ILK (**I**ntegrin-**L**inked **K**inase) με την β1, β2 ή β3 ιντεγκρινική υπομονάδα[93,94]. Η ILK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εντοπίζεται στις εστιακές επαφές με χαμηλή ενεργότητα κινάσης. Όμως η πρόσδεση των κυττάρων σε μόρια της ΕΘΟ μέσω των ιντεγκρινών, ή η παρουσία αυξητικών παραγόντων, προκαλεί την εξαρτώμενη από την PI3K ενεργοποίηση της ILK[94] και συμβάλλει στην επικοινωνία των μονοπατιών σηματοδότησης που επάγονται από την ινσουλίνη και τη φιμπρονεκτίνη. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναγνωρίσει μία σειρά πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται από την ενεργοποιημένη ILK, όπως η AKT/PKB (Ser473) και η GSK3β (Ser9). Στην πρώτη περίπτωση η εν λόγω φωσφωρυλίωση δρα ενεργοποιητικά, ενώ στη δέυτερη κατασταλτικά[95]. Η ILK μπορεί να φωσφορυλιώνει και άλλα υποστρώματα όπως η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και της αφιξίνης[96]. Οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν επίσης με μία σειρά διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπως οι τετρασπανίνες (TM4δP), οι οποίες δεσμεύονται στην εξωκυτταρική περιοχή των ιντεγκρινών[97]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκαλούν εκτεταμένη συσσωμάτωση των ιντεγκρινών και άλλων πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στο σχηματισμό συμπλόκων ρύθμισης σηματοδοτικών μονοπατιών που ενισχύεται από την ταυτόχρονη ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (**Εικονα 4**).



Εικόνα 4. Μηχανική του μικροπεριβάλλοντος σηματοδότησης αυξητικών παραγόντων. Η προσκόλληση των ιντεγκρινών και των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων αυξάνει συνεργιστικά και παρατείνει τη σηματοδότηση του εκάστοτε αυξητικού παράγοντα. Η πρόσληψη κοινών μορίων από την αμφότερη αλληλουχία σηματοδότησης προκαλεί ενισχυμένη επίδραση του αυξητικού παράγοντα.

1.8.2 Αλληλεπίδραση ιντεγκρινών με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων

Υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με μονοπάτια σηματοδότησης αυξητικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, ο VEGF και ο bFGF (**b**asic **F**ibroblast **g**rowth **F**actor) επάγουν την έκφραση και ενεργοποίηση αρκετών ιντεγκρινών, όπως είναι η ανβ3, η ανβ5 και η α5β1, που συμμετέχουν στην αγγειογένεση[98]. Αντίθετα, αρκετοί ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης όπως η ενδοστατίνη, ασκούν τη δράση τους μπλοκάροντας τις ιντεγκρίνες[99]. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν αλληλεπίδραση στο επίπεδο των υποδοχέων. Για παράδειγμα, η ιντεγκρίνη α5β1 ρυθμίζει τον επαγόμενο από φιμπρονεκτίνη πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των EGF υποδοχέων[100]. Αντίστοιχα, η ιντεγκρίνη ανβ3 αλληλεπιδρά με τον PDGF-β και με τον VEGFR-2 και ρυθμίζει τη δραστικότητά τους[98,101,102].

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του VEGFR-2 επάγει τη φωσφορυλίωση της FAK στη Ser732, που οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της FAK, κάνοντας προσβάσιμη την Tyr407 για φωσφορυλίωση από την Pyk2, που με τη σειρά της ενεργοποιείται από την ιντεγκρίνη β3[103]. Η FAK διαδραματίζει επίσης βασικό ρόλο στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων από το σύμπλοκο ιντεγκρίνης ανβ5/VEGFR-2[104,105]. Επιπλέον, φαίνεται ότι η SRCμπορεί να ρυθμίζει μονοπάτια μεταγωγής

σήματος αυξητικών παραγόντων και μορίων εξωκυττάριας ύλης επιστρατεύοντας την ιντεγκρίνη α5β1 σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα με τη FAK[106].

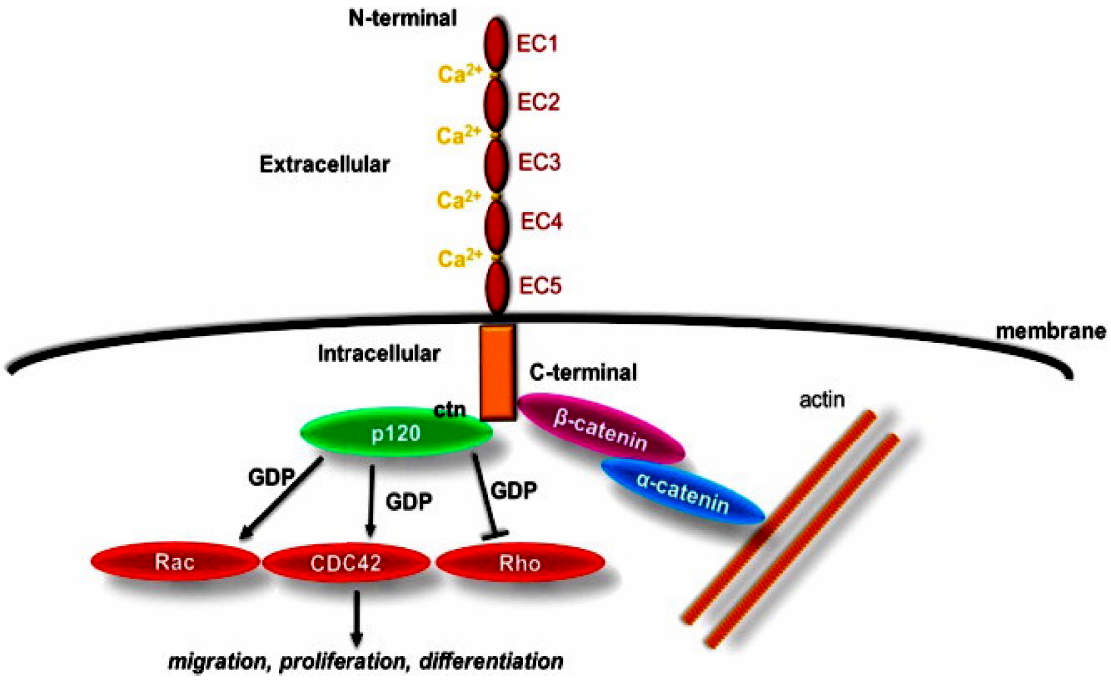
Είναι επίσης γνωστό ότι οι ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5 επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ανταπόκριση στην ενεργοποίηση του VEGFR-2 από τον VEGF. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στη σηματοδότηση που επάγεται και από τις δυο ιντεγκρίνες συμμετέχουν τα ίδια μόρια, όπως η Src και FAK, φαίνεται ο διαφορετικός ρόλος που μπορεί αυτές να έχουν στην αγγειογένεση. Για παράδειγμα, μόνο η ιντεγκρίνη ανβ5 φαίνεται ότι εξαρτάται από τη σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης για να επάγει τη μετανάστευση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ένα άλλο παράδειγμα αλληλεπίδρασης ιντεγκρινών με αυξητικούς παράγοντες είναι και η αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών α4β1 και α6β1 με την πλειοτροπίνη, καθώς και με τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας LPR (low density lipoprotein receptor-related protein)[107].

Γενικά, φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ιντεγκρίνες και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων αυξάνει τη δραστικότητα και των δυο στη σηματοδότηση για την κυτταρική μετανάστευση[108]. Παραταύτα, επιπρόσθετες μελέτες μένει να διευκρινίσουν τους μηχανισμούς που διέπουν τις εν λόγω αλληλεπιδράσεις.

1.9 Καδερίνες/Cadherins

Οι καδερίνες είναι μία οικογένεια μορίων συνάφειας CAMS εξαρτώμενα από τα ιόντα Ca^{2+}, τα οποία αρχικά αποτελούνταν από ένα μικρό αριθμό διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών. Σήμερα γνωρίζουμε περισσότερα από 100 μέλη που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια, τα οποία, αν και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, έχουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς τη δομή, τη λειτουργία, το μοριακό βάρος και την έκφραση σε όλους σχεδόν τους ιστούς των πολυκύτταρων οργανισμών.

Η βασική δομή τους αποτελείται από 3 κύριες περιοχές: μία εξωκυττάρια περιοχή η οποία μεσολαβεί σε ειδικές συγκολλήσεις, μία διαμεμβρανική περιοχή η οποία επικαλύπτει την κυτταρική μεμβράνη και από μία κυτταροπλασματική περιοχή η οποία εξαπλώνεται στο κύτταρο και αποτελείται από 160 αμινοξέα συνδεόμενα με μια ομάδα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών του ονομάζονται κατενίνες. Οι κατενίνες χρησιμοποιούνται σαν δεσμός σύνδεσης μεταξύ των καδερινών και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**[109].



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της καδερίνης και μεταγενέστερη σηματοδότηση. Οι καδερίνες περιέχουν πέντε εξωκυτταρικές υποπεριοχές (EC1-5) που συνδέονται με θέσεις δέσμευσης του Ca^{2+} και μία ενδοκυτταρική περιοχή. Οι κλασσικοί συνδέτες των καδερινών συμπεριλαμβάνουν την β-κατενίνη, η οποία δεσμεύεται με την α-κατενίνη που συνδέει το σύμπλοκο AI ακτίνης, καθώς επίσης και την ρ120 κατενίνη, η οποία ρυθμίζει μικρές GTPases όπως Rho, Rac και Cdc42. Η δέσμευση της καδερίνης ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων.

Η έκφραση των καδερινών στη μεμβράνη επιφάνειας των κυττάρων προϋποθέτει και την αντίστοιχη έκφραση των ειδικών κατενινών, διαφορετικά η έκφραση τους θα ήταν αδύνατη[110]. Έχει αποδειχθεί ότι τόσο η β- όσο και η γ-κατενίνη συνδέονται με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη φασίνη και σχηματίζουν τα ινίδια και τις προεκβολές (φιλοπόδια), που είναι απαραίτητα για την κινητικότητα των κυττάρων[111].

Η εξωκυττάρια περιοχή είναι πολύ σημαντική για την αντίδραση κυττάρου-κυττάρου καθώς επίσης και για το δεσμό μεταξύ των καδερινών[112] που όπως είναι γνωστό προσδένονται με υποδοχείς που ανήκουν στην ίδια κατηγορία, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται ομοιοτυπικός δεσμός[113]. Αυτή η ομοφιλική αναγνώριση των καδερινών, οφείλεται πιθανόν στην ακολουθία ενός τριπεπτιδίου HAV (Histidine – Alanine –Valihine). Τα αμινοξέα που περιβάλλουν την αλληλουχία HAV είναι πολύ σημαντικά για τον ειδικό δεσμό μεταξύ των καδερινών[114].

Οι καδερίνες μπορούν να σχηματίσουν ένα πιο ασθενή δεσμό με άλλα μέλη καδερινών που ανήκουν σε διαφορετικές υποομάδες, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό σαν ετεροτυπικός δεσμός. Για παράδειγμα οι καδερίνες Ε μπορούν να προσδεθούν με ομοιοτυπικό με τις καδερίνες Ε σε διπλανά κύτταρα και με ετεροτυπικό δεσμό με τις καδερίνες Ν στα ίδια κύτταρα. Οι καδερίνες είναι οι κύριοι υπεύθυνοι παράγοντες προσκόλλησης μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων[115].

Οι καδερίνες συντίθενται αρχικά ως πρόδρομα πολυπεπτίδια. Στη συνέχεια, απαιτείται μια σειρά τροποποιήσεων που περιλαμβάνουν τη γλυκοζυλίωση, τη φωσφορυλίωση και την κατάτμηση της πρωτεΐνης, προκειμένου να προκύψει τελικά η ώριμη πρωτεΐνη. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ιόντα ασβεστίου είναι εντελώς απαραίτητα για να εκδηλώσουν οι καδερίνες τη διαμορφωτική και συνδετική λειτουργία τους. Απουσία ιόντων ασβεστίου, όχι μόνο δεν εκδηλώνεται η προσκολλητική δράση των καδερινών που παραμένουν αδρανείς, αλλά επιπλέον αποικοδομούνται ταχύτατα με τη δράση ειδικής πρωτεάσης[116]. Ανάλογα με τον τύπο και το είδος του ιστού που ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά γίνεται η παρακάτω κατάταξη των E-Cadherins στα επιθηλιακά κύτταρα, των N-Cadherins στα νευρικά κύτταρα, των P-Cadherins στον πλακούντα και των L–Cadherins στο επιθήλιο του ήπατος και του εντέρου. Ο μορφογενετικός ρόλος των καδερινών στους πολυκύτταρους οργανισμούς καθορίζεται επακριβώς με βάση την ποσοτική, την ποιοτική, την ιστοειδική και τη χρονική έκκρισή τους[117–119].

Οι καδερίνες έχουν κυρίαρχη επίδραση στο διαχωρισμό και στη συσσώρευση των κυττάρων, και θεωρούνται μόρια-κλειδιά στη διαδικασία της μορφογένεσης. Αυτό αποδείχθηκε με μια σειρά τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειραμάτων. Μεταλλαγμένοι τύποι καδερινών που δεν έχουν την εξωκυτταρική ή την κυτταροπλασματική περιοχή τους οδήγησαν σε σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη. Οι N-cadherins ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο νευρικό ιστό, αλλά η έκφραση τους έχει εντοπιστεί και σε επιθηλιακό, αλλά και σε μεσενχυματικό ιστό. Η συνδετική εξειδίκευση των καδερινών αποσπά κατά περίπτωση στα αρχικά στάδια της μορφογένεσης ένα είδος κυττάρων από έναν ετερόλογο κυτταρικό πληθυσμό. Η έννοια αυτή αποτελεί σήμερα τη μοριακή βάση της μορφογένεσης. Οι καδερίνες δρουν ως μορφορυθμιστικά μόρια κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αλλά έχουν και μετέπειτα άμεση επίδραση στη μορφολογία, την αρχιτεκτονική και στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων[120,121].

Η E-cadherin είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 16q22.1.95[122]. Παράγεται ως πρόδρομο πολυπεπτίδιο (μοριακού βάρους 135 kDa) από όλα τα επιθηλιακά κύτταρα του οργανισμού. Από το πρόδρομο αυτό πολυπεπτίδιο με εκτεταμένη καρβοξυλίωση σχηματίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο το ώριμο πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη. Εκεί καταλαμβάνει διαμεμβρανική θέση, παρουσιάζοντας ένα εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο, το οποίο συνδέεται με ιόντα ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο και ένα καρβοξυλικό άκρο, το οποίο συνδέεται με τις κατενίνες (α, β και γ κατενίνη). Μεσολαβεί στην κυτταρική προσκόλληση σε όλους τους επιθηλιακούς ιστούς. Είναι απαραίτητη για την επιθηλιοποίηση του πρώιμου εμβρύου, την κυτταρική αναδιάταξη, τη μορφογένεση του ιστού, την καθιέρωση κυτταρικής πολικότητας και τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών[39].

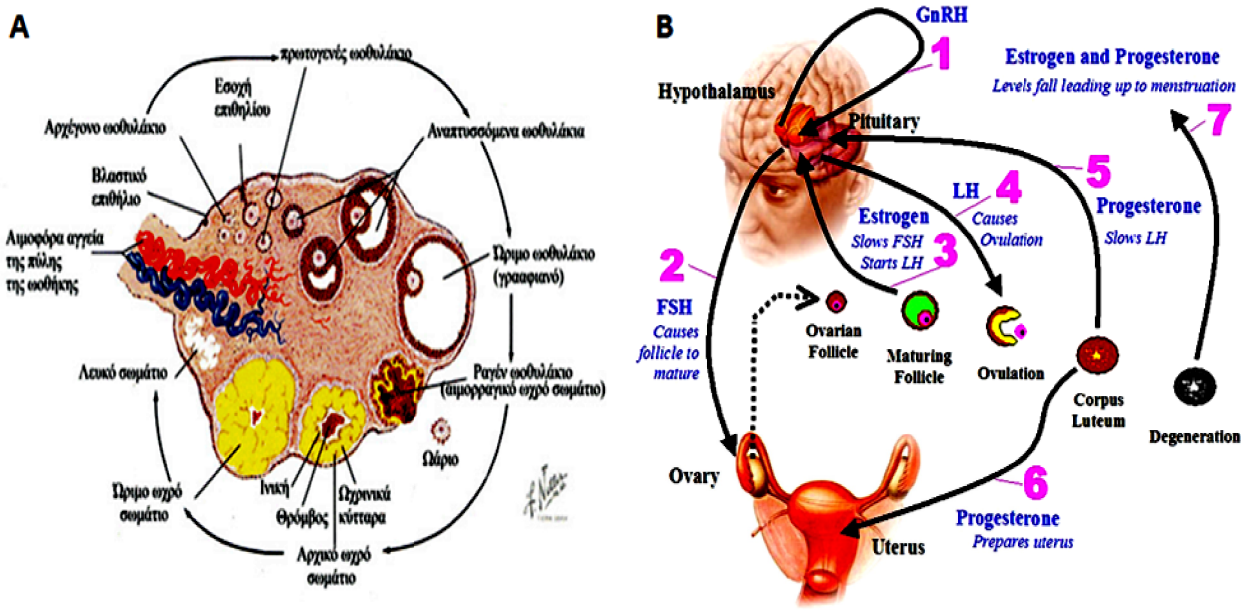
1.10 Αναπαραγωγή

Η γονιμοποίηση, η εμφύτευση και η πλακουντοποίηση είναι δυναμικά κυτταρικά γεγονότα που απαιτούν όχι μόνο συγχρονισμό μεταξύ του μητρικού περιβάλλοντος και του εμβρύου, αλλά και πολύπλοκη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Από τα ασπόνδυλα έως τα σπονδυλωτά, οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση, την ανάπτυξη των εμβρύων και την πλακουντοποίηση. Ειδικά στα θηλαστικά, οι αλληλεπιδράσεις ΕΘΟ με το επιθήλιο που φιλοξενεί κάθε εμβρυϊκό στάδιο διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην τύχη του αναπτυσσόμενου εμβρύου, την ικανότητά του να μεταναστεύσει στη μήτρα, να εμφυτευθεί και εν συνεχεία, να αναπτυχθεί μέχρι τον τοκετό.

1.11 Ωοθυλακική ανάπτυξη

Η ωοθυλακιογένεση όπως και η σπερματογένεση, αποτελούν πολύπλοκα φυσικά μοντέλα ανάπτυξης και εξέλιξης αρχέγονων γαμετικών κυττάρων σε ώριμα και απόλυτα διαφοροποιημένα κυτταρικά συστήματα. Η ανάπτυξη αυτή γίνεται μέσα στο μικροπεριβάλλον των γονάδων, ξεκινώντας από το αρχέγονο γαμετικό κύτταρο και φτάνοντας στο ώριμο ωοθυλάκιο. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί δύο μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ωρίμανση και ωορρηξία του ωοκυττάρου. Στον πρώτο μηχανισμό, η ωορρηξία προϋποθέτει την παρουσία σπέρματος και ολοκληρώνεται μετά την διαδικασία του ζευγαρώματος. Στον δεύτερο μηχανισμό ωρίμανσης ωαρίου και ωορρηξίας ακολουθείται ένας περιοδικός ορμονικός κύκλος. Αυτός ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται από μια περιοδικότητα στην ωορρηξία και εμφανίζεται στα περισσότερα θηλαστικά, μεταξύ των οποίων ο άνθρωπος και το ποντίκι.

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι συνεχής και αυτό σημαίνει ότι η ωοθήκη στα ενήλικα θηλαστικά είναι ένα δυναμικό όργανο που περιέχει ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (**Εικόνα 6**).



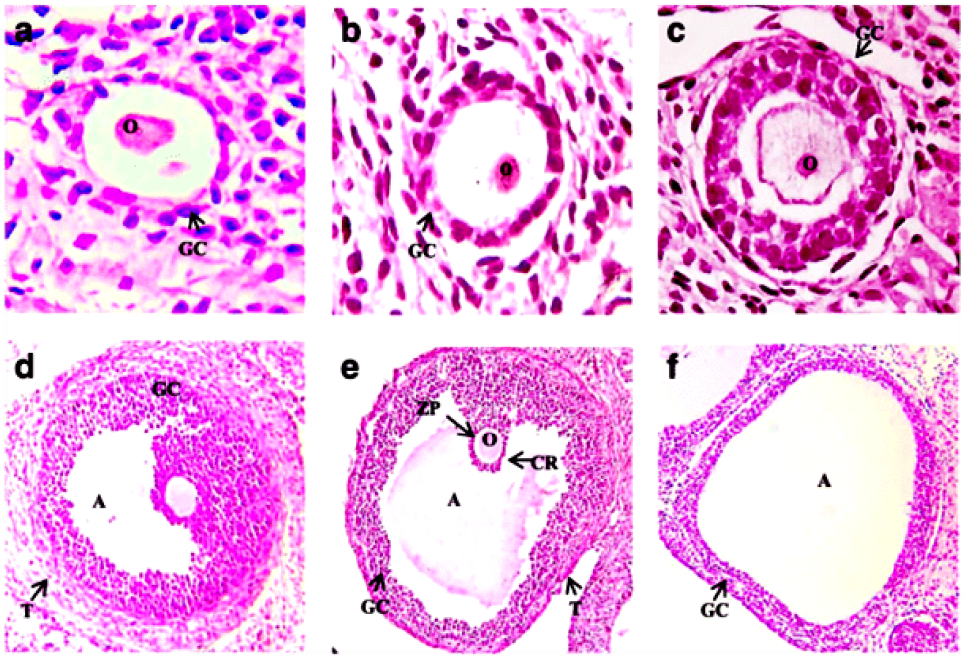
Εικόνα 6. Διατομή της ανθρώπινης ωοθήκης (Α). Περιγράφονται τα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων καθώς και ο ρόλος ορμονών της υπόφυση στην ορμονική ρύθμιση του κύκλου των θηλαστικών και στην ωρίμανση των ωοθυλακίων (Β).

Η ρύθμιση της ωοθυλακικής ανάπτυξης των ωοθυλακίων εξαρτάται από ορμόνες με ενδοκρινή και παρακρινή δράσης, προερχόμενες από την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του ωοθυλακίου και τη φυσική ακαμψία του περιβάλλοντος ιστού. Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τον ορμονικό κύκλο, τη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων και την ωρίμανση του ωοκυττάρου[123].

Η διέγερση του υποθαλάμου οδηγεί τα νευροεκκριτικά κύτταρα στην απελευθέρωση του εκλυτικού παράγοντα των γοναδοτροπινών (**G**onadotropin-**R**eleasing **F**actor, GnRH) που υπόκειται σε παλίνδρομο ρύθμιση (feedback) από τις στεροειδείς ορμόνες των γονάδων (ωοθήκη, όρχεις). Ο παράγοντας αυτός διεγείρει με τη σειρά του την υπόφυση η οποία απελευθερώνει τις γοναδοτροπίνες, την θυλακιοτρόπο (**F**ollicle-**S**timulating **H**ormone, FSH) αλλά και την ωχρινοποιητική ορμόνη (**L**uteinizing **H**ormone, LH)[124]. Στα θηλαστικά, κάθε ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα αρχέγονο θυλάκιο (primordial follicle) που αποτελείται από το αρχέγονο ωοκύτταρο και περιβάλλεται από μια στιβάδα επιθηλιακών κοκκιωδών θυλακιακών κυττάρων (granulosa cells, GC) και από μια στιβάδα λιγότερο οργανωμένων μεσεγχυματικών θυλακιακών κυττάρων (thecal cells). Τα ωοθυλάκια αυτά δημιουργήθηκαν κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και βρίσκονται στην πρόφαση Ι της 1ης μειωτικής διαίρεσης σε φάση ηρεμίας και ανενεργά στο έξω τμήμα της φλοιώδους μοίρας της ωοθήκης. Η ανενεργός αυτή κατάσταση διαρκεί έως την εφηβεία, ως την ωρίμανση δηλαδή των θηλυκών ατόμων, η οποία ξεκινά περίπου στην 6η εβδομάδα του θηλυκού μυός μετά τη γέννησή του[125].

Περιοδικά, καθώς μια ομάδα αρχέγονων θυλακίων μπαίνει σε φάση αύξησης, τα κοκκώδη κύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν ένα πολύστιβο πρωτογενές ωοθυλακίο, με διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρας GC (κυβοειδή) τα οποία περιβάλλουν το πρωτογενές ωοκύτταρο. Το ωοκύτταρο και τα θυλακιακά κύτταρα που το περιβάλλουν σχηματίζουν κυτταροπλασματικές προεκτάσεις οι οποίες συνδέονται και επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω δεσμοσωμάτων και χασμοσυνδέσεων προκειμένου το ωοκύτταρο να λαμβάνει τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες και κυτοκίνες. Τόσο το ωοκύτταρο όσο και το θυλάκιο όταν αναπτύσσονται αυξάνονται σε διάμετρο και ενεργοποιούνται μεταγραφικά.

Τα πρωτογενή θυλάκια αναπτύσσουν υποδοχείς στην ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη FSH. Ένας λεπτός υμένας πολυμερούς γλυκοπρωτεΐνης που ονομάζεται διαφανής ζώνη σχηματίζεται γύρω από το ωοκύτταρο, διαχωρίζοντάς το από τα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα. Η διαφανής ζώνη, ακολουθεί το ωάριο μετά την ωορρηξία και διευκολύνει τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. **Στάδια ωοθυλακικής ωρίμανσης**. Αρχέγονο θυλάκιο (primordial follicle), b: πολύστιβο πρωτογενές ωοθυλακίο, με διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα GC τα οποία περιβάλλουν το πρωτογενές ωοκύτταρο, c:δευτερογενές ωοθυλάκιο με πολύστιβο επιθήλιο, d: τριτογενές ωοθυλακίο με άντρο, e: γραφιανό ωοθυλάκιο (graffian follicle) όπου το ωοκύτταρο περιβάλλεται από την διαφανή ζώνη (zona pellucida) τον ακτινωτό στέφανο και το άντρο, f: κυστικό θυλάκιο με μεγάλο αντρο χωρίς ωοκύτταρο και με μειωμένη στοιβάδα GC.

Το πρωτογενές ωοκύτταρο, το οποίο είχε μείνει στην πρόφαση της 1ης μείωσης, ολοκληρώνει την πρώτη μείωση και μετατρέπεται σε δευτερογενές ωοκύτταρο. Αυτό προχωράει μέχρι τη μετάφαση της δεύτερης μείωσης, την οποία ολοκληρώνει με την ωορρηξία. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, το πολύστιβο

επιθήλιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου αρχίζει να διαλύεται κατά τόπους. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται στο ωοθυλάκιο μια κοιλότητα (το διακριτικό χαρακτηριστικό του τριτογενούς ωοθυλακίου), το άντρο του ωοθυλακίου (antral follicle), το οποίο γεμίζει με υγρό που εκκρίνεται από τα κοκκιώδη κύτταρα και είναι πλούσιο σε πολυσακχαρίτες και οιστρογόνα. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα της θήκης έχουν ήδη διαφοροποιηθεί σε δύο στιβάδες, την έσω και την έξω, και εμπεριέχουν ένα εκτεταμένο δίκτυο τριχοειδών αγγείων. Τα κύτταρα της έξω στιβάδας ενσωματώνονται στο στρώμα της ωοθήκης, ενώ τα κύτταρα της έσω στιβάδας είναι κάτω από την επίδραση των γοναδοτροπινών και των στεροειδών ορμονών[126].

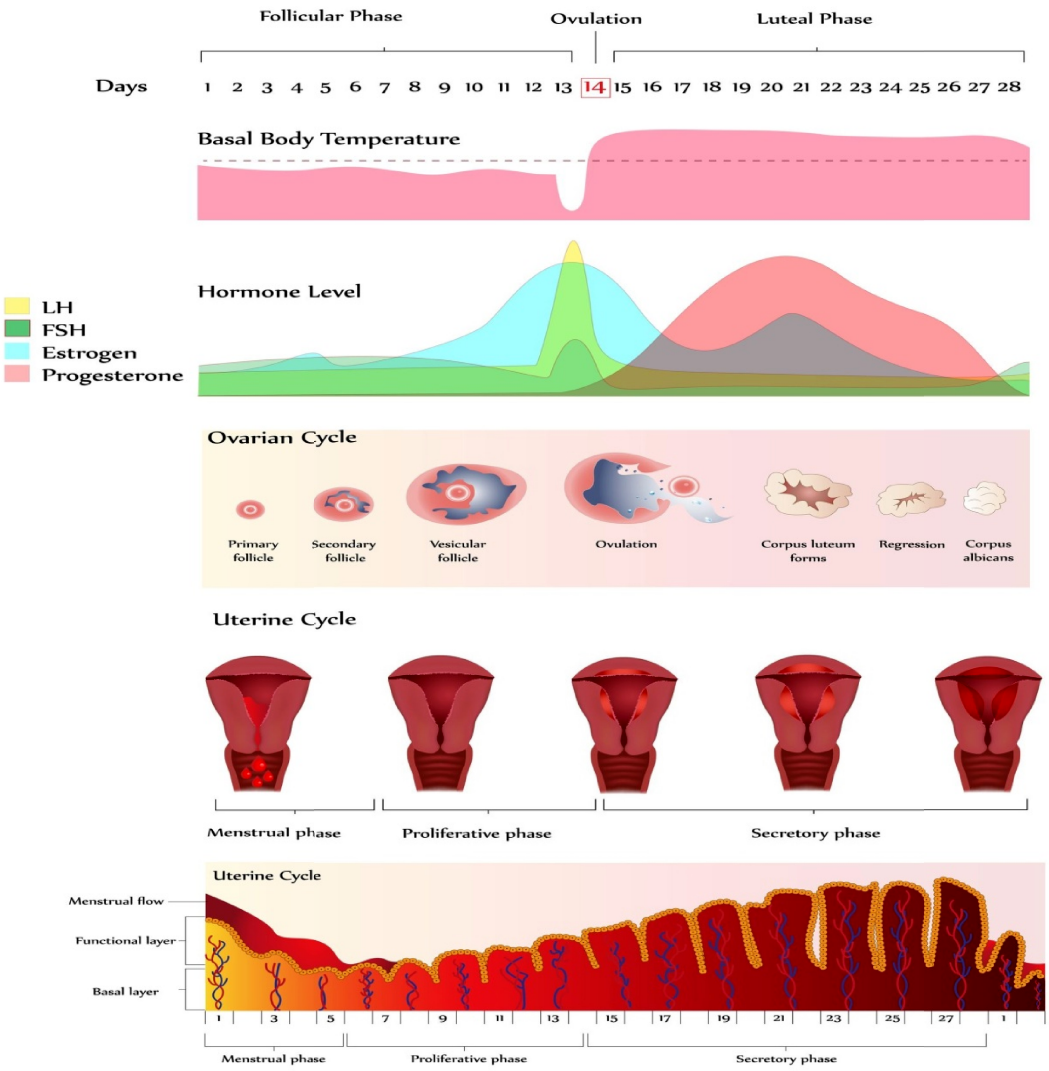
Το ωοκύτταρο κρατά μια αυστηρά καθορισμένη χωροταξική θέση μέσα στο ωοθυλάκιο. Τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν διαμορφώνουν τον ωοφόρο δίσκο στερούμενα υποδοχέων γοναδοτροπινών υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων (Growth Differentiated Factor-9/GDF-9, Bone Morphogenic Protein 4, BMP4) που ανήκουν στην υπερομάδα του TGF-β (Transforming growth factor beta), παρουσιάζουν πολύ μεγάλη διαφοροποίηση και δεν παράγουν οιστρογόνα. Η κύρια δραστηριότητά τους είναι η παραγωγή υαλορουνικού οξέους και πρωτεογλυκανών, απαραιτήτων συστατικών της διαφανούς ζώνης[127].

Στην αρχή του ωοθηκικού κύκλου, η FSH προκαλεί την ανάπτυξη των θυλακιακών κυττάρων, επηρεάζοντας ειδικά τα κοκκιώδη κύτταρα. Με την αύξηση των οιστρογόνων, επάγεται η έκφραση των LH υποδοχέων στα ώριμα θυλακιακά κύτταρα και η παραγωγή αυξημένων επιπέδων οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη έχει διπλή δράση (ενεργοποιεί είτε αρνητικούς, είτε θετικούς μηχανισμούς ανάδρασης). Η αρνητική δράση στην υπόφυση έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της FSH και την αναστολή της επίδρασής της στα κοκκώδη κύτταρα. Τα ωοθυλάκια που παράγουν τα περισσότερα οιστρογόνα σε απάντηση στην FSH είναι αυτά που θα ωριμάσουν, ενώ τα υπόλοιπα αποπίπτουν. Αυτό συμβαίνει διότι τα ωοθυλάκια αυτά έχουν τον μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων FSH και επομένως μπορούν να προσδέσουν την διαθέσιμη FSH την ώρα που η ποσότητα της συγκεκριμένης γοναδοτροπίνης έχει μειωθεί στην κυκλοφορία[128,129]. Οι γοναδοτροπίνες δρουν συνεργιστικά , έτσι η αύξηση της FSH αυξάνει το υγρό στο άντρο του ωοθυλακίου, διεγείρει την παραγωγή των προσταγλανδινών (PG) που προκαλούν σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, ενεργοποιούν το πλασμινογόνο και το υαλουρονικού οξύ προκαλώντας τελικά την αποκόλληση του ωοφόρου λοφιδίου και αυξάνοντας την ενδοωθυλακική πίεση οδηγώντας στην ωορρηξία[130]. Η θετική ανάδραση αυξάνει την έκριση των GnRH και της LH. Αυτή η απότομη παροδική αύξηση της LH (LH surge), συνοδευόμενη από τα χαμηλά επίπεδα της FSH, προκαλεί την ωορρηξία.

Η αυξημένη LH επάγει τη βιοσύνθεση c-AMP που διεγείρει την ωχρινοποίηση και την επανέναρξη της μειωτικής διαίρεσης[131]. Η αυξημένη LH εξουδετερώνει επίσης τους τοπικούς ανασταλτικούς παραγόντες

(αναστολέα της ωχρινοποίησης και αναστολέα της ωρίμανσης του ωοθυλακίου), αυξάνει την έκκριση της προγεστερόνης και δραστηριοποιεί πρωτεολυτικά ενζύμα (πρωτεάσες) που επάγουν την θραύση του ωοθυλακικού τοιχώματος[132,133]. Από τη θέση αυτή απελευθερώνεται το ωοκύτταρο μαζί με τα κοκκιώδη θυλακιακά κύτταρα και εισέρχεται στον ωαγωγό με τη βοήθεια της κίνησης του κροσσωτού επιθηλίου του αγωγού. Μετά την ωοθυλακιορρηξία αποκαθίσταται το ρήγμα στο βλαστικό επιθήλιο της ωοθήκης και η εναπομείνασα κοιλότητα του ωοθυλακίου, γεμίζει αρχικά με αίμα (ερυθρό σωμάτιο). Στη συνέχεια, υπό την επίδραση της LH, τα κοκκιώδη κύτταρα της κοιλότητας ωχρινοποιούνται (κοκκιώδη ωχρινικά κύτταρα) και δημιουργείται το ωχρό σωμάτιο (corpus luteum). Το ωχρό σωμάτιο λειτουργεί ως ενδοκρινής αδένας και παράγει κατά κύριο λόγο προγεστερόνη και μικρή ποσότητα οιστρογόνων. Η προγεστερόνη αναστέλλει την ωρίμανση νέων ωοθυλακίων[134,135].

Αν το ωάριο γονιμοποιηθεί, το ωχρό σωμάτιο εκκρίνει ακόμα μεγαλύτερα ποσά στεροειδών μέχρι το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης. Τότε, η παραγωγή στεροειδών από το ωχρό σωμάτιο ελαττώνεται και ο πλακούντας γίνεται η κύρια πηγή παραγωγής των ορμονών αυτών. Στην περίπτωση επιτυχούς εγκυμοσύνης στον άνθρωπο η μετέπειτα διατήρηση της λειτουργίας του ωχρού σωματίου και επομένως η διατήρηση της σύνθεσης προγεστερόνης, επιτυγχάνεται μέσω της δράσης της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (human Chorionic Gonadotropin, hCG) μιας ορμόνης που μοιάζει πολύ με την LH. Μετά την σύλληψη παράγεται φυσικά από το αναπτυσσόμενο και σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης από τον πλακούντα. Αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα LHCG (**L**uteinizing **H**ormone/**C**horiogonadotropin **R**eceptor) και διασφαλίζει την διατήρηση του ωχρού σωματίου στην αρχή της εγκυμοσύνης με σκοπό την παραγωγή της προγεστερόνης η οποία εμπλουτίζει την μήτρα με αιμοφόρα και τριχοειδή αγγεία για την συντήρηση του εμβρύου[136].



Εικόνα 8. Διάγραμμα ενός τυπικού εμμήνου κύκλου διάρκειας 28 ημερών στον άνθρωπο. Απο πάνω προς τα κάτω απεικονίζονται η έκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση,των στεοειδών ορμονών της ωοθήκης και οι διακυμάνσεις των επιπέδων τους στο πλάσμα, τα στάδιο ωρίμανσης ωοθυλακίων στην ωοθήκη και οι μεταβολές στο επιθήλιο της μήτρας.

Εφόσον δεν συμβεί γονιμοποίηση, το ωχρό σωμάτιο εκφυλίζεται, γεμίζει με συνδετικό ιστό (λευκό σωμάτιο, corpus albicans) και παραμένει στην ωοθήκη, ακολουθεί πτώση της LH, αποδόμηση του ωχρού σωματίου σε λευκό σωμάτιο, πτώση της προγεστερόνης και αύξηση της FSH με σκοπό την έναρξη ενός νέου κύκλου. Στο σύνολο αυτής της εξελικτικής πορείας η απώλεια των ωοθυλακίων δια μέσου απόπτωσης είναι τεράστια με αποτέλεσμα ένας πολύ μικρός αριθμός ωοθυλακίων, να ωριμάζει και να φτάνει στο στάδιο της ωορρηξίας.

Η ωοθυλακιορρηξία στα ποντίκια σε ιδανικές συνθήκες συμβαίνει αυτόματα κάθε 4 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτής απελευθερώνονται σε διάστημα 2-3 ωρών 8 με 12 ωάρια, ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του μυός. Ο καταμήνιος κύκλος τους μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς περιβαλλοντικούς

παράγοντες, ενώ μπορεί να προκληθεί και τεχνητά με ενέσεις ορμονών προκλήσεις πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Σε κάθε φυσικό κύκλο λίγα μόνο ωοθυλάκια ανταποκρίνονται στην αύξηση της FSH, ενώ η μεσοκυκλική αιχμή της LH προκαλεί την ωοθυλακιορρηξία.

Κατά την ωοθυλακική ανάπτυξη υπάρχει συνεχής επικοινωνία και αλληλοεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ωοθυλακίου (ωοκύτταρο, κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης) και εκείνων του στρώματος που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρχιτεκτονική του ωοθυλακίου και από διάφορους ενδοκρινείς, παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες που δρουν με χωρικό και χρονικό τρόπο για να ρυθμίσουν και να συντονίσουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Οι παράγοντες αυτοί προέρχονται από αυτά τα ίδια κύτταρα μέσα στο αυστηρά κλειστό σύστημα του ωοθυλακίου.

Οι εκτεταμένες και περίπλοκες αλλαγές στη φυσική διάταξη των κυττάρων μέσα στο αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο υποδεικνύει ότι η ΕΘΟ είναι ένας σημαντικός και δυναμικός παράγοντας στην ωοθυλακιογένεση. Παρέχοντας δομική υποστήριξη για τον σχηματισμό και την ωρίμανση των ωοθυλακίων, η ΕΘΟ δρα ως δεξαμενή για παρακρινή και ενδοκρινικά σήματα εντός των ωοθηκών και επιτρέπει ή περιορίζει την πρόσβασή τους στα κύτταρα στο εσωτερικό του ωοθυλακίου. Επιπλέον, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, διαλυμένες στην ΕΘΟ μπορούν να δράσουν με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της ατρησίας των ωοθυλακίων. Η σύσταση της ΕΘΟ έχει χαρακτηριστεί σε πολλά διαφορετικά είδη, όπως στα βοοειδή, αλλά και στον άνθρωπο[137–140] και στους αρουραίους[141] όπου παρουσιάζει παρόμοιο μοτίβο κατανομής. Η σύσταση της ωοθηκικής ΕΘΟ αποτελείται από λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου I-IV, φιμπρονεκτίνη, διάφορες γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες.

Η αρχιτεκτονική των ωοθυλακίων και η σύσταση της ΕΘΟ αλλάζουν δραματικά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης μέχρι την ωορρηξία. Για παράδειγμα, κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων η σύσταση της βασικής μεμβράνης γίνεται φτωχότερη σε κολλαγόνο και πλουσιότερη σε λαμινίνη[142,143]. Τα συστατικά της βασικής μεμβράνης της ΕΘΟ επηρεάζουν την ανάπτυξη του ωοθυλάκιου και είναι σημαντικά για την διατήρηση της πολικότητάς του[143–145]. Δεδομένου ότι οι πληροφορίες διαμεσολαβούμενες από την ΕΘΟ εξαρτώνται από την έκφραση των ειδικών υποδοχέων, η φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών αντικατοπτρίζεται στην έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων.

Στους υποδοχείς αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα μόρια συνάφειας και ιδιαίτερα οι ιντεγρκρινικοί υποδοχείς. Οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με πολλούς καθοριστικούς παράγοντες κυτταρικών φαινοτύπων και παίζουν ρόλους στον έλεγχο της ανάπτυξης, της δομικής ακεραιότητας και της λειτουργίας κάθε τύπου ιστού. Η δέσμευση της ιντεγκρίνης στα συστατικά στοιχεία της ΕΘΟ προωθεί αλλαγές στη μηχανική τάση του κυτταροσκελετού και συνεπώς επάγει πολλαπλές οδούς ενδοκυτταρικής

σηματοδότησης[38]. Ο κυτταροσκελετός αποτελείται από μικροϊνίδια ακτίνης, μικροσωληνίσκους και ενδιάμεσα ινίδια που σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο σύνδεσης της σηματοδότησης καθοδικά των ιντεγκρινών στη χρωματίνη[146]. Η σημασία του κυτταροσκελετού στη στεροειδογέννεση σε απάντηση στις γοναδοτροπίνες έχει προταθεί ήδη από τη δεκαετία του 90'[147]. Αναφορές από διάφορες μελέτες σε knock-out (KO) γενετικά μοντέλα στα ποντίκια αποδεικνύουν την έκφραση των ιντεγκρινικών υπομονάδων α5, α6, α2, β1, β3 αV στις ωοθήκες και το ρόλο τους στην ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων[139,148].

Η υπομονάδα α5, υποδοχέας της φιμπρονεκτίνης, εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, το σχηματισμό του ωχρού σωματίου και την αυξηση της παραγωγής της προγεστερόνης [149,150]. Σε *in vitro* καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων η προσθήκη της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (**H**uman **C**orionic **G**onadotropin/HCG) προκαλεί αύξηση στην έκφραση της α5 και αυτό υποδεικνύει ότι η ωχρινοποιητική ορμόνη LH αυξάνει την έκφραση της α5 στα κοκκιώδη κύτταρα. Η έκφραση της είναι υψηλότερη λίγο πριν την ωορρηξία,όταν το ωοκύτταρο είναι ώριμο [151].

Η υπομονάδα α6, υποδοχέας της λαμινίνης, έχει ανιχνευτεί στα κοκκώδη κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων της θήκης[152]. Η έκφραση της είναι διαφορετική σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των ωοθυλάκιων και έχει έμμεση σχέση με τα επίπεδα της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό (follicular fluid)[153]. Η εκφραση των υπομονάδων ιντεγκρίνης α5 και α6 στα GC είναι σημαντικά διαφορετικη μεταξύ των ωοθυλακίων και των ωοκυττάρων στη μεταφάση MI και MII. Η έκφραση της α5 ιντεγκρίνης είναι σημαντικά υψηλότερη στα GC, ενώ στα αντίστοιχα κύτταρα η έκφραση της α6 ειναι μειωμένη[150,151]. Διάφορες μελέτες σε γυναίκες που είχαν υποβληθεί σε ορμονική διέγερση κατέδείξαν αποκλίσεις από τα παραπάνω, δηλαδή υψηλότερη έκφρασή της α6 λίγο πριν την ωορρηξία και χαμήλοτερη της α5, διαφορές που μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς ενδοωθηκικής ρύθμισης σε γυναίκες με ή χωρίς διέγερση ωοθηκών[154].

Η υπομονάδα α6 ενώνεται με την β1 σχηματίζοντας το ετεροδιμέρες α6β1 η έκφραση του οποίου έχει ανιχνευτεί στα κοκκιώδη κύτταρα στον άνθρωπο, αλλά και σε διάφορα είδη ζωών[155]. Η δέσμευση της με τον προσδέτη λαμινίνη αυξάνει την έκκριση της προγεστερόνης P4 από τα κοκκιώδη κύτταρα και καταστέλει την έκκριση της οιστραδιόλης E2, υποδηλώνοντας με αυτό ότι η λαμινίνη ασκεί ωχρινοποιητική δράση με την διαμεσολάβηση της ιντεγκρίνης α6β1[156–159]. Οι μηχανισμοί με τους όποιους η λαμινίνη επηρεάζει την στεροειδογένεση είναι άγνωστοι ακόμα, πιθανότατα η σύνδεση της α6β1 με στοιχεία της ΕΘΟ προάγει τη ενεργοποίηση της εστιακής κινάσης και επιφέρει αλλαγές στις μηχανικές τάσεις του κυτταροσκελετού και ενεργοποιώντας πολλαπλές οδούς σηματοδότησης. Διαφαίνεται πως η α6β1 εκφράζεται στα GC, αλληλεπιδρά με την λαμινίνη και καταστέλλει την ωχρινοποίηση των

κοκκιωδών κυττάρων, ενώ συγχρόνως μπορεί να ρυθμίζει τη χρονική έναρξη του ωχρινικού κύματος της LH αποτρέποντας την πρώιμη ωχρινοποίηση των GC και δρώντας ως τοπικός ρυθμιστής της ωχρινοποίησης των GC κατά την περιωοθυλακιορρηκτική φάση[160].

Η έμμεση σχέση της με τα επίπεδα της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό υποδηλώνει ότι η καταστολή της έκφρασής της μπορεί να επηρεάσει την ωρίμανση του ωάριου. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η γονιμοποίηση των ωαρίων με ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπερματοζωαρίου (ICSI), μια τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που παρακάμπτει την φυσιολογική ένωση του ωάριου με το σπερματοζωάριο, δεν έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε περιπτώσεις ανεπαρκούς ωριμότητας του ωαρίου κατόπιν ορμονικής διέγερσης[150,161].

Η ιντεγκρίνη αν και β5 εκφράζονται στα κοκκιώδη κύτταρα του αναπτυσσόμενου πολύστιβου ωοθυλακίου[59]. Η ανβ5 υποδοχέας της βιτρονεκτίνης εμπλέκεται στην αγγειογένεση, την καρκινογένεση και στην κυτταρική ανταπόκριση στον αυξητικό παράγοντα IGF και TGF[162,163]. Η έκφραση των υπομονάδων ιντεγκρίνης αν και β5 στις ωοθήκες του ποντικού φαίνεται να αλληλεπικαλύπτεται με την έκφραση του CTGF και να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων[164–166], χωρίς να είναι γνωστό αν ο μηχανισμός δράσης στα κοκκώδη κύτταρα είναι αυτοκρινής ή παρακρινής. Σε μοντέλα γονιδιακής αποσιώπησης της FSH η β3 υπομονάδα ιντεγκρίνης υπερεκρίνεται στην ωχρινική φάση, αλλα ήταν σχέδον μη ανιχνεύσιμη στις ωοθήκες που δε είχαν ωχρινικά κύτταρα[167]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπομονάδα α2 δεν σχετίζεται με την ωρίμανση του ωάριου και την στεροειδογένεση, ενώ δεν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση της κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων[139,150].

Η α2 υπομονάδα συνδέεται με την υπομονάδα β1 σχηματίζοντας το ετεροδιμέρες α2β1 και αλληλεπιδρώντας με το κολλαγόνο IV με ένα αυτοκρινή τρόπο, ρυθμίζοντας έτσι τη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων και το σχηματισμό του ωχρού σωματίου. Έτσι η α2 μπορεί να θεωρηθεί ως ένας δείκτης διαφοροποίησης της ωχρινοποίησης των κοκκωδών κυττάρων του ποντικού[139].

1.12 Γονιμοποίηση και πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου.

Η γονιμοποίηση είναι μια σύνθετη διαδικασία αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου και περιλαμβάνει την ένωση ενός σπερματοζωαρίου με το ωοκύτταρο. Το ωάριο που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας από την ωοθήκη μαζί με τα κοκκιώδη θυλακιακά κύτταρα εισέρχεται στον ωαγωγό. Ο ωαγωγός είναι μια κυλινδρική δομή που εκτείνεται πλαγίως της πλάγιας γωνίας του πυθμένα της μήτρας και καταλήγει πλησίον της ωοθήκης. Κάθε ωαγωγός βρίσκεται στο άνω όριο του πλατέος συνδέσμου της μήτρας. Η στενή περιοχή (του ωαγωγού) πλησίον της μήτρας, ο ισθμός, συνεχίζει προς τα έξω ως μια πλατιά λύκηθος. Η τελευταία διευρύνεται για να σχηματίσει το τελικό κωδωνόσχημο όργανο του

ωαγωγού, στη βάση του οποίου βρίσκεται ένα μικρό άνοιγμα, το κοιλιακό στόμιο του ωαγωγού, μέσω του οποίου το ωάριο εισέρχεται στον ωαγωγό με τη βοήθεια της κίνησης των κροσσών. Οι περισταλτικές κινήσεις των κροσσών του σαλπιγγικού επιθηλίου βοηθούν την αλληλεπίδραση των γαμετών, ενώ τα εκκριτικά κύτταρά του παράγουν το σαλπιγγικό υγρό.

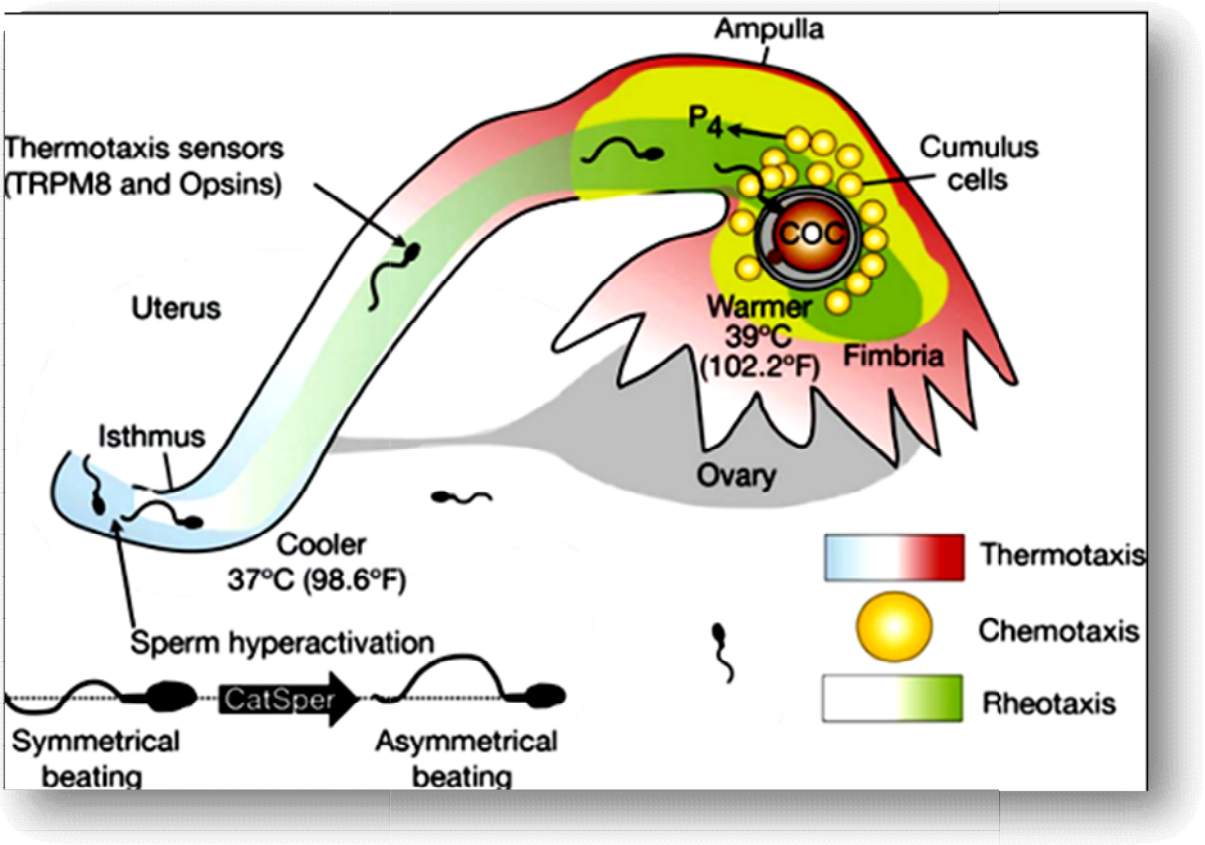
Τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου παρέχουν θρεπτική υποστήριξη στο ωάριο. Χρησιμοποιούν τη γλυκόζη για τη δική τους ενεργειακή υποστήριξη[168], ενώ παράγουν επίσης πηγές ενέργειας (πυρουβικό οξύ και κυστεΐνη) απαραίτητες για τις κυτταρικές λειτουργίες του ωαρίου[169,170]. Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου χρησιμεύουν επίσης ως γέφυρα επικοινωνίας με χασματικές συνδέσεις μεταξύ του περιβάλλοντος και του ωαρίου[171–173]. Η αρχική προσάρτηση του ωαρίου στο επιθήλιο του ωαγωγού επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των επιθηλίων COC (cumulus-oocyte complex)-ωαγωγού. Τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα του γλυκοκάλυκα στη θέση εισόδου των κροσσών στη χοάνη του ωαγωγού, ενώ κινούνται αρχικά γρήγορα με τη βοήθεια τόσο των κροσσών όσο και των συστολών της λείας μυϊκής στιβάδος του ωαγωγού. Στην συνέχεια, οι μυϊκές αυτές συστολές ελαττώνονται και το ωάριο μετακινείται μόνο με τους κροσσούς με παθητική προώθηση προς τη λήκυθο όπου λαμβάνει χώρα η γονιμοποίηση[174].

Ο χρόνος ζωής του ωαρίου μετά την ωοθυλακιορρηξία είναι 12 ώρες. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη γονιμοποίηση αποτελεί η βιολογική ωρίμανση των γαμετών. Ωάρια και σπερματοζωάρια υφίστανται μια σειρά αλλαγών, αποτέλεσμα των οποίων θα είναι η ικανότητά τους για γονιμοποίηση. Έτσι η βιολογική ωρίμανση των ωοκυττάρων ολοκληρώνεται κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, ενώ αυτή των σπερματοζωαρίων γίνεται κατά τη διέλευσή τους από την επιδιδυμίδα και το γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Τα σπερματοζωάρια που εισέρχονται στον ωαγωγό, έρχονται σε επαφή με το ισθμιακό επιθήλιο, στο οποίο δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον που παρατείνει τη βιωσιμότητα τους για μια περίοδο περίπου 24 ωρών, ώστε να υποστούν τις τελευταίες απαραίτητες τροποποιήσεις και να είναι έτοιμα για τη γονιμοποίηση τη στιγμή της ωορρηξίας[175,176].

Η απελευθέρωση του σπέρματος από το ισθμιακό επιθήλιο έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται κυρίως από τις αλλαγές που συμβαίνουν στο σπέρμα κατά τη διάρκεια απόκτησης της ικανότητας ενεργοποίησης. Αυτή περιλαμβάνει την καθολική απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος, την τροποποίηση μορίων του ακροσώματος, την αλλαγή των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας και την ικανότητα κίνησης του σπερματοζωαρίου (μετατροπή των κυματοειδών χτυπημάτων της ουράς του σπέρματος σε μαστιγοειδή προωθητική κίνηση με ισχυρές δονήσεις). Κατά τη διάρκεια της απόκτησης ικανότητας γονιμοποίησης, χοληστερόλη και άλλες στερόλες καθώς και μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες[177], απομακρύνονται από την επιφάνεια των σπερματοζωαρίων. Συνολικά οι εν λόγω

τροποποιήσεις δημιουργούν ένα πιο ρευστό μεμβρανικό περιβάλλον, καθιστώντας έτσι τα σπερματοζωάρια ικανά για τα μετέπειτα στάδια της γονιμοποίησης.

Το σπέρμα προσανατολίζεται αντιδρώντας στο περιβάλλον του ωαγωγού για να συνεχίσει κατά μήκος της πορείας της γονιμοποίησης. Ο ωαγωγός αντιδρά επίσης στην παρουσία του σπέρματος και βελτιστοποιεί το μικροπεριβάλλον εντός του ωαγωγού ρυθμίζοντας το ιξώδες του σαλπιγγικού υγρού, τον μυϊκό τόνο και προωθώντας την αναγνώριση σπερματοζωαρίου-ωαρίου, ενεργοποιώντας τα σπερματοζωάρια και καθοδηγώντας τη γονιμοποίηση. Τρείς μηχανισμοί καθοδηγούν το σπέρμα στον ωαγωγό: η ροοταξία, η θερμοταξία και η χημειοταξία (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Καθοδηγούμενη γονιμοποίηση απο τον ωαγώγο.Ο ωαγωγός ρυθμίζει τη γονιμοποίηση μέσω καθοδήγησης και ενεργοποιήσης του σπέρματος. Η καθοδήγηση του σπέρματος επιτυγχάνεται μέσω της ροοταξίας, της θερμοτοξίας και της χημειοταξίας. Η ροοταξία δημιουργείται από το σαλπιγγικό υγρό, το οποίο παράγει ένα ρεύμα με ροή από τη λήκυθο προς τον ισθμό του ωαγωγού. Το σαλπιγγικό υγρό παράγεται από εκκριτικά κύτταρα του ωαγωγού και ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα (Ε2) και άλλες ορμόνες. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του ωαγωγού είναι χαμηλότερη στην ωορρηξία και υψηλότερη κατά την έμμηνο ρύση[178].

Μεταβολές στη συγκέντρωση πρωτεϊνών μπορούν να μεταβάλουν το ιξώδες, επηρεάζοντας τον ρυθμό ροής του υγρού. Τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού εντοπίζουν την αλλαγή διαμέσου του δίαυλου/υποδοχέα TRPV4 (**T**ransient **R**eceptor **P**otential **V**anilloid 4) που ανιχνεύει τη δράση

φωσφολιπάσης στο σαλπιγγικό υγρό και ρυθμίζει τη συχνότητα της κίνησης των κροσσών (ciliary beat frequency/CBF) για την ενίσχυση της κίνηση του υγρού, όταν το ιξώδες είναι υπερβολικά αυξημένο[179]. Η υπερενεργοποιημένη κίνηση του σπέρματος ενάντια στην κίνηση του σαλπιγγικού υγρού καθώς και η ασύμμετρη κίνηση του μαστιγίου του, που έχει ευρύτερη δυναμική, προκύπτει από την ενεργοποίηση του λειτουργικού δίαυλου κατιόντος σπέρματος (cation channels of sperm/CATSPER)[180].

Η θερμοταξία διαμεσολαβείται μέσω ενός άλλου δίαυλου κατιόντων ασβεστίου του TRPM8 (**T**ransient **R**eceptor **P**otential **C**hannel)[181] και της πρωτεΐνη G με τον συζευγμένο υποδοχέα opsins β [182]. Η θερμική ευαισθησία επιτρέπει την καθοδήγηση της κατεύθυνσης του σπερματοζωαρίου αναλόγως με τη διαβάθμιση της θερμοκρασίας του ωαγωγού[183–185]. Η διαβάθμιση της θερμοκρασίας πιθανώς να επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση τροποποιώντας τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPK και MPF επηρεάζοντας την πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωαρίου και του σπερματοζωάριου[186,187].

Ο χημειοτακτισμός καθοδηγείται από παράγοντες που ελκύουν το σπέρμα, όπως η προγεστερόνη που απελευθερώνεται από τον ωοφόρο δίσκο και από χημειοκίνες (chemokines, CCL) που έχουν βρεθεί στο ωοθυλακικό υγρό[188,189]. Οι προσταγλανδίνες (PGs) ελέγχουν την συστολή της λείας μυϊκής στοιβάδας του ωαγωγού μέσω προστανοειδών υποδοχέων και ρυθμίζονται από τους υποδοχείς της E2 και της P4[190]. Η λειτουργία της συστολής της λείας μυϊκής στοιβάδας διευκολύνει τη μετανάστευση του σπέρματος στη λήκυθο όπου γίνεται η συνάντηση, αναγνώριση και τελικά η γονιμοποίηση του ωαρίου[191].

Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι τα μόρια συνάφειας και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εμπλέκονται στην αναγνώριση ωαρίου-σπερματοζωαρίου. Στο ανθρώπινο σπέρμα έχει ανιχνευθεί η πρωτεΐνη θερμικού σοκ A2 (HSPA2), η οποία δεσμεύεται στην αρυλοσουλφατάση A (ARSA) και το μόριο προσκόλλησης σπέρματος 1 (SPAM1)[192–194]. Τόσο η ARSA όσο και το SPAM1 έχουν ανιχνευτεί στον ωαγωγό του κουνελιού και ποντικού[195]. Η HSPA2 μπορεί επίσης να δεσμευτεί με το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) και την πρωτεΐνη δισουλφιδική ισομεράση A6 (PDIA6) προς σχηματισμό ενός συμπλόκου, που εμπλέκεται στην αναγνώριση σπερματοζωαρίου-διαφανούς ζώνης. Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους έχει ανιχνευθεί η έκφραση μεγάλου αριθμού ιντεγκρινών στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων[196].

Ευρήματα από μελέτες υποδεικνύουν την έκφραση της ιντεγκρίνης β1 και της φιμπρονεκτίνης κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης και τον ρόλο αυτών των πρωτεϊνών σε μηχανισμούς συγκόλλησης των σπερματοζωαρίων, όμοιων με αυτούς που παρατηρούνται κατά την αλληλεπίδραση σωματικών κυττάρων ή κυττάρων με την ΕΘΟ. Η έκφραση της ιντεγκρίνης β1 έχει ανιχνευθεί στα σπερματογόνια καθώς και στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια[197]. Η α5 σχηματίζει με την β1 το ετεροδιμέρες α5β1 που εντοπίζεται στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου μετά την ενεργοποίησή του[198].

Το ετεροδιμέρες α5β1 της ιντεγκρίνης αποτελεί βασικό υποδοχέα της φιμπρονεκτίνης (FBN) η έκφραση της οποίας αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων[198]. Πιο συγκεκριμένα η ανθρώπινη φιμπρονεκτίνη έχει ανιχνευθεί στην κεφαλή των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων και φαίνεται να αποκτάται εξωγενώς κατά το πέρασμα των σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα, ενώ απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ακροσωμικής αντίδρασης[198–200]. Η σύνδεση της FBN με την ιντεγκρίνη α5β1 ενεργοποιεί την κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK), η οποία φωσφορυλιώνεται ταχέως και προσλαμβάνει Src σε απόκριση στη δέσμευση αυτή.

Η έκφραση των υπομονάδων της ιντεγκρίνης αν και β3 έχει ανιχνευθεί στην εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη του ενεργοποιημένου σπερματοζωαρίου (IAM) ενώ το ετεροδιμερές ανβ3 που εκφράζεται κατά την ακροσωμική αντίδραση και αναγνωρίζει το τριπεπτίδιο RGD και είναι κοινός υποδοχέας της βιτρονεκτίνης. Η ιντεγκρίνη αν μπορεί να ενωθεί με διάφορες υπομονάδες ιντεγκρινών τύπου β σχηματίζοντας τα ετεροδιμερή ανβ1, ανβ5 που έχουν εξωκυττάρια ουσία πρόσδεσης τη βιτρονεκτίνη. Η βιτρονεκτίνη διαθέτει μόνο μία απλή ακολουθία σήματος RGD, υποδηλώνοντας ότι η προσκόλληση γαμετών θα μπορούσε να είναι ετεροτοπική, εμπλέκοντας άλλους υποδοχείς εκτός των ιντεγκρινών. Έχει αποδειχθεί ότι τα ανθρώπινα ωάρια συνθέτουν πρωτεογλυκάνες, οι οποίες θα μπορούσαν να παρέχουν μια δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης για τη βιτρονεκτίνη[201].

Η δέσμευση και η αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίου-ωαρίου είναι αντίδραση κυττάρου-κυττάρου που πιθανόν να εμπλέκει παραπάνω από ένα υποδοχέα-συνδέτη που μεσολαβεί στην μετάφραση των σημάτων της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου σε ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος[148]. Πράγματι από έρευνες που έγιναν στα ωάρια των ποντικών ανακαλύφθηκαν μέλη που ανήκουν στην οικογένεια ADAMs (**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloprotease) τα οποία μεσολαβούν στην αντίδραση, αναγνώριση και ένωση ωαρίου – σπερματοζωαρίου με την διαμεσολάβηση των ιντεγκρινών[202–204].

Η φερτιλίνη PH-30, διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανιχνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη του οπίσθιο-πλευρικού μέρους της κεφαλής του ώριμου σπερματοζωαρίου, είναι μέλος της οικογένειας ADAMs και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακροσωμική αντίδραση. Αποτελεί μια ετεροδιμερή πρωτεΐνη που συγκροτείται από μία α υπομονάδα και μία β υπομονάδα, το εξωκυττάριο τμήμα της οποίας (υπομονάδα β) χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας δισιντεγκρίνης (disintegrin), η οποία περιέχει το τριπεπτίδιο RGD[205].

Στην επιφάνεια του ωαρίου έχει ανιχνευθεί η έκφραση πολλών υπομονάδων ιντεγκρινών η παρουσία των οποίων μπορεί να υποδηλώνει το ρόλο τους στην γονιμοποίηση. Το 1995 ο Cambell και οι συνεργάτες του με άμεσο ανοσοφθορισμό απέδειξαν την έκφραση 2 υπομονάδων α (α3, αν) και 4 υπομονάδων β (β1, β3, β4, β5), καθώς και των υπομονάδων α2, α4, αν, β2, β7 στο ωάριο[206]. Οι υπομονάδες α5, α6, β1 έχουν

ανιχνευτεί σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, ενώ η α3 έχει ανιχνευθεί μόνο σε επίπεδο mRNA. Η έκφραση των υπομονάδων α6 και β1 παρουσίαζε διαφορετική κατανομή στην επιφάνεια ωάριων ποντικού. Η έκφραση της ιντεγκρίνης α6 ήταν εντονότερη στην περιοχή των μικρολαχνών και υποδηλώνει το πιθανον ρόλο της στην γονιμοποίηση διαμέσου της έκφρασης της PH-30, ενώ η ιντεγκρίνη β1 είχε ομοιόμορφη κατανομή σε όλη την επιφάνεια του ωαρίου[207]. Η προσκόλληση σπέρματος-ωοκυττάρου φαίνεται ότι αρχίζει κυρίως από την β1-ιντεγκρίνη. Η αναγνώριση σπέρματος-ωοκυττάρου και η είσοδος του σπέρματος αρχίζει από την β2-ιντεγκρίνη, η οποία εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα του ωάριου διαμέσου του CR3 (**C**omplement **R**eceptor 3) υποδοχέα και διευκολύνει τη σύντηξη κυτταρικών μεμβρανών, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη του σπέρματος PH-30[208].

Τα ώριμα σπερματοζωάρια που προέρχονται από εκσπερμάτιση εκφράζουν αντιγονικούς επιτόπους (epitopes) στην πλασματική τους μεμβράνη, οι οποίοι αναγνωρίζονται από αντισώματα έναντι των N-cadherins. Η παρουσία των N-cadherins στο ωάριο και στο σπερματοζωάριο και ειδικά η μεγάλη συγκέντρωση τους στην ακροσωμική περιοχή, δείχνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ακροσωμική αντίδραση και στη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα. Η ομοτυπική αντίδραση μεταξύ των N-cadherins στην επιφάνεια του ωαρίου, έχει σαν αποτέλεσμα το ξεκίνημα μιας αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία οδηγεί στην εκπόλωση των καναλιών του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, την αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τέλος τη γονιμοποίηση[209].

Η γονιμοποίηση είναι μία αντίδραση κυττάρου–κυττάρου, όπου η επιτυχής έκβαση προϋποθέτει τη συνεργασία του σπερματοζωαρίου που θα γονιμοποιήσει και του ωαρίου που θα γονιμοποιηθεί. Την στιγμή που το σπερματοζωάριο έλθει σε επαφή με το ωάριο, ξεκινά η ρήξη των κοκκίων του φλοιού στο σημείο επαφής η οποία εξαπλώνεται σταδιακά σε ολόκληρη την επιφάνεια του ωαρίου. Τα κοκκία εξωκυτταρώνουν το περιεχόμενό τους και τα ένζυμα που απελευθερώνονται τροποποιούν τους υποδοχείς της διάφανης ζώνης. Στα θηλαστικά, το σπερματοζωάριο αναγνωρίζει και δεσμεύεται στη γλυκοπρωτεΐνη 3 της διάφανης ζώνης (zona pelucida protein 3/ZP3)[210]. Μετά την αντίδραση αυτή, η προ-ακροσίνη (πρωτεΐνη του ακροσωμικού κυστιδίου) δεσμεύεται στην πρωτείνη 2 της διαφανούς ζώνης (zona pelucida protein2, ZP2) και μετατρέπεται στην ενεργή της μορφή, την ακροσίνη, πέπτοντας την διάφανη ζώνη στο συγκεκριμένο σημείο[211].

Στον ποντικό τα κοκκία του φλοιού φαίνεται να περιέχουν ένζυμα τα οποία απομακρύνουν τα τελικά σάκχαρα της ZP3 με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν τα ήδη προσδεμένα σπερματοζωάρια, αλλά και να εμποδίζουν την περαιτέρω πρόσδεση άλλων σπερματοζωαρίων στην διάφανη ζώνη, ώστε να μην δεσμεύει πλέον σπερματοζωάρια (αποφυγή πολυσπερμίας). Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν την πρωτεΐνη IZUMO1 ως τον παράγοντα σύντηξης/δέσμευσης στο σπερματοζωάριο. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά

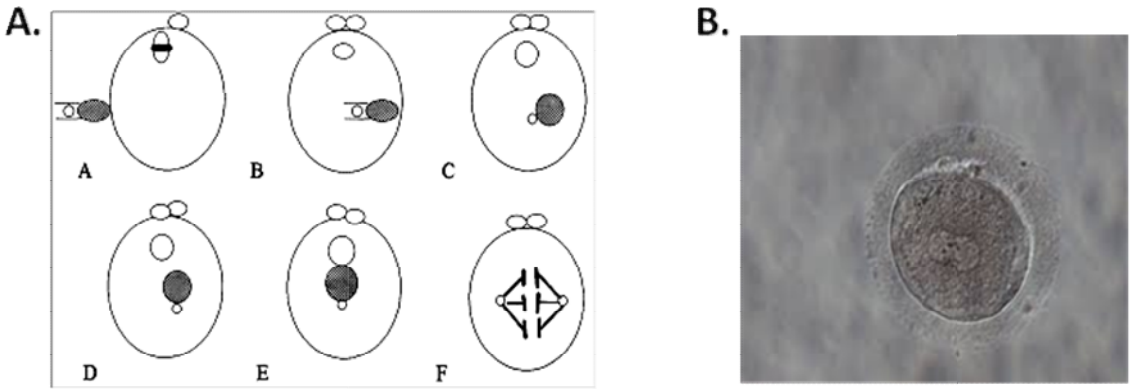
με τον υποδοχέα Juno του ωαρίου αποτρέποντας την πολυσπερμία[212]. Μορφολογικές ανωμαλίες στην equatorial περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, όπου αρχίζει η σύντηξη με το ωοκύτταρο καθώς επίσης και βιοχημικές ανωμαλίες της πλασματικής μεμβράνης και του αυχένα, μπορούν να εμποδίσουν την εκκίνηση της ακροσωμικής αντίδρασης και σχετίζονται με χαμηλή γονιμοποιητική ικανότητα του σπερματοζωαρίου. Το παραπάνω μπορεί να εξηγήσει την αδυναμία αποτυχούς έκβασης της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης IVF (*in vitro* fertilization), τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που προσομοιάζει τη φυσιολογική διαδικασία γονιμοποίησης[208] .

Η χρήση της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίου (intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI), τεχνική μικροχειρουργικής της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, έδειξε ότι η κατάσταση του ακροσώματος δεν επηρεάζει την ικανότητα αποσυμπύκνωσης της κεφαλής του σπερματοζωαρίου και τον σχηματισμό του αρσενικού προπυρήνα. Εγγενείς ανωμαλίες στη μεμβράνη του σπέρματος ή στην οργάνωσης της χρωματίνης έχουν συσχετιστεί με προβλήματα υπογονιμότητας. Τέτοιες ανωμαλίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη φυσιολογικό σχηματισμό των προπυρήνων[213].

Η σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών ωαρίου-σπερματοζωαρίου προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} και την ενεργοποίηση μιας G-πρωτεΐνης (guanine nucleotide-binding proteins) που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου. Το αποτέλεσμα της σύντηξης αυτής είναι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης και άλλων πρωτεϊνών του ωαρίου, η αύξηση της παραγωγής των λιπιδίων και της φωσφοινοσιτόλης και ουσιαστικά η πλήρης αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που οδηγούν στην ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης του γονιμοποιημένου ωαρίου και στον σχηματισμό του δεύτερου πολικού σωματίου[214].

Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου αναδιατάσσεται και ξεκινά η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (από την περιφέρεια προς το κέντρο του πυρήνα), με τη φωσφορυλίωση ιστονών του σπερματοζωαρίου και την ανταλλαγή τους με ιστόνες του ωαρίου. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, τα κυστίδια της πυρηνικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου ενώνονται με κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου του ωαρίου και δημιουργούν τη μεμβράνη του προπυρήνα του σπερματοζωαρίου. Οι δύο προπυρήνες (pronuclei, PN) μεταναστεύουν αργά ο ένας προς τον άλλο στο κέντρο του ωαρίου, ενώ παράλληλα το DNA αντιγράφεται**.** Κατά την συνάντησή τους αποσυγκροτούνται οι πυρηνικοί τους φάκελοι και τα χρωμοσώματά τους ευθυγραμμίζονται με την μιτωτική άτρακτο συμμετέχοντας στην πρώτη αυλάκωση. Τα μιτοχόνδρια του πυρήνα του σπερματοζωαρίου εκφυλίζονται και δεν συμμετέχουν στην μετέπειτα ανάπτυξη, ενώ το κεντριόλιο που αποτελεί αρχικά το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων του σπερματικού αστέρα, διαιρείται προκειμένου να σχηματιστεί το ζυγωτό, η πρώτη αυλακωτή άτρακτος[168,215].

Η πολικότητα ρυθμίζει την διαφοροποίηση και την ποιότητα του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Σε πολλά είδη, η πρώιμη πολικότητα του ωαρίου και του πρωίμου εμβρύου υπαγορεύει τη δημιουργία του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα (A/P), ραχιαίου-κοιλιακού (dorsal-ventral, D/V) και του αριστερού/δεξιού (left-right, L/ R) άξονα αντίστοιχα[216,217]. Οι άξονες διαίρεσης ορίζονται από το ωάριο σε δύο σημεία του. Η θέση του πολικού σωματίου καθορίζει τον προσθοπίσθιο άξονα (anterior–posterior A/P), ενώ το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου καθορίζει τον ραχιαίο-κοιλιακό (dorsal-ventral, D/V) άξονα. Τα σημεία αυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς σχετίζονται με τους μελλοντικούς άξονες της βλαστοκύστης. Οι άξονες διατηρούνται καθόλη τη διάρκεια και μετά τη γονιμοποίηση καθώς το κυτταρόπλασμα του ωαρίου εκτίθεται σε αρκετές ξεχωριστές και αυστηρά ρυθμιζόμενες περιστροφές, που καλύπτουν την περίοδο πριν και μετά τη γονιμοποίηση. Οι φυσικές περιστροφές του κυτταροπλάσματος του ωαρίου, αν και δεν είναι πλήρως γνωστοί οι μηχανισμοί που τις διέπουν και οι παράγοντες που τις επηρεάζουν, μπορεί να αφορούν στην ανάγκη εξομοίωσης των αξόνων μέσα στο ωοκύτταρο, επιτρέποντας στους δύο προπυρήνες να περιστραφούν και να αλληλοαντιστοιχισθούν, ώστε να συνδεθεί ο άξονας του κεντριόλιου και του πολικού σωματίου (ζωικό πόλο) του ωαρίου[218] (**Εικόνα 10**).

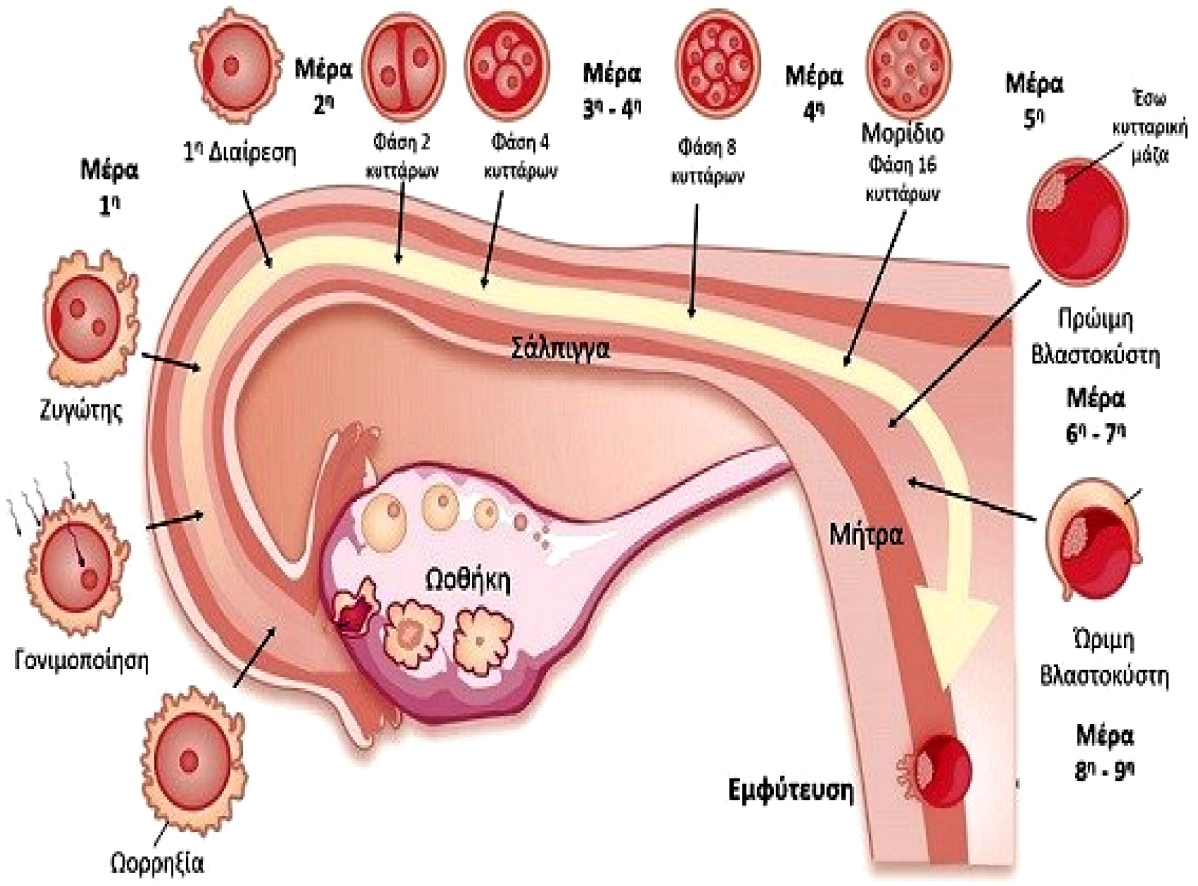


Εικόνα 10. Διάγραμμα απεικόνισης πιθανών κινήσεων των κεντροσωμάτων του θηλυκού και αρσενικού προπυρήνα μετά τη γονιμοποίηση των ανθρώπινων ωαρίων *in vitro*. A: Στάδια εισόδου σπερματοζωάριου στο ωάριο. Είναι πιθανό η θέση του κεντροσωμάτος στο μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου να καθορίζει την πολικότητα των προπυρήνων, μετακίνηση του θηλυκού προπυρήνα με τη βοήθεια μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το κεντρόσωμα του σπερματοζωαρίου. F: Διαίρεση, μετανάστευση κεντροσωμάτωνκαι δημιουργία συνθηκών για την πρώτη αυλάκωση στον μεσημβρινό. B: Γονιμοποιημένο ωάριο.

Μετά την γονιμοποίηση οι προπυρήνες σε ορισμένα ανθρώπινα ωάρια περιστρέφονται πολύ σύντομα, ενώ μεταναστεύουν διατηρώντας μια γραμμική σχέση με τον πολικό άξονα του ωαρίου. Σε άλλα ωάρια ακόμα και έαν οι προπυρήνες έχουν αποσυμπυκνωθεί, η περιστροφή καθυστερεί. Η περιστροφή είναι ένα φαινόμενο που καθοδηγείται από τους μικροσωληνίσκους[218]. Έμμεσες ενδείξεις περιστροφής του κυτταροπλάσματος και της πολικότητας στα ανθρώπινα ωάρια προέρχονται από τη χρήση της τεχνικής ICSI. Το σπερματοζωάριο συνήθως εγχέεται στη θέση 9 ή στη θέση 5 (δεξιόστροφος κανόνας ρολογιού)

με το πρώτο πολικό σωμάτιο να βρίσκεται στην 12η ώρα με τη μικροπιπέτα έγχυσης να διέρχεται από το κυτταρόπλασμα διαμετρικά αντίθετα από την μειωτική άρκτο. Αυτή η τοποθέτηση παράγει καλύτερης ποιότητας έμβρυα[219]. Το γεγονός αυτό, θα μπορούσε να οφείλεται στην πολικότητα των ωαρίων και την διευκόλυνση απελευθέρωσης ιόντων Ca^{2+}. Τα ωοκύτταρα με ελαττωματικό κυτταρόπλασμα δεν γονιμοποιούνται συνήθως μετά από ICSI[220]. Η κλινική επιτυχία της ICSI θα μπορούσε συνεπώς να εξαρτηθεί από την περιστροφή του κυτταροπλάσματος και από ένα σωστά τοποθετημένο κεντρόσωμα προερχόμενο από το σπέρμα. Αν και στην πλειοψηφία τους τα έμβρυα με δυο προπυρήνες είναι καθ' όλα φυσιολογικά, έχει βρεθεί ότι μπορεί να περιέχουν χαοτικό γονιδίωμα[221]. Επίσης, το σχήμα, το μέγεθος, ο αριθμός και η θέση των προπυρήνων αποτελούν καθοριστικά στοιχεία αξιολόγησης της ποιότητας του γονιμοποιημένου ωαρίου[222]. Μελέτες έχουν δείξει ότι γονιμοποιημένα ωάρια των οποίων οι προπυρήνες δε βρίσκονται στο κέντρο του ωοπλάσματος ή που δεν έχουν ίσο μέγεθος ή περιέχουν θραύσματα παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά χρωματοσωμικών ανωμαλιών[223]. Η ίδια ομάδα ερευνητών περιέγραψε ότι σε γονιμοποιημένα ωάρια των οποίων ο άξονας των προπυρήνων είναι παράλληλος προς τον άξονα του δεύτερου πολικού σωματίου ή στην περίπτωση που τα δυο πολικά σωμάτια βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους, παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά χρωματοσωμικών ανωμαλιών[223]. Ακόμα, το 88,5% των εμβρύων από ICSI και το 50% των εμβρύων από IVF που εμφανίζουν ανισομεγέθεις προπυρήνες, παρουσιάζουν επιπρόσθετα και χρωμοσωμικές ανωμαλίες[224].

Μετά τη γονιμοποίηση, μια αλληλουχία από κυτταρικές διαιρέσεις (πυροδοτούμενες από την αύξηση του pH και των ιόντων του ασβεστίου Ca^{2+}) έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πρώιμου εμβρύου. Η πρώτη αυλάκωση λαμβάνει χώρα 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και διαιρεί τον ζυγώτη χωρίς αύξηση του μεγέθους του. Το mRNA μητρικής προέλευσης ελαττώνεται και γίνεται η έναρξη μετάφρασης του ζυγωτικού mRNA. Η δεύτερη και η τρίτη αυλάκωση δεν είναι εντελώς συγχρονισμένες, ακολουθούν ανά διαστήματα περίπου 12 ωρών. Το mRNA ακτίνης και ιστονών του μητρικού γονιδιώματος εξαφανίζεται στο στάδιο των 4 κυττάρων και η περαιτέρω ανάπτυξη εξαρτάται από το γονιδίωμα του ζυγώτη. Ο αργός ρυθμός της πρώιμης ανάπτυξης συσχετίζεται ενδεχομένως με το χρόνο που απαιτεί η προετοιμασία της μήτρας για την εμφύτευση.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της φυσικής αναπαραγωγικής διαδικασίας από την ωορρηξία στη γονιμοποίηση. Απεικόνιση της προεμφυτευτική ανάπτυξης και την εμφύτευσης του εμβρύου στα τοιχώματα της μήτρας**.**

Το προεμφυτευτικό έμβρυο φιλοξενείται στον ωαγωγό, ένα δυναμικό όργανο που δημιουργεί ένα βέλτιστο μικροπεριβάλλον στο οποίο το έμβρυο αναπτύσσεται και αλληλεπιδρά με το περιβάλλον του (**Εικόνα 11**). Το περιβάλλον του ωαγωγού συμβάλλει στην παραγωγή ζωτικών παραγόντων που απαιτούνται για τη διαίρεση του εμβρύου. Τα έμβρυα συνήθως παραμένουν στον ωαγωγό για 2-6 ημέρες, γεγονός που μπορεί να αλλάζει σε έμβρυα διαφορετικών ειδών[225]. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου πραγματοποιείται μια μεταβολική μετάβαση στο έμβρυο μέσω της οποίας η βασική ενέργεια που χρειάζεται για τις περαιτέρω διεργασίες καλύπτεται μέσω της γλυκολυτικής οδού (glycolytic flux) και όχι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation)[226]. Αυτή η μετάβαση είναι συνοδευόμενη από διαφορετικές θρεπτικές ανάγκες του εμβρύου το οποίο χρησιμοποιεί το πυρουβικό (pyruvate) και λακτικό (lactate) οξύ που παράγονται κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης ως κύριες πηγές άνθρακα για την παραγωγή ενέργειας την οποία καταναλώνει κατά την κίνηση και ανάπτυξή του διαμέσω του ωαγωγού[227,228]. Ωστόσο, στον άνθρωπο, η μεταβολική αυτή μετάβαση δεν είναι πλήρης μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Παράλληλα πραγματοποιείται η ωρίμανση των εμβρυϊκών μιτοχονδρίων προκειμένου εν συνεχεία το έμβρυο να μπορεί να αξιοποιήσει το δικό του μεταβολισμό[229].

Ο ωαγωγός προστατεύει το έμβρυο από περιβαλλοντικό στρες, την ανοσολογική απάντηση της μητέρας και ρυθμίζει την ανάπτυξη της πρώιμης πολικότητας που καθορίζει την επακόλουθη ανάπτυξή του. Τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού παράγουν μια οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP25 και HSP70) για την αντιμετώπιση της θερμικής καταπόνησης[230]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ δρουν πολυλειτουργικά, σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών, παρέχουν σε ορισμένες πρωτεΐνες πρόσβαση στα μιτοχόνδρια, επηρεάζουν τη μετάφραση και σταθεροποιούν την ενεργοποίηση συμπλοκών της μεταγραφής[231,232]. Το υγρό του ωαγωγού περιέχει επίσης αντιοξειδωτικές ουσίες όπως καταλάση (catalase), δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutases, SOD1/2) και υπεροξειδάση γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPX4) για τη μείωση του οξειδωτικού στρες των εμβρύων λόγω της παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)[233–235]. Η προσθήκη γλουταθειόνης (GSH) στο καλλιεργητικό μέσο μειώνει τα επίπεδα ROS στα ωάρια και αυξάνει το ρυθμό εκκόλαψης των βλαστοκύστεων στα έμβρυα του ποντικού[236].

Εκτός από το στρες, ο ωαγωγός προστατεύει τα έμβρυα από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, εν μέρει μέσω της σηματοδότησης E2, παρεμποδίζοντας την υπερβολική δραστικότητα πρωτεασών και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως οι ντεφενσίνες (defensins)[237,238]. Αυτές οι αλλαγές, λόγω της έλλειψης ESR1 στο ωαγωγό, εξασθενούν την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης του εμβρύου και τελικά μπορούν να προκαλέσουν εμβρυϊκό θάνατο πριν το στάδιο των 2 κυττάρων[239]. Η έκφραση της ESR1 στον ωαγωγό καταστέλλει την ανοσολογική απάντηση με την αλλαγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με απόκριση σε φλεγμονή του ωαγωγού κατά την 1η ή 2η ημέρα εγκυμοσύνης. Αυτό υποδηλώνει ότι χωρίς ενεργοποίηση του υποδοχέα ESR1 στα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού, ο ζυγώτης αλλά και το πρώιμο έμβρυο μπορεί να μην είναι σε θέση να υπερνικήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Κατ΄ επέκταση, η διακοπή της σηματοδότησης E2 ή της δράσης ESR1 μπορεί να είναι αίτια υπογονιμότητας[240].

Διάφοροι παράγοντες έχουν ανιχνευθεί στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμισης της έκφρασης μορίων συνάφειας και της προώθησης του πολλαπλασιασμού και της αναστολής της απόπτωσης του εμβρύου[241,242]. Ανάμεσα σε αυτούς ο εμβρυοτροφικός παράγοντας-3 ETF-3[243], ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF[244], ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας IGF [245,246], ο μετασχηματισματικός αυξητικός παράγοντας TGF[247] και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών FGF[244].

Κατά την διάρκεια της προεμφυτευτικής περιόδου εκφράζονται 6 υπομονάδες ιντεγκρινών α_3 αν, β_1, β_3, β_4, β_5, όπως επίσης υπάρχουν ενδείξεις για την έκφραση άλλων 5 υπομονάδων α_2, α_4 β4 , αL, β_2, β_7[206]. Οι παραπάνω υπομονάδες εκφράζονται στο ωάριο και στο έμβρυο στο πρώιμο στάδιο (2-8 κυτταρικών

διαιρέσεων) ανάπτυξης του, αλλά και μετά από την ενεργοποίηση του γονιδιώματος (8 κυτταρικών διαιρέσεων–βλαστοκύστη). Η α_1 ιντεγκρίνη δεν εκφράζεται στο ωάριο και στο πρώιμο έμβρυο. Η α_6 ιντεγκρίνη εκφράζεται στο ωάριο και σχηματίζει ετεροδιμερές με την β_1 και β_4. Το ετεροδιμερές $\alpha_6\beta_1$ καθώς και οι υπομονάδες $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ εκφράζονται καθ 'όλη την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου[248].

Οι E-cadherins εκφράζονται με ομοιόμορφη κατανομή από το ωάριο και από το πρώιμο έμβρυο (στάδιο 2 κυττάρων) και η έκφραση τους αυξάνεται με την πάροδο των κυτταρικών διαιρέσεων (στάδιο 8-16 κυττάρων), όπου η κατανομή τους περιορίζεται στις περιοχές διακυτταρικής επαφής[206,249]. Στο έμβρυο, έως την 3η αυλάκωση (στάδιο των 8 βλαστομεριδίων), το σχήμα των βλαστομεριδίων παραμένει ευδιάκριτο και αποτελεί μια χαλαρή δομή με αρκετό χώρο μεταξύ των κυττάρων. Η εγκαθίδρυση της πολικότητας των βλαστομεριδίων γίνεται ακτινωτά οδηγώντας στο σχηματισμό μιας εξωτερικής επιθηλιακής στοιβάδας η όποια περιστοιχίζει εσωτερικά μη επιθηλιακά κύτταρα με διαφορετική αναπτυξιακή δυναμική. Η ακτινική πολικότητα πιθανώς να κατευθύνει την κυτταροσκελετική ασυμμετρία η οποία είναι σημαντική για τον καθορισμό της κατεύθυνσης κυτταρικών κινήσεων (προς τα έξω/μέσα-outward/inward) κατά τη γαστριδίωση[250]. Διαταραχές στην έκφραση των μορίων συνάφειας μπορεί να προκαλέσει ασυμμετρία του L/R άξονα, ο οποίος δημιουργείται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ανάπτυξης του εμβρύου[251].

Η N-cadherin ή άλλα μέλη της υπεροικογένειας TGF-β μπορεί να ασκήσουν μηχανικές πιέσεις που μπορούν να επηρεάσουν την φυσιολογική πολικότητα και την κίνηση του αναπτυσσόμενου εμβρύου [252,253]. Έτσι ωθούν τα κύτταρα των βλαστομεριδίων να αναδιοργανωθούν κυτταροσκελετικά και να μεγιστοποιήσουν τις διακυτταρικές τους επαφές. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σύμπτηξη (compaction) και οφείλεται σε αλλαγές στη σύνδεση της E- καδερίνης και του υποκείμενου κυτταρικού φλοιού. Η ενεργοποίηση της E- καδερίνης περιλαμβάνει τη μεταγωγή ενός σήματος και τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein kinase **C**, PKC). Τεχνητή ενεργοποίηση της κινάσης C πριν το στάδιο των 8 κυττάρων οδηγεί σε πρόωρη σύμπτηξη, αποδεικνύοντας το ρόλο της στην εν λόγω διεργασία [254–257]. Η E-καδερίνη προκαλεί πόλωση της κυτταρικής επιφάνειας επιφέροντας ανακατανομές σε ένζυμα της μεμβράνης, όπως στις ATPάσες Na^+/K^+ ή σε στοιχεία του σκελετού της μεμβράνης, όπως η φοντρίνη (fodrin)[256,258,259].

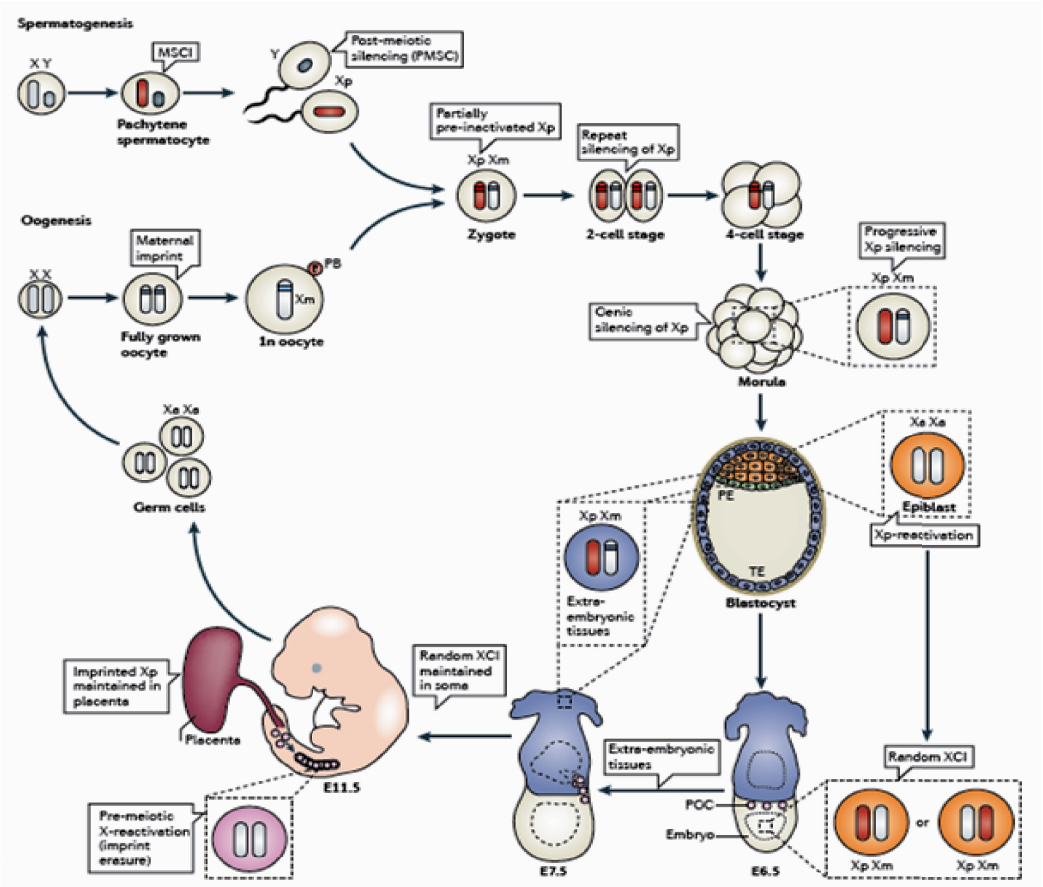
Μετά τη σύμπτηξη οι αυλακώσεις γίνονται είτε ακτινωτά, είτε παράλληλα προς την επιφάνεια, παράγοντας κύτταρα με εγκαθιδρυμένη πολικότητα (τροφοβλάστη) και κύτταρα χωρίς πολικότητα (εμβρυοβλάστη).

Η συγκεκριμένη αλλαγή είναι μορφολογικά ορατή λόγω της παρουσίας των μικρολαχνών στις εξωτερικές επιφάνειες των κυττάρων, ωστόσο παρατηρούνται και άλλες αλλαγές στο εσωτερικό των

κυττάρων. Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα και ο σχηματισμός των χασμοσυνδέσμων, οι οποίοι επιτρέπουν την διάχυση ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους σε ολόκληρο το έμβρυο. Από τη σύμπτυξη μέχρι το στάδιο των 32 κυττάρων περίπου, το έμβρυο αποκαλείται μορίδιο (morula). Κατά την περίοδο αυτή σχηματίζονται δεσμοσώματα και στενοσύνδεσμοι που δημιουργούν έναν αδιαπέραστο φραγμό ανάμεσα στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του εμβρύου. Στο εσωτερικό του εμβρύου αρχίζει να σχηματίζεται το βλαστόκοιλο (blastocoel), μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό. Μετά τον σχηματισμό του βλαστόκοιλου το έμβρυο ονομάζεται πλέον βλαστοκύστη (blastocyst). Η βλαστοκύστη αποτελείται από το τροφοεξώδερμα, μια εξωτερική στιβάδα κυττάρων με επιθηλιακή μορφολογία η οποία περιβάλει ένα συσσωμάτωμα κυττάρων που εντοπίζεται στο εσωτερικό του εμβρύου και συνιστά την εσωτερική μάζα κυττάρων (**I**nner **C**ell **M**ass, ICM). Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος θα δημιουργήσουν στη συνέχεια τον πλακούντα, ενώ τα κύτταρα της ICM θα δημιουργήσουν το κυρίως έμβρυο.

Η μεταφορά από τον ωαγωγό προς τη μήτρα και η ανάπτυξη του εμβρύου συμβαίνουν ταυτόχρονα. Η μεταφορά συνίσταται από την σύσπαση των μυών του ωαγωγού και την κινητικότητα των κροσσών των επιθηλιακών κυττάρων. Το οιστρογόνο (E2) γενικά αυξάνει τη μυϊκή σύσπαση, την έκκριση σαλπιγγικού υγρού και την συχνότητα κίνησης των κροσσών (CBF) επιταχύνοντας το ρυθμό μεταφοράς του εμβρύου[260]. Αντίθετα, η προγεστερόνη (P4) προκαλεί μυϊκή χαλάρωση και μειώνει τη CBF για να μειώσει τελικά την ταχύτητα μεταφοράς του έμβρυου. Επιπλέον, η προγεστερόνη αναστέλλει την έκκριση του σαλπιγγικού υγρού που προκαλείται από την παραγωγή της E2[261–263]. Οι προσταγλανδίνες (prostaglandins, PGs), όπως οι PGE2, PGF2α και ο υποδοχέα προγεστερόνης PGR, μπορούν να παραχθούν από τα επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού δρώντας μυοσυσταλτικά τόσο στους ανθρώπους όσο και στα βοοειδή[264]. Η μη αποτελεσματική μεταφορά του εμβρύου μπορεί να προκαλέσει στειρότητα ή ακόμη και έκτοπη κύηση.

Όπως προαναφέρθηκε, στο έμβρυο συμβαίνουν επιγενετικές αλλαγές (**Εικόνα 4**) που έχουν σαν αποτέλεσμα την αποτύπωση, η οποία έχει μακροχρόνια επίδραση στην ανάπτυξη του. Η κυτταρική μοίρα προσδιορίζεται στο έμβρυο μετά το στάδιο του μοριδίου. Τα πρώιμα έμβρυα καταστέλλουν τη δράση μεθυλασών του DNA (DNA methyltransferases) που ευθύνονται για την εμφάνιση επιγενετικών αλλαγών έως και το στάδιο της βλαστοκύστης του ποντικού[265]. Στον άνθρωπο η απομεθυλίωση του DNA εμφανίζεται πολύ νωρίτερα σε σύγκριση με άλλα θηλαστικά, από τη γονιμοποίηση μέχρι και το στάδιο των 2 κυττάρων[266,267]. Καθώς τα έμβρυα αναπτύσσονται στο στάδιο της βλαστοκύστης, η καταστολή αυτή σταδιακά αντιστρέφεται στα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, και η μεθυλίωση αυξάνεται[266,268,269] (**Εικόνα 12**).



Εικονά 12. Η απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος στα θηλυκά έμβρυα των θηλαστικών αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της επίδρασης επιγενετικών μηχανισμών μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης της χρωματίνης. Η τελική απενεργοποίηση χαρακτηρίζεται από τυχαιότητα, ενώ είναι γνωστό ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τελεστών του κωδικού και μη κωδικού γονιδιώματος (lncRNAs) συμμετέχουν στην εγκαθίδρυση της γονιδιακής αποσιώπησης ενός εκ των δύο Χ φυλετικών χρωμοσωμάτων[270].

Κατά τη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) η περαιτέρω ανάπτυξη των προεμφυτευτικών εμβρύων γίνεται απουσία του φυσικού περιβάλλοντος του ωαγωγού. Έτσι, καθίσταται αναγκαία η χρήση καλλιεργητικών υλικών που μιμούνται τη σύσταση του υγρού του ωαγωγού σε θρεπτικές ουσίες, τα οποία όμως αδυνατούν να αποκαταστήσουν τη δυναμική των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον του ωαγωγού. Συν-καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρύων με επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού βρέθηκε να βελτιώνει την ποιότητα των εμβρύων, όχι όμως και τα ποσοστά εμφύτευσης[271–273]. Η αλληλεπίδραση ωαγωγού-έμβρυου είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και την ποιότητα του αναπτυσσόμενου εμβρύου[274]. Όμως το περιβάλλον του ωαγωγού, και οι αλληλεπιδράσεις του εμβρύου με το περιβάλλον είναι δύσκολο να αναπαραχθούν *in vitro* και αυτό αποτελεί τη βασική διαφορά ανάμεσα στην IVF και τη φυσική γονιμοποίηση.

Η διέγερση των ωοθηκών θα μπορούσε επίσης να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη των εμβρύων[275]. Δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των χρωμοσωμάτων την πέμπτη ημέρα

καλλιέργειας εμβρύων σε πειραματόζωα, κατέδειξαν την εμφάνιση ακαθόριστης πολυπλοειδίας (mixoploid) στο 31% των εμβρύων που προέκυψαν από τη γονιμοποίηση ωαρίων που ωρίμασαν με την χρήση πρωτόκολλου διέγερσης ωοθηκών[276]. Μελέτες σε ποντίκια στα οποία χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών έδειξαν μειωμένη ανάπτυξη, χαμηλότερο ποσοστό εμφύτευσης, και αυξημένο ποσοστό τερματισμού της κύησης μετά την εμφύτευση του εμβρύου[277]. Η υψηλή συχνότητα απώλειας της εγκυμοσύνης και οι μη φυσιολογικοί φαινότυποι έχουν συσχετιστεί με παρεκκλίσεις στην εγκαθίδρυση του προτύπου μεθυλίωσης του DNA σε πρώιμα εμβρυϊκά στάδια[278].

1.13 Εμφύτευση

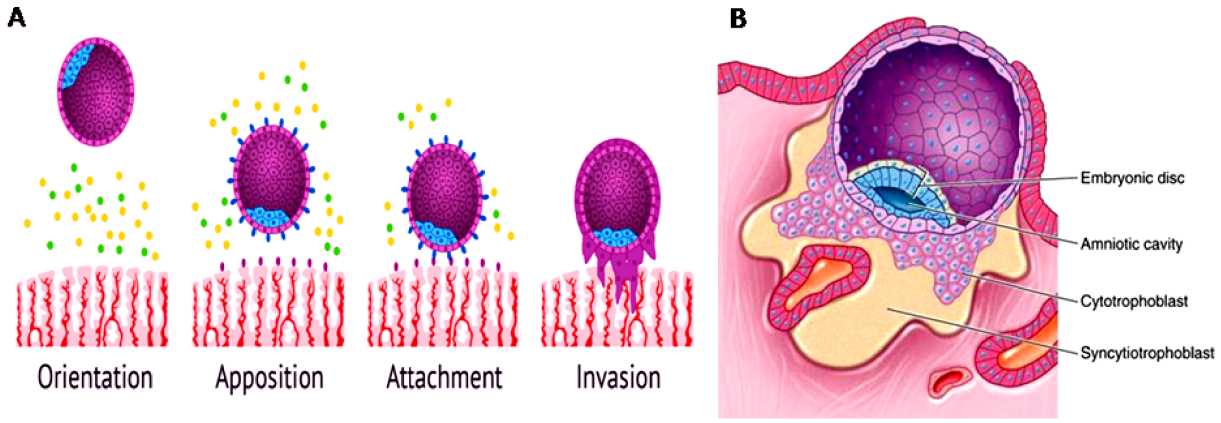
Στη συνέχεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα κύτταρα της ICM και του τροφοεξωδέρματος διαφοροποιούνται. Στην ICM παρατηρείται απολέπιση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό, στην επιφάνεια του βλαστόκοιλου, της στιβάδας του πρωτογενούς ενδοδέρματος (primitive endoderm). Η στιβάδα αυτή συμβάλει στους εξωεμβρυϊκούς ιστούς, αλλά όχι στο οριστικό σχηματισμό του ενδοδέρματος (definitive endoderm) του ίδιου του εμβρύου. Το ενδόδερμα είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και την έκκριση των λαμινινών α1β1γ1 και α5β1γ1 που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση της βασικής μεμβράνης BM (basal membrane) μεταξύ του ενδοδέρματος και του επίβλαστου (epiblast)[279]. Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος που εφάπτονται στην ICM σχηματίζουν το πολικό τροφοεξώδερμα. Από τα υπόλοιπα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος αναπτύσσεται το τοιχωματικό τροφοεξώδερμα. Ενώ το πολικό τροφοεξώδερμα συνεχίζει να αναπτύσσεται, στα κύτταρα του τοιχωματικού τροφοεξωδέρματος συνεχίζεται η αντιγραφή του DNA απουσία μίτωσης, με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό τους σε πολυπλοειδή κύτταρα. Σε αυτό περίπου το στάδιο το έμβρυο εκκολάπτεται από τη διαφανή ζώνη και εμφυτεύεται στη μήτρα.

Η εμφύτευση είναι μια αλληλουχία από απόλυτα συγχρονισμένα γεγονότα τα οποία συμπεριλαμβάνουν τη προσκόλληση και διείσδυση του εμβρύου στο ενδομήτριο (Adherence-Aposition-Invasion) **(Εικόνα 13**). Το έμβρυο όμως, εμφυτεύεται μόνο σε ένα ακριβές χρονικό διάστημα γνωστό σαν παράθυρο εμφύτευσης. Η παρουσία ή απουσία του παραθύρου εμφύτευσης εξαρτάται από τη συγχρονισμένη έκφραση ειδικών ουσιών στο ενδομήτριο, κυρίως των ιντεγκρινών[280].

Η εμφύτευση διαμεσολαβείται από ένα εξειδικευμένο πληθυσμό κυττάρων, τα κύτταρα της τροφοβλάστης, τα οποία προκύπτουν από το τροφοεξώδερμα. Η εμβρυϊκή τροφοβλάστη προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας μέσω υποδοχέων της οικογένειας ιντεγκρίνων[281,282].

Τόσο η βλαστοκύστη, όσο και το επιθήλιο της μήτρας εκφράζουν ιντεγκρίνες στην εξωκυττάρια πλευρά τους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των μορίων έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση του εμβρύου

στο ενδομήτριο κατά την εμφύτευση. Η αντίδραση μεταξύ εμβρύου και ενδομητρίου είναι όμοια με την αντίδραση λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου (leukocyte-endothelium). Όταν το έμβρυο προσκολάται στο ενδομήτριο πραγματοποιείται μη διεισδυτική εμφύτευση (non- invasive implantation), ενώ όταν διεισδύει στο στρώμα του ενδομητρίου, πραγματοποιείται διεισδυτική εμφύτευση (invasive implantation)[283]. Οι ιντεγκρίνες ρυθμίζουν χρονικά τον αναπαραγωγικό κύκλο και την πρώιμη εγκυμοσύνη[284].



Εικόνα 13. Α:Στάδια εμφύτευσης εμβρύου. Β:Σχηματική απεικόνιση της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης.

1.14 Μη διεισδυτική εμφύτευση

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο έχουν ανιχνευθεί στο επιφανειακό επιθήλιο οι υπομονάδες α_2, α_3, α_6, α_9, α_v, β_1, β_3, β_4, β_5, β_6. Εκτός από τις υπομονάδες β_3, β_6 όλες οι άλλες υπομονάδες εκφράζονται και στο αδενικό επιθήλιο[284–286]. Οι υπομονάδες α_5, α_8 δεν έχουν ανιχνευθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο[284,286].

Τα πιο γνωστά ετεροδιμερή τα οποία εκφράζονται στο επιφανειακό επιθήλιο είναι τα $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$. Τα ετεροδιμερή $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, τα οποία είναι κοινοί υποδοχείς για τη φιμπρονεκτίνη και βιτρονεκτίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στο αρχικό στάδιο της εμφύτευσης. Η ιντεγκρίνη $\alpha_9\beta_1$ μπορεί να προσδεθεί με την φιμπρονεκτίνη τύπου III και η μέγιστη έκφραση της εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως στο επιφανειακό επιθήλιο. Στο αδενικό επιθήλιο, εκφράζεται στη μέση και καθυστερημένη εκκριτική φάση. Η παρουσία αυτής της ιντεγκρίνης στο επιφανειακό επιθήλιο, υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο που παίζει στο αρχικό στάδιο της εμφύτευσης. Η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_1$ εκφράζεται στο επιφανειακό επιθήλιο, αναγνωρίζει το τριπεπτίδιο RGD και έχει ουσίες πρόσδεσης την φιμπρονεκτίνη και βιτρονεκτίνη[286].

Η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ είναι η πιο ευέλικτη υπομονάδα ιντεγκρίνης (versatile integrin) και είναι ικανή να προσδεθεί με πολλές εξωκυττάριες ουσίες πρόσδεσης συμπεριλαμβανομένων και τις φιμπρονεκτίνης,

βιτρονεκτίνης, οστεοποντίνης, στον άνθρωπο, εκφράζεται από την βλαστοκύστη, την τροφοβλάστη αλλά και από το ενδομήτριο. Στην μήτρα, η ιντεγκρίνη αυτή, εκφράζεται μεταξύ $19^{ης}$ και $24^{ης}$ ημέρας του έμμηνου κύκλου, όπου έχουμε και την μέγιστη έκφραση της. Το διάστημα αυτό συμπίπτει με την αύξηση της προγεστερόνης, γεγονός το οποίο είναι πολύ σημαντικό για τη δεκτικότητα του ενδομητρίου (παράθυρο εμφύτευσης). Στις γυναίκες με ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης, το ετεροδιμερές αυτό δεν εκφράζεται στο επιθήλιο της μήτρας[284]. Οι πληροφορίες που υπάρχουν για την έκφραση των ιντεγκρινών από την ανθρώπινη τροφοβλάστη τη στιγμή της εμφύτευσης είναι ανεπαρκείς. Οι περισσότερες προέρχονται από πειράματα σε ποντίκια, όπου και έχει βρεθεί ότι το τροφοεκτόδερμα διεγείρει την έκφραση των ετεροδιμερών $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$. Αυτοί οι υποδοχές μπορούν να προσδεθούν με την λαμινίνη και το κολλαγόνο και πιθανόν υποστηρίζουν τη διείσδυση του εμβρύου στο ενδομήτριο και διευκολύνουν τη μεταβίβαση του στο στρώμα.

Τα ετεροδιμερή $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ έχουν βρεθεί στον ανθρώπινο επιφανειακό ενδομητρικό επιθήλιο τη στιγμή της εμφύτευσης. Είναι κλασικοί υποδοχείς της φιμπρονεκτίνης και της βιτρονεκτίνης[287], αποτελούν τις ουσίες πρόσδεσης τους στο σημείο επαφής μεταξύ του επιφανειακού επιθηλίου και του τροφοεκτοδέρματος κατά την εμφύτευση[288]. Οι ιντεγκρινικές υπομονάδες εκφράζονται διαφορετικά κατά τη διάρκεια του παράθυρου εμφύτευσης όχι μόνο στην εμβρυϊκή επιφάνεια, αλλά και στο ενδομήτριο. Η κατανομή των ιντεγκρινών στο ενδομήτριο και στην εμβρυϊκή επιφάνεια μεταβάλλεται κυκλικά κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου[289–291]. Η κύρια εξήγηση για αυτές τις διαφορές είναι η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στον ορό. Κατά τη διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών, οι στεροειδείς ορμόνες παράγονται σε υπερφυσιολογικά επίπεδα, και έχουν αντίκτυπο σε ορισμένες παράμετρους της ποιότητας του εμβρύου και της έκφραση των γονιδίων[292,293]. Η έκφραση των μορίων της ιντεγκρίνης ελέγχεται από τις ωοθηκικές ορμόνες στον ποντικό[294], ενώ στον άνθρωπο έχει αποδειχθεί από πειραματικές μελέτες ό,τι η διέγερση των ωοθηκών προκαλεί μείωση της έκφρασης των ενδομητρικών ιντεγκρινών[295,296].

Η έκφραση της ανβ3 ιντεγκρίνης βρέθηκε μειωμένη στο ενδομήτριο των γυναικών που υποβλήθηκαν σε διέγερση ωοθηκών[297], ενώ η έκφραση της ανβ3 στην εξωτερική επιφάνεια της διογκωμένης βλαστοκύστης έχει κρίσιμη σημασία για την έναρξη της προσκόλλησης του εμβρύου στο ενδομήτριο[298].

Οι εκφράσεις της β3 ιντεγκρίνης του ενδομητρίου και του ανασταλτικού παράγοντα LIF (**L**eukemia **I**nhibitory **F**actor) στην προ εμφυτευτική φάση ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε γυναίκες που συμμετείχαν σε κύκλους διέγερσης των ωοθηκών τους σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσικούς κύκλους [299]. Η αντίστοιχη διέγερση ωοθηκών ποντικών (με διαφορετικά βέβαια πρωτόκολλα) οδηγεί σε

σημαντική μείωση, όχι μόνο της έκφραση των υπομονάδων ιντεγκρίνης β3,β1,α4, avb στο ενδομήτριο, αλλά και του χρόνου επιτυχούς εμφύτευσής τους[294,295,300].

1.15 Πλακουντοποίηση

Ο πλακούντας είναι ένα προσωρινό και δυναμικό όργανο που σχηματίζεται κατά την εγκυμοσύνη με τη συμβολή τόσο του εμβρύου, όσο και της μητέρας, καθώς η αλληλεπίδραση μεταξύ έμβρυου-μητέρας είναι συνεχής. Ο πλακούντας αποτελεί θέση ανταλλαγής θρεπτικών, προστατευτικών παραγόντων, άχρηστων ουσιών, καθώς και αερίων (O_2, CO_2) μεταξύ της μητέρας και του κυήματος και περιέχει ιστούς και των δύο. Το εμβρυϊκό τμήμα είναι το χόριο, προερχόμενο από την τροφοβλάστη. Η ανταλλαγή γίνεται μεταξύ του εμβρυϊκού αίματος στις χοριακές λάχνες και του μητρικού αίματος στους αιμόκολπους του βασικού φθαρτού. Ο πλακούντας είναι επίσης ένας προσωρινός ενδοκρινής αδένας που παράγει στεροειδείς και πρωτεϊνικές ορμόνες χρησιμοποιώντας πρόδρομες ουσίες που φτάνουν σε αυτόν από την μητέρα, αλλά και το έμβρυο. Τέτοιες ορμόνες περιλαμβάνουν το γαλακτογόνο (human **P**lacental **L**actogen/hPL), η ρελαξίνη (relaxin) και ποικίλους αυξητικούς παράγοντες [301]. Η εμφύτευση, η διείσδυση της τροφοβλάστης, η διάβρωση της ενδοθηλιακής επένδυσης των τριχοειδών της μήτρας από τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα, καθώς και η έναρξη μητροπλακουντικής κυκλοφορίας του εμβρύου ενεργοποιούν κολλαγενάσες που διασπούν την ΕΘΟ και επηρεάζουν τη μητρική ανοχή στο έμβρυο, αλλά και τη σύνθεση νέων ορμονών[302]. Στη διαδικάσια αυτή απαιτούνται μια σειρά ολοκληρωμένων συμβάντων συνάφειας και σηματοδότησης για τη ρυθμίση της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων συνάφειας της κυτταρικής επιφάνειας και των πρωτεϊνών της ΕΘΟ[303].

Οι ιντεγκρίνες που εκφράζονται από τον πλακούντα παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του πλακούντα, δημιουργώντας ένα καινούργιο αγγειακό σύστημα. Βοηθούν έτσι στη μετατόπιση των κυττάρων της τροφοβλάστης και πιθανώς ενεργοποιούν μεταφραστικά σήματα που θα έχουν σαν αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξης και της ζωτικότητας του εμβρύου[304]. Κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου πλακούντα τα κύτταρα της τροφοβλάστης διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας την συγκυτιοτροφοβλάστη.

Η ιντεγκρίνη α6β4 εκφράζετα στις λάχνες μεταξύ της διεπιφάνειας της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης[305]. Αυτή η ιντεγκρίνη προσδένεται με ημιδεσμοσώματα και αποτελεί ένα δείκτη για τη φυσιολογική λειτουργία του επιθηλίου. Αυτά τα κύτταρα επίσης εκφράζουν τις ιντεγκρίνες $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_v\beta_6$, οι οποίες πιθανών εμποδίζουν την μετανάστευση των κυττάρων καθώς η κυτταροτροφοβλάστη σχηματίζει κυτταρικές φάλαγγες οι οποίες θα μετατραπούν σε λάχνες[306]. Η έκφραση της $\alpha_v\beta_3$ από την τροφοβλάστη συνδέεται με την έκφραση οστεοποντίνης από το εκκριτικό επιθήλιο του ενδομητρίου υποδηλώνοντας το σημαντικό της ρόλο στην αγγειογένεση, στην αναγνώριση του RGD τριπεπτιδίου

κατά την εμβρυογένεση. Η ιντεγκρίνη $\alpha_5\beta_1$ με τη σειρά της εκφράζεται από την κυτταροτροφοβλάστη και πιθανώς ελέγχει το ποσοστό μετανάστευσης και διείσδυσης του εμβρύου στο μητρικό τοίχωμα. Τέλος, καθώς τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης φθάνουν στο ενδιάμεσο του επιθηλίου της μήτρας ξεκινά η έκφραση της ιντεγκρίνη $\alpha_1\beta_1$ που αποτελεί υποδοχέα της λαμινίνης και του κολλαγόνου[306,307].

1.16 Ο ρόλος της L-καρνιτίνης (L-carnitine, L-Cn) στην ωρίμανση των γαμετών

Η ονομασία της καρνιτίνης προέρχεται από την λατινική λέξη carnus που σημαίνει σάρκα και δηλώνει την κύρια πηγή της που είναι το κρέας. Παράγεται κυρίως στο ήπαρ και στα νεφρά από τα απαραίτητα αμινοξέα μεθειονίνη και λυσίνη. Η βιοσύνθεση της καρνιτίνης απαιτεί επίσης τη βιταμίνη C, σίδηρο, βιταμίνη B6 και τη νιασίνη. Αποθηκεύεται στον μυϊκό ιστό, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο σπέρμα. Ο ρόλος της είναι η μεταφορά λιπαρών οξέων μακράς αλύσσου μέσα στα μιτοχόνδρια όπου οξειδώνονται για την παραγωγή ενέργειας. Η ενέργεια αυτή στη συνέχεια χρησιμοποιείται από κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων ή αποθηκεύεται. Η L-καρνιτίνη συμμετέχει στη διατήρηση των επιπέδων του ακετυλο-συνενζύμου A (acetyl-CoA) στα μιτοχόνδρια ενισχύοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε συνεργασία με το αντιοξειδωτικό συνένζυμο Q10, ενώ συμμετέχει επίσης στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερα του ασβεστίου. Η L-καρνιτίνη αποτελεί έναν μεταβολικό ρεοστάτη για την ωρίμανση των γαμετών και την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η **L-καρνιτίνη** διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και ωρίμανση του σπέρματος, καθώς και στις μεταβολικές διαδικασίες που ακολουθούν την εκσπερμάτιση. Το σπέρμα μετά την εκσπερμάτιση, αποκτά αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις τις οποίες καλύπτει μέσω αυξημένου μεταβολισμού λιπαρών οξέων και σακχάρων. Η ενέργεια που παράγεται με τη μορφή ATP μεταφράζεται σε αυξημένη κινητικότητα του σπέρματος έως ότου τα σπερματοζωάρια να καλύψουν την απόσταση μέχρι το ωάριο και να λάβει χώρα η γονιμοποίηση[308]. Η άτρακτος των ωαρίων είναι μια δυναμική δομή που αποτελείται από δέσμες μικροσωληνίσκων που είναι πολυμερισμένα ετεροδιμερή πολυμερή της α- και β-τουμπουλίνης. Η L-καρνιτίνη ασκεί προστατευτική δράση στον κυτταροσκελετό των ωαρίων προστατεύοντας τα από τις τοξικές επιδράσεις (κυτοκίνες, οξειδωτικό στρες) γεγονός που συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας ωαρίων και του ποσοστού γονιμοποίησης σε *in vitro* συνθήκες[309].

Η γονιμοποίηση και η ανάπτυξη του εμβρύου *in vivo* λαμβάνει χώρα σε ένα περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο[310]. Σε *in vitro* συνθήκες η χρήση επωαστικών κλιβάνων ελεγχόμενης θερμοκρασίας με χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, βελτιώνει το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό ανάπτυξης εμβρύων σε βλαστοκύστες[311]. Η προσθήκη

αντιοξειδωτικών παραγόντων στο καλλιεργητικό μέσο κατά την *in vitro* ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, μπορεί να βελτιστοποιήσει το ποσοστό των εμβρύων που συνεχίζουν να αναπτύσσονται σε βλαστοκύστες, βελτιώνοντας έτσι το ποσοστό εμφύτευσης και κλινικών εγκυμοσυνών.

Τα ανθρώπινα έμβρυα που προέρχονται από εξωσωματική γονιμοποίηση παρουσιάζουν διάφορους βαθμούς κυτταροπλασματικών κατακερματισμών, ενδεικτικών της ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών του εμβρύου[312]. Η προσθήκη L-Cn στο καλλιεργητικό μέσο μπορεί να μειώσει την έκταση της βλάβης του DNA λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους επίδρασής της. Ο TNF-α (**T**umor **N**ecrosis **F**actor) έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κατανάλωση γλυκόζης στις βλαστοκύστες ποντικών αυτό οδηγεί στην καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου και στη μείωση της βιωσιμότητάς του ακόμα και στον εμβρυϊκό θάνατο.

1.17 Απόπτωση στο έμβρυο

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από ειδικά μορφολογικά και βιοχημικά κριτήρια[313]. Οι μορφολογικές και δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στην πλασματική μεμβράνη, έχουν σαν αποτέλεσμα την συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου, την κυτταρική θραύση και το σχηματισμό του αποπτωτικού σωματίου που απομακρύνεται με γρήγορη φαγοκυττάρωση από γειτονικά κύτταρα. Οι βιοχημικές μεταβολές συμβαίνουν στην κυτταρική επιφάνεια και στη δομή του DNA. Στην κυτταρική επιφάνεια προκαλούν την ανακατανομή των φωσφολιπιδίων στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης[314].

Ένα άλλο πρώιμο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η ασύμμετρία στην κατανομή της φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS). Η έκθεση στην φωσφατιδυλσερίνη μπορεί να δρα σαν αποπτωτικό σήμα το οποίο να προωθεί την φαγοκυττάρωση από διπλανά υγιή κύτταρα[315]. Βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν στην δομή του DNA έχουν σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση της χρωματίνης. Η διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για το διαχωρισμό των ζωντανών κυττάρων από τα νεκρά[315]. Η ανεξίνη V ανήκει στις πρωτεΐνες με μεγάλη τάση σύνδεσης με ασβέστιο και φωσφολιοπίδια και έτσι χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων.

Μελετώντας ανθρώπινα έμβρυα και ωάρια οι Levy και Davis το 1998 ανάφεραν για πρώτη φορά τον χρωματισμό των εμβρύων που έχουν κατακερματισμό μέσω χρώσης ανεξίνης, ενδεικτικής των αποπτωτικών διεργασιών των εμβρύων[316].

Η έναρξη της απόπτωσης, πριν από την εμφύτευση, μπλοκάρει τη διαφοροποίηση του εμβρύου και μειώνει τα ποσοστά κλινικών εγκυμοσυνών[314]. Οι πρώτες μελέτες που περιέγραψαν τις μορφολογικές

αλλαγές στην δομή των εμβρύων των ποντικών κατά την απόπτωση στα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους έγιναν στα μέσα του 1970 από τον Hinchliffe E.S, ενώ στα ανθρώπινα έμβρυα οι πρώτες μελέτες απόπτωσης έγιναν πολύ αργότερα[317–319]. Μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση ένα μεγάλο ποσοστό των εμβρύων (περίπου 5-10%) σταματάει να αναπτύσσεται την πρώτη εβδομάδα σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας για λόγους που δεν είναι ακόμα γνωστοί και πλήρως κατανοητοί[320].

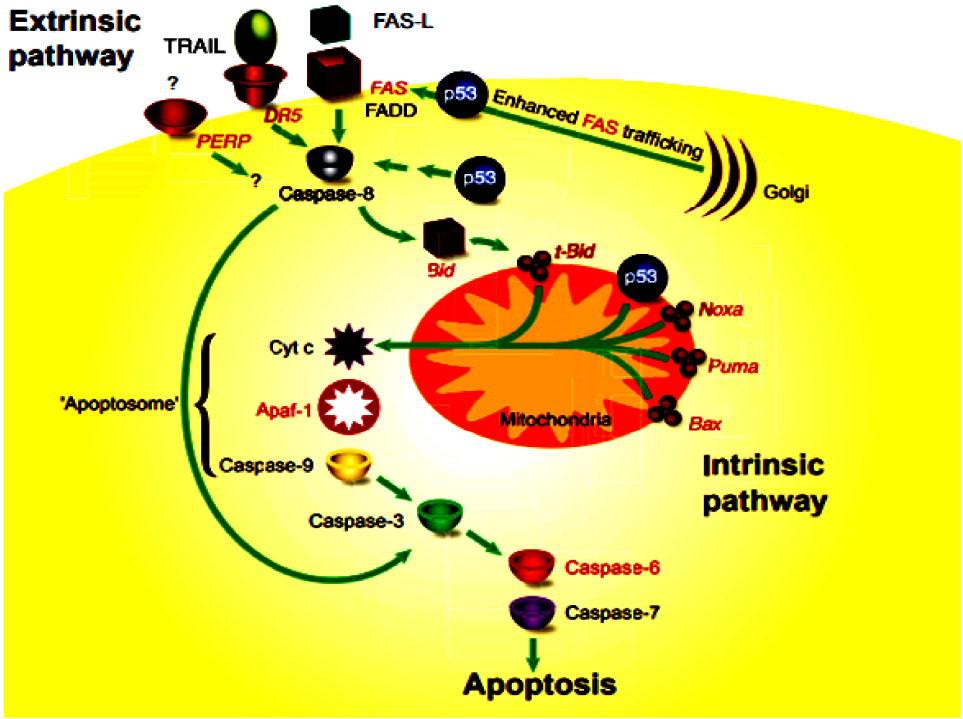
Η απόπτωση αυτών των εμβρύων χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φυσαλίδων στη νουκλεϊκή μεμβράνη, συρρίκνωση της χρωματίνης, σχηματισμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων και τέλος τη ρήξη του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Η ρήξη της πυρηνικής μεμβράνης έχει διαπιστωθεί στο 75 % των αποπτωτικών εμβρύων του ποντικού[314,321,322], αλλά και σε ανθρώπινες βλαστοκύστες με τη χρήση τεχνικών σήμανσης της κατακερματισμένης χρωματίνης (Polynucleotide-specific fluorochromes)[314,323].

Οι *Jurisicova et al*., το 1996 εξέτασαν ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων εμβρύων στα οποία είχαν μπλοκαριστεί οι κυτταρικές διαιρέσεις χρησιμοποιώντας την τεχνική TUNEL για την ανίχνευση αποπτωτικού, κατακερματισμένου DNA σε μεμονωμένα κύτταρα που βασίζεται στη δράση της TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) τρανσεφεράσης. Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι ένα μικρό ποσοστό (11%) από αυτά τα έμβρυα δεν έδειχναν σημάδια απόπτωσης, ούτε στο κυτταρόπλασμα ούτε στον πυρήνα. Στο 75% αυτών των εμβρύων εντοπίστηκαν όμως εκτεταμένες αλλαγές στη συμπύκνωση του πυρήνα τους. Η μέτρια ποιότητα εμβρύων που έχουν υψηλό ποσοστό θραυσμάτων είναι συνδεδεμένη με υψηλό ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών[324]. Τα έμβρυα αυτά αποδείχθηκε ότι περιείχαν σε διάφορες αναλογίες τόσο αποπτωτικά όσο και κυτταροπλασματικά σωματίδια και ο πυρήνας τους παρουσίαζε κατακερματισμένο DNA[312]. Αυτά τα θραύσματα αποτελούν τα πρώτα σημάδια της απόπτωσης και μπορούν να παρατηρηθούν τόσο στο πρώιμο έμβρυο όσο και στο στάδιο της βλαστοκύστης[314].

Η εξωκυτταρική μεσοκυττάρια ουσία (ΕΘΟ) επηρεάζει την εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος διαμέσου των μορίων συνάφειας (ιντεγκρίνες, καδερίνες)[325]. Οι ιντεγκρίνες διέπουν την κυτταρική συνάφεια επηρεάζοντας την κυτταρική επιβίωση[326,327]. Εμπλέκονται επίσης στην κυτταρική ανοχή σε αποπτωτικά ερεθίσματα, ιδιαίτερα σε σήματα που ενεργοποιούν το ενδογενές μονοπάτι θανάτου επαγώμενο από την απελευθέρωση του κυτόχρωματος C (cytochrome C) από τα μιτοχονδρία στο κυτταρόπλασμα. Με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C επάγεται ο σχηματισμός του αποπτωσώματος, στο οποίο συμμετέχουν ο παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1, APAF-1) και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), συνοδευόμενα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των κασπασών (caspases)[328]. Οι κασπάσες αποτελούν μία οικογένεια πρωτεασών που ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης[329]. Οι κασπάσες με τη σειρά τους πρωτεολύουν μία πληθώρα υποστρωμάτων που περιλαμβάνει πυρηνικές και κυτταροπλασματικές δομικές πρωτεΐνες που

μετέχουν στη μεταγωγή σήματος, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η μετάφραση και η επιδιόρθωση βλαβών του DNA[330,331] (**Εικόνα 14**).

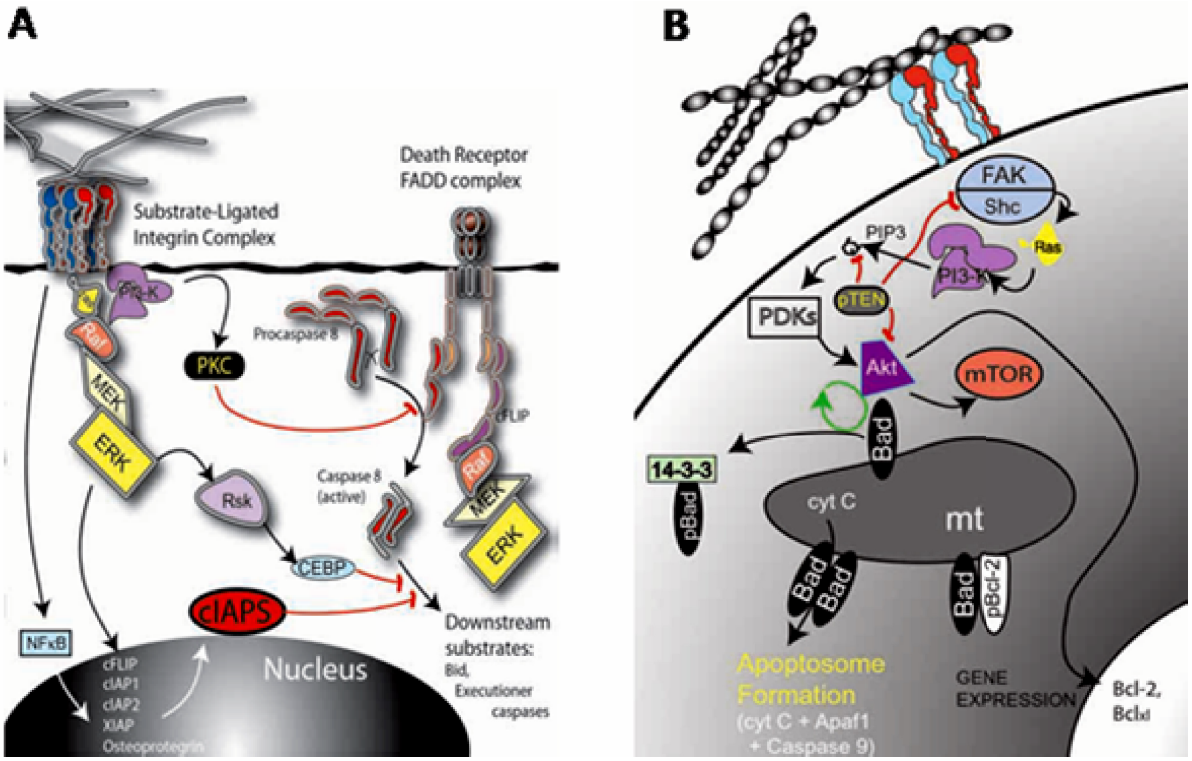
Η ενεργοποίησή τους από τις ιντεγκρίνες έχει σαν αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φακέλου οδηγώντας στην απόπτωση του εμβρύου. Τα σήματα που προέρχονται από τις ιντεγκρίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν το αποπτωτικό μονοπάτι.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης. Η εενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών πολλαπλών επικρατειών της οικογένειας Bcl-2 (Bak και Bax), σχηματίζουν ολιγομερή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στον διαμεμβρανικό χώρο. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c οδηγεί στο σχηματισμό αποπτωσωμάτων στα οποία συμμετέχουν η Apaf-1 και η κασπάση 9. Η κασπάση 9 ενεργοποιείται μέσα στα αποπτωσώματα και στη συνέχεια ενεργοποιεί, με πρωτεολυτική πέψη καθοδικές κασπάσες, όπως είναι η κασπάση 3[332].

Εκτός από τον αποπτωτικό μηχανισμό μέσω των μιτοχονδρίων, τα σήματα έναρξης της απόπτωσης μπορεί να προέρχονται από την επιφάνεια του κυττάρου (εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι) μέσω των υποδοχέων θανάτου-DRs (**D**eath **R**eceptors), όπως FAS, TNFR1, DR3-5, που ενεργοποιούμενοι στο εσωτερικό του κυττάρου σχηματίζουν το σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (**D**eath-**I**nducing **S**ignalling **C**omplex, DISC)[333].

Οι ιντεγκρίνες μεσολαβούν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και είναι επίσης πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εξωγενής οδού απόπτωσης διαμέσων των υποδοχέων DR, TNFα και FAS που συσχετίζονται με πρωτεΐνες της ΕΘΟ όπως η φιμπρονεκτίνη[334].



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού και του μηχανισμού επίδρασης των ιντεγκρινών μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων θανάτου DRs (death receptors). Ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε στρατολόγηση και ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και στο σχηματισμό του σηματοδοτικού σύμπλοκου επαγωγής απόπτωσης Ras/PI3K/AKT.

Η $\alpha_1\beta_1$ ιντεγκρίνη, υποδοχέας της λαμινίνης και του κολλαγόνου διαμέσου δύο υποδοχέων του TNF-α (TNFR1/R2) μπορούν να επηρεάσουν την απόπτωση του εμβρύου[335]. Ο παράγοντας TNF-α είναι μία κυτταροτοξίνη η οποία έχει ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους ιστών συμπεριλαμβανομένου και του ενδομητρίου, μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση της τροφοβλάστης διαμέσου του υποδοχέα TNFR1 που έχει μεγαλύτερη επίδραση στον πλακούντα[336]. Ο TNF-α διαμέσου του TNFR2 αλλάζει την έκφραση πολλών γονιδίων και επηρεάζει την απόπτωση. Η α_v ιντεγκρινική υπομονάδα προσδένεται με διαφορετικούς υποδοχείς. Η έλλειψη της έχει αρνητικό αποτέλεσμα στην εμφύτευση και στην απόπτωση του εμβρύου την $9^η$ ημέρα, ενώ η έλλειψη της ιντεγκρίνης μπορεί να προκαλέσει σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα καθώς και την απόπτωση του εμβρύου στην $10^η$ -$11^η$ ημέρα (**Εικόνα 15**).

Οι μεταλλαγές που μπορούν να υπάρξουν στις υπομονάδες των ιντεγκρινών μπορούν να προκαλέσουν την απόπτωση του εμβρύου[337]. Η ιντεγκρίνη α_4 είναι μία υπομονάδα που εκφράζεται στο κυκλοφορικό σύστημα και μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργικότητα στην αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Με τον τρόπο αυτό ο αλλαντοειδής υμένας δεν συγκολλείται με το χοριακό υμένα με αποτέλεσμα το θάνατο του εμβρύου την $11^η$ ημέρα. Άλλη μία μετάλλαξη, αυτή της υπομονάδας β1 ευθύνεται για τη μη ανάπτυξη της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM) του εμβρύου με αποτέλεσμα

αυτό να μην μπορεί να εξελιχθεί σε βλαστοκύστη και να καταλήγει σε εμβρυικό θάνατο την 5η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Αντίστοιχες μεταλλάξεις που συνδέονται με κυτταρικό θάνατο του εμβρύου έχουν εντοπιστεί και για τις καδερίνες. Για παράδειγμα, μετάλλαξη στην καδερίνη Ε αποτρέπει το σχηματισμό του επιθηλίου του τροφοεκτοδέρματος όπως και το σχηματισμό της κοιλότητας της βλαστοκύστης οδηγώντας σε πρώιμο εμβρυικό θάνατο[338].

Οι έρευνες όμως για την κυτταρική απόπτωση δεν περιορίζονται μόνο στα μόρια συνάφειας καθώς έχει παρατηρηθεί ότι το αποπτωτικό μονοπάτι επηρεάζεται και από αρκετούς αναπτυξιακούς παράγοντες όπως ο EGF, IGF-1[339], TGF-α καθώς επίσης και η προσθήκη στο καλλιεργητικό υγρό IGF[340]. Η προσθήκη TGF-α και IGF1 στο καλλιεργητικό μέσο των εμβρύων του ποντικού βοηθάει την ανάπτυξη τους, επικουρώντας τον σχηματισμό της βλαστοκύστης, ενώ παράλληλα μειώνει τον κυτταρικό θάνατο στις βλαστοκύστες[341]. Ο IGF1 επιπρόσθετα, βρέθηκε να βελτιώνει την ποιότητα των ανθρώπινων βλαστοκύστεων μειώνοντας το συνολικό ποσοστό των αποπτωτικών πυρήνων[342].

Σημαντικό ρόλο στην απόπτωση παίζουν και συστατικά εκφραζόμενα γονίδια τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται σε αποπτωτικά μονοπάτια. Το γονίδιο p53 για παράδειγμα, θεωρείται ότι κατέχει ρόλο κλειδί στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Το γονίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτήρηση βλαβών που δημιούργουνται στο γονιδίωμα και για αυτό το λόγο έχει ονομαστεί και ως φύλακας του γονιδιώματος[343]. Φυσιολογικά εκφράζεται σε πολύ χαμηλά, σταθερά επίπεδα κατά την σύνθεση του DNA, ενώ υπερέκφρασή του παρατηρείται όταν εντοπιστούν βλάβες στο γονιδίωμα που ενεργοποιούν την μεταφορά του στον πυρήνα. Εκεί αναλαμβάνει ρόλο μεταγραφικού παράγοντα, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση και υποχρεώνοντας τα κύτταρα να διορθώσουν τη γονιδιακή βλάβη προτού διαιρεθούν, ειδάλλως σηματοδοτεί την έναρξη της απόπτωσής τους.

Άλλα γονίδια με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση είναι τα ced–3, Bcl2 και BAX, τα δύο τελευταία εκ των οποίων έχουν ερευνηθεί και στα ανθρώπινα έμβρυα[344]. Η κυτταρική επιβίωση μπορεί να εξαρτάται από την έκφραση των μορίων της οικογένειας BCL-2 καθώς, η δέσμευση των ιντεγκρινών α5β1 και ανβ3 αντίστοιχα στην ινωδονεκτίνη και την βιτρονεκτίνη αυξάνει το λόγο BCL-2/BAX και ταυτόχρονα αναστέλλει την p53[345,346].

Η ανβ3 οποία έχει κρίσιμο ρόλο σε διαδικασίες αναδόμησης των ιστών και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση, καθώς και σε διάφορους τύπους καρκίνου[347], ενώ συμμετέχει επίσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση με διάφορους μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την ενεργοποιήση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την αναστολή της δράσης της p53 που συνδέεται με μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών BAX και p21waf1/cip1[345,348].

Το γονίδιο BAX προωθεί την απόπτωση, ενώ το Bcl-2 την επιβίωση των εμβρύων. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα RT–PCR που πραγματοποιήθηκαν σε 11 έμβρυα από το στάδιο των 2 κυτταρικών διαιρέσεων έως αυτό των 12 κατέδειξαν την έκφραση του mRNA αυτών των γονιδίων στα παραπάνω εμβρυικά στάδια[344]. Προηγούμενες μελέτες για την έκφραση των γονιδίων αυτών απέδειξαν την υψηλή έκφραση του Bcl-2 σε ανθρώπινα έμβρυα στο στάδιο 2–16 βλαστομεριδίων και την χαμηλή έκφραση του Bax γονιδίου στο ίδιο στάδιο, ενώ επιπρόσθετα αναδείχθηκε η υψηλή έκφραση του Bcl-2 γονιδίου στο στάδιο της βλαστοκύστης. Οι παραπάνω μελέτες μας δείχνουν ότι τα γονίδια Bcl2 και το BAX εκφράζονται στα ανθρώπινα έμβρυα κατά την προεμφυτευτική περίοδο.

1.18 Σκοπός της μελέτης

Παρά τις βελτιώσεις στην τεχνογνωσία και τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στους ανθρώπους, τα ποσοστά εγκυμοσύνης παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Η φαρμακευτική διέγερση των ωοθηκών μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο τους προσδέτες της ΕΘΟ στην εμβρυϊκή επιφάνεια, αλλά και τα μόρια συνάφειας, και ιδιαίτερα τις ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών συστημάτων, ενώ συμμετέχουν σε αρκετές σημαντικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης, της εμφύτευσης του εμβρύου και της αναδιάταξης του πλακούντα.

Οι επιπτώσεις της ωοθηκικής διέγερσης στο έμβρυο και των παραμέτρων του ενδομητρίου έχουν αποδειχθεί από διάφορους ερευνητές[349]. Η ποιότητα των εμβρύων αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την επιτυχή εμφύτευση και εγκυμοσύνη[350]. Μερικές μελέτες απέδειξαν ότι η διέγερση των ωοθηκών μπορεί να μειώσει την έκφραση των ιντεγκρινών στο ενδομήτριο, μειώνοντας τη δεκτικότητά του[351]. Ωστόσο, όλες αυτές οι μελέτες δεν παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές στην έκφραση των ιντεγκρινών σε εμβρυϊκό στάδιο κατόπιν εφαρμογής φαρμακευτικά υποβοηθούμενης ωοθηκικής διέγερσης. Η ποιότητα των εμβρύων αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την επιτυχή εμφύτευση και εγκυμοσύνη. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εμβρύου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την επιλογή εμβρύων καλής ποιότητας, όμως ορισμένες μεταβολές στους δείκτες της γονιδιακής έκφρασης δεν θα μπορούσαν να εντοπιστούν και να επιλεγούν μόνο με την μορφολογικές εκτιμήσεις[352]. Για παράδειγμα, η αποτυχία επαρκούς εκφράσης ιντεγκρινών που καθορίζουν την ικανότητα εμφύτευσης του εμβρύου δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με μορφολογικά κριτήρια[294].

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθεί περαιτέρω η επιδράση του πρωτόκολλου διέγερσης των ωοθηκών στην εμβρυϊκή έκφραση των ιντεγκρινών και καδερινών του ποντικού. Έτσι δίνεται η δυνατότητα διαλεύκανσης των πολύτιμων κυτταρικών αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του εξωκυττάριου

χώρου κατά την αναπαραγωγική διαδικασία που μπορούν με τη σειρά τους να καθορίσουν την επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που προέκυψαν επεκτείναμε την ερευνά μας, μελετώντας την επίδραση της βιοψίας εμβρύου στην εμβρυϊκή έκφραση των ιντεγκρινών και καδερινών και το ρόλο της προσθήκης L-Cn στο καλλιεργητικό μέσο και αξιολογώντας τη βελτίωση του ποσοστού ανάπτυξης και επιβίωσης των εμβρύων σε *in vitro* συνθήκες.

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται νέα δεδομένα που αφορούν στη συμμέτοχη των μορίων συνάφειας στην αναπαραγωγική διαδικασία και στον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η προσθήκη της L-Cn του καλλιεργητικού μέσου στην έκφραση των ιντεγκρινών που καθορίζουν την ανάπτυξη και την εμφύτευση του εμβρύου.

2. Υλικά και Μεθοδολογία

2.1 Πειραματική Προσέγγιση

Για τη μελέτη της επίδρασης της διέγερσης των ωοθηκών στην έκφραση των ιντεγκρινών avb3, α5β1 α6, aVIb και CE σχεδιάστηκαν *in vivo* και *in vitro* πειράματα σε ωάρια και σε προεμφυτευτικά έμβρυα ποντικού, όπως περιγράφονται παρακάτω. Πραγματοποιήθηκαν βιοψίες προεμφυτευτικών εμβρύων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης *in vitro*, ενώ στη συνέχεια εκτιμήθηκε η επίδραση της L-καρνιτίνης στην *in vitro* ανάπτυξη των προ-εμφυτευτικών εμβρύων όσο και στην έκφραση μορίων συνάφειας.

2.2 Πειραματόζωα

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα θηλυκά ποντίκια τύπου BALB/c (Mus musculus), ηλικίας 6-14 εβδομάδων) και βάρους (20±0,3g). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας, ενώ η εκτροφή των ζώων πραγματοποιήθηκε στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Τα ποντίκια εκτρέφονται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-24°C), υγρασίας (50%), 12ωρη φωτοπερίοδο (07.00 πμ έως 19.00 μμ) και ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (ad libitum). Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε σύμφωνα με τις ισχύουσες νομικές διατάξεις (EL91-BIObr-09).

2.3 Ωοθηκική διέγερση και αναπαραγωγή

Στις πειραματικές διαδικασίες ενήλικα θηλυκά ποντίκια τύπου BALB/c παρατηρήθηκαν αρχικά για τη διάρκεια και τον προσδιορισμό του σταδίου του κύκλου τους (οίστρος) προκειμένου να καταταγούν στην κατάλληλη ομάδα (οίστρος, προίστρος, μεταοίστρος, διοίστρος). Έπειτα κατατάχθηκαν τυχαιοποιημένα σε τρείς πειραματικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα τα ποντίκια παρέμεναν στο φυσικό τους κύκλο. Στη δεύτερη ομάδα έγινε πρόκληση υπερωορρηξίας με τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης ίππου PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Sigma, G4877), ενώ στην τρίτη ομάδα χορηγήθηκε L-καρνιτίνη (Sigma, C0158) σε συνδυασμό με ορμονική διέγερση. Η PMSG είναι μια γοναδοτροπίνη ικανή να διεγείρει τις ωοθήκες με σκοπό την ανάπτυξη και ωρίμανση των θυλακιακών κυττάρων (follicle cells) και την παραγωγή της FSH και της LH. 46-48 ώρες μετά την χορήγηση της PMSG ακολούθησε η χορήγηση της hCG (human chorionic gonadotropin, Sigma, CG5–1VL). Σε κάθε περίπτωση η χορήγηση της hCG προηγούνταν του ενδογενούς κύματος της LH (15-20 ώρες μετά τη μέση του δεύτερου κύκλου σκοταδιού). Μετά τη χορήγηση της hCG τα θηλυκά τοποθετούνταν με τα αρσενικά για μια νύχτα και ελέγχονταν το επόμενο πρωί για την ύπαρξη κολπικού βίσματος (vaginal plug).

Το πρωτόκολλο της ωοθηκικής διέγερσης περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 5 IU PMSG/ποντίκι (ώρα χορήγησης 15.00 μμ).

-47 ώρες αργότερα, ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 5 IU hCG/ποντίκι (ώρα χορήγησης 14.00 μμ).

-2 ώρες αργότερα εγκλεισμός των θηλυκών με αρσενικά ποντίκια BALB/c τα οποία έχουν ελεγχθεί για την αναπαραγωγική τους ικανότητα και δεν έχουν ζευγαρώσει για περισσότερο από 3 ημέρες (ώρα εγκλεισμού 16.00 μμ).

- Έλεγχος για την ύπαρξη κολπικού βίσματος στα θηλυκά ποντίκια το επόμενο πρωί (ώρα ελέγχου 09.00 πμ).

2.4 L-Καρνιτίνη

Η χορήγηση της L-καρνιτίνης (L-Carnitine innersalt, Sigma, C0158) έγινε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 3 (L-Cn 3d), 4 (L-Cn 4d), 5 (L-Cn 5d) ή 7 (L-Cn 7d) ημέρες πριν την προγραμματισμένη υπερωορρηξία. Η ποσότητα της L-καρνιτίνης σε κάθε δόση ήταν 2,5 mg/ποντίκι. Στα ποντίκια ελέγχου (control) πραγματοποιήθηκαν ενέσεις με διάλυμα φυσιολογικού ορού (0,9% w/v NaCl σε dH2O).

2.5 Συλλογή εμβρύων *in vivo*

Ανάλογα με το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων ακολουθήθηκε το παρακάτω χρονικό πλαίσιο:

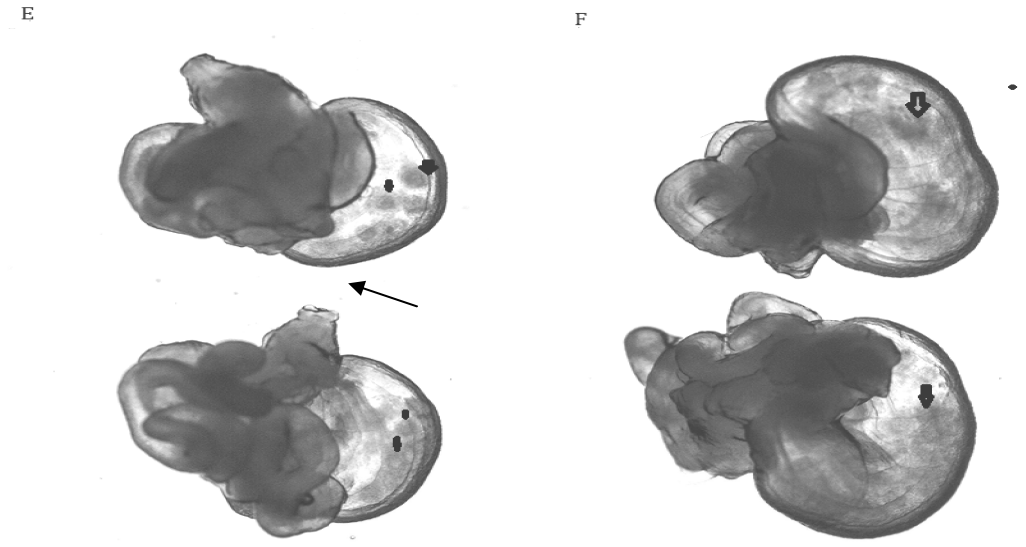
Πίνακας 1. Εκτίμηση σταδίου ανάπτυξης των εμβρύων του ποντικού μετά τη χορήγηση hCG.

Εμβρυικό στάδιο	**Ώρες μετά την χορήγηση της hCG**	**Ημέρα εγκυμοσύνης**
Ζυγώτης	18-20	0
Έμβρυο 2 κυττάρων	42-44	1
Έμβρυο 8 κυττάρων	68-72	2
Βλαστοκύστη	92-93	3

Για την απομόνωση εμβρύων σε κάθε πείραμα θυσιάζονταν 1-2 θηλυκά ποντίκια με τη μέθοδο της με «αυχενικής μετατόπισης». Η διάνοιξη της περιτοναϊκής κοιλότητας πραγματοποιούνταν σε ασηπτικές

συνθήκες. Η μήτρα, η σάλπιγγα, η ωοθήκη και ο λιπώδης ιστός τοποθετούνται τεντωμένα και μακριά από την κοιλότητα του σώματος αποκαλύπτοντας μια λεπτή μεμβράνη (το μεσομήτριο), η οποία συνδέει την αναπαραγωγική οδό με το τοίχωμα του σώματος και φέρει παράλληλα με τη μήτρα ένα προεξέχον αιμοφόρο αγγείο. Οι σάλπιγγες απομονώνονταν και μεταφέρονταν προς πλύση στο κέντρο του καλλιεργητικού τριβλίου (petri center well dishew, IVF test, Falcon, 353653) σε 1ml καλλιεργητικού υγρού προθερμασμένο στους 37ºC MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich, M4665) εμπλουτισμένο με 5% human serum albumin (Sage, REFART-3001) και 1% Hepes (Sigma, H0887). Στη συνέχεια μεταφέρονταν σε καλλιεργητικό τριβλίο (petri round dish, IVF test, Falcon, 353652) σε μικροσταγόνα 100 ml Gamete buffer (GB) (KSIGB, Cook) προθερμασμένο στους 37ºC για τουλάχιστον 1 ώρα και καλυμμένο με λάδι παραφίνης (MineralOil, Ferticult). Τα έμβρυα στο στάδιο του ζυγώτη περιβάλλονται ακόμα από τα ωοθυλακικά κύτταρα και βρίσκονται συγκεντρωμένα στο άνω τμήμα της σάλπιγγας. Το κροσσωτό άκρο της σάλπιγγας, ο κώδωνας, είναι διογκωμένος κατά την διάρκεια και λίγο μετά την ωορρηξία και μπορεί εύκολα να εντοπιστεί με τη χρήση στεροσκοπίου (20x μεγέθυνση, **Εικόνα 17**). Χρησιμοποιώντας λεπτή λαβίδα για την συγκράτηση της σάλπιγγας δίπλα στον διογκωμένο κώδωνα, ο ιστός στερεώνεται σταθερά στο κάτω μέρος του πιάτου και με μια λεπτή βελόνα διαρρηγνύεται κοντά στο σημείο όπου βρίσκονται τα έμβρυα, τα οποία απελευθερώνονται ελεύθερα στο διάλυμα.

Μετά το στάδιο του ζυγώτη, η συλλογή των εμβρύων μπορεί να είναι δυσκολότερη καθώς δεν βρίσκονται συγκεντρωμένα. Σε αυτές τις περιπτώσεις πραγματοποιείται έκπλυση της σάλπιγγας με την βοήθεια πιπέτας. Η σάλπιγγα σταθεροποιείται με μια λεπτή λαβίδα και η πιπέτα εισάγεται στο στόμιο του κώδωνα. Η απελευθέρωση των εμβρύων στο διάλυμα γίνεται από το άνοιγμα το ιστού, στο σημείο της ένωσης με την μήτρα. Εν συνεχεία, τα έμβρυα καθαρίζονται σε σταγόνες 0.1% PBS-BSA (Phosphate buffered saline, Sigma, P4417; Bovine serum albumin, Sigma, A7906). Η διαδικασία της απομόνωσης των εμβρύων πραγματοποιούνταν σύντομα καθώς αυτά είναι πολύ ευαίσθητα στις αλλαγές του περιβάλλοντος.

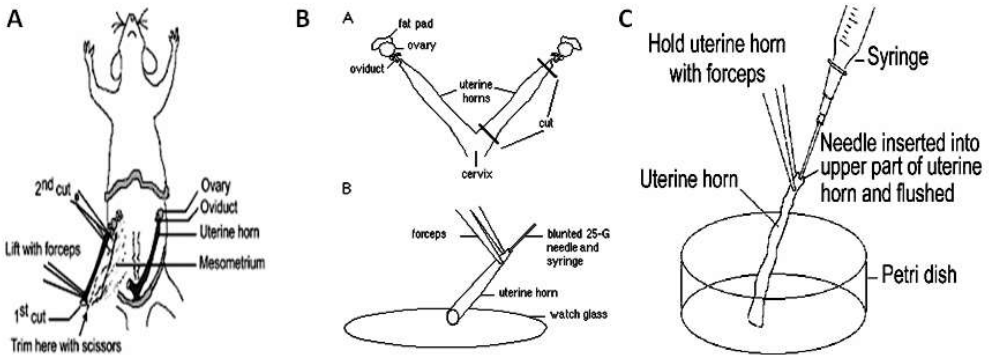


Εικόνα 16: Απεικόνιση διογκωμένου κώδωνα των ωαγωγών μετά από πρόκληση υπερωορρηξίας. Διακριτά τα έμβρυα σε μεγέθυνση εικόνας στερεοσκοπίου[353].

2.6 Συλλογή εμβρύων από τη μήτρα

Η συλλογή των βλαστοκύστεων γίνεται από την μήτρα την ημέρα 3 της εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα, μετά την ευθανασία των θηλυκών, τα πειραματόζωα τοποθετούνται με εκτεθειμένη την κοιλιακή κοιλότητα. Για την αφαίρεση της μήτρας, γίνεται κατά μήκος τομή ακριβώς πάνω από τον τράχηλο της μήτρας (που βρίσκεται πίσω από την ουροδόχο κύστη). Η μήτρα στη συνέχεια τραβιέται προς τα πάνω με σκοπό να τεντωθεί η μεμβράνη του μεσομητρίου και να κοπεί κοντά στο τοίχωμα των κεράτων της μήτρας. Αφού απελευθερωθεί το μεγαλύτερο τμήμα του ιστού, η μήτρα κόβεται κάτω από το σημείο που ενώνεται με τη σάλπιγγα. Το σημείο αυτό δρα ως βαλβίδα, και αν η τομή γίνει κατά μήκος της σάλπιγγας και όχι της μήτρας, η έκπλυση θα είναι πολύ δύσκολη (**Εικόνα 17**).

Οι μήτρες τοποθετούνται σε διάλυμα 0.1% PBS-BSA. Η πλύση των εμβρύων από τον ιστό γίνεται με την χρήση πιπέτας Pasteur η οποία εισάγεται στο κάτω μέρος της μήτρας όπου απελευθερώνονται περίπου 0,2 ml διαλύματος. Οι ζυγώτες που απομονώθηκαν από BALB/c ποντίκια της ομάδας ελέγχου και της ομάδας χορήγησης L-καρνιτίνης 20 ώρες μετά τη χορήγηση hCG, καλλιεργήθηκαν σε σταγόνες 50 μl προθερμασμένου θρεπτικού mHTF (modified Human Tubal fluid)[354] με ή χωρίς 400 μM L-καρνιτίνη (μέγιστος αριθμός εμβρύων/σταγόνα=10). Τα έμβρυα επωάζονταν για 24 ώρες στους 37ºC σε 5% CO_2. Μετά την καλλιέργεια υπολογίστηκε το ποσοστό της ανάπτυξης τους και τα διπλασιασμένα έμβρυα χρησιμοποιήθηκαν είτε σε πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας, είτε σε πειράματα γένεσης τρίτης αρμονικής.



Εικόνα 17: Απομόνωση εμβρύων από τη μήτρα. Α. Αφαίρεση της μήτρα με τομή κατά μήκος του τραχήλου (cervix) και της μεμβράνης (mesometrium) που την συγκρατεί στο τοίχωμα του σώματος. Β. Δεύτερη τομή κάτω από το σημείο ένωσης με τη σάλπιγγα. C. Τοποθέτηση της μήτρας σε σταγόνα διαλύματος 0.1% PBS-BSA και έκπλυση των κεράτων με περίπου 0,2 ml του ίδιου διαλύματος.

2.7 Τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης

2.7.1 Συλλογή ώριμων ωαρίων

14-15 ώρες μετά από την χορήγηση της HCG πραγματοποιούνταν ευθανασία των θηλυκών ποντικών, αφαιρούνταν το άνω μέρος των ωαγωγών και μεταφέρονταν προς πλύση στο κέντρο καλλιεργητικού τριβλίου σε 1ml καλλιεργητικού υγρού MEM (προθερμασμένο στους 37ºC) εμπλουτισμένο με 5% human serum albumin και 1% Hepes. Στη συνέχεια μεταφέρονταν σε μικροσταγόνα 100 ml Gamete Buffer (GB) προθερμασμένο στους 37ºC για τουλάχιστον 1 ώρα. Εν συνεχεία, επωάζονταν σε ομάδες των 10-15 σε μικροσταγόνες 0,5ml FertilizationMedia(KSIFM) καλυμμένες με ορυκτό έλαιο (mineral oil) προθερμασμένο σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37ºC, 6% CO_2) για μία νύχτα.

2.7.2 Συλλογή και επεξεργασία σπέρματος

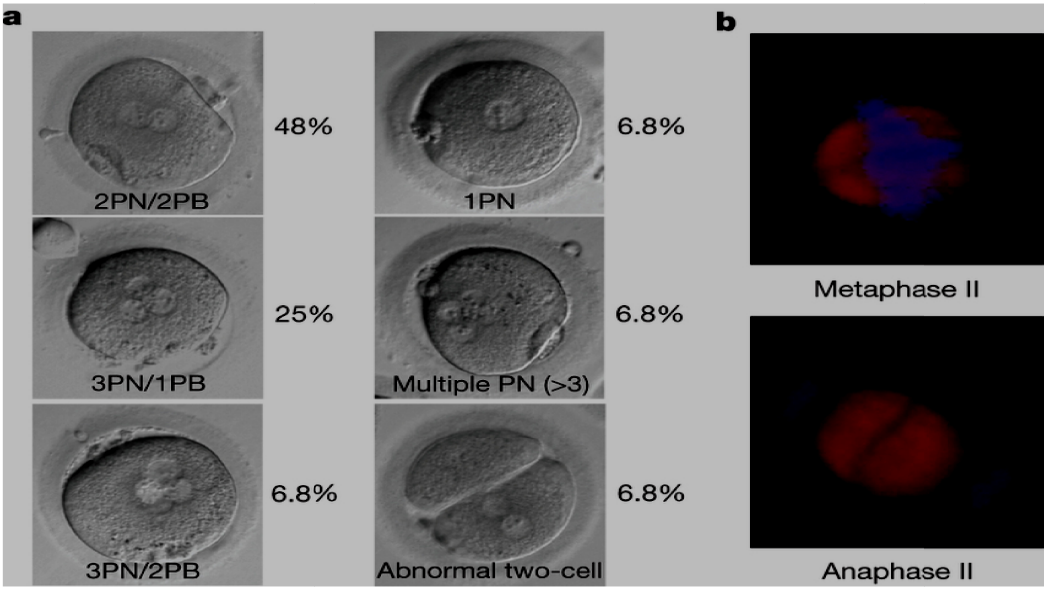
Προς επίτευξη της γονιμοποίησης *in vitro*, το σπέρμα απομονωνόταν από ενήλικα αρσενικά ποντίκια (10-12 εβδομάδων) τύπου BALB/c μετά από εκτομή των επιδιδυμίδων. Το σπέρμα λαμβάνονταν με σύνθλιψη της επιδιδυμίδας και του σπερματικού πόρου με λαβίδα και επωάζονταν για 15 min στους 37ºC σε 0,3 ml Fertilization Media προθερμασμένο σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37ºC, 6% CO_2) για μία νύχτα.Η ενεργοποίησή του πραγματοποιούνταν με την τεχνική ανάδυσης swim-up. Το δείγμα τοποθετούνταν σε κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρησης (Falcon, 352095), αραιώνονταν με 5 ml καλλιεργητικού υγρού Sperm Medium (KSISM, Cook) προθερμασμένου στους 37ºC και φυγοκεντρούνταν για 5 λεπτά στα 200g. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα επικαλύπτονταν προσεκτικά με μια στρωμάτωση με 0,5 ml προθερμασμένου FM (37ºC, 6% CO_2) για μία

νύχτα. Στη συνέχεια τοποθετούνταν για 45 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C υπό κλίση 45º. Το υπερκείμενο που περιείχε τα ενεργά κινητά σπερματοζωάρια απομακρύνονταν με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur προς περαιτέρω επώαση στους 37°C για 1-3 ώρες πριν τη γονιμοποίηση.

2.7.3 Γονιμοποίηση

10-15 ωάρια τοποθετούνταν τυχαιοποιημένα σε μικροσταγόνες καλλιεργητικού υγρού FM όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε μόνο ωάρια καλλιεργημένα σε FM, ενώ στη δεύτερη ομάδα προσθέτονταν στο καλλιεργητικό μέσο 400 μM L-Cn. Για να πραγματοποιηθεί η *in vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων με τα ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια ακολουθούσε προσθήκη $2x10^5$ σπερματοζωαρίων/ml στο τριβλίο που περιείχε τα ωάρια. Ακολουθούσε επώαση ωαρίων και σπέρματος για 6-7 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια ακολουθούσε έκπλυση των σπερματοζωαρίων και απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων με πλύσεις σε GB.

Η **αξιολόγηση της γονιμοποίησης** έγινε σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ60) εφοδιασμένο με θερμαινόμενη πλάκα (minitube GmbH) ρυθμισμένη στους 37±0,5°C. Τα γονιμοποιημένα ωάρια αναμένεται να εμφανίσουν δύο ευδιάκριτους προπυρήνες (2PN), έναν πατρικής και έναν μητρικής προέλευσης, καθώς και δύο πολικά σωμάτια στον περιλεκιθικό χώρο (2PB). Η παρουσία ενός μόνο προπυρήνα (1PN), 3 ή περισσοτέρων προπυρήνων (3PN, 4PN κ.ο.κ.), ή απευθείας μίτωση του ζυγώτη χωρίς προηγούμενη εμφάνιση προπυρήνων ("αυτόματη αυλάκωση" (direct cleavage), αποτελούν ανωμαλίες της γονιμοποίησης (**Εικόνα 18**).



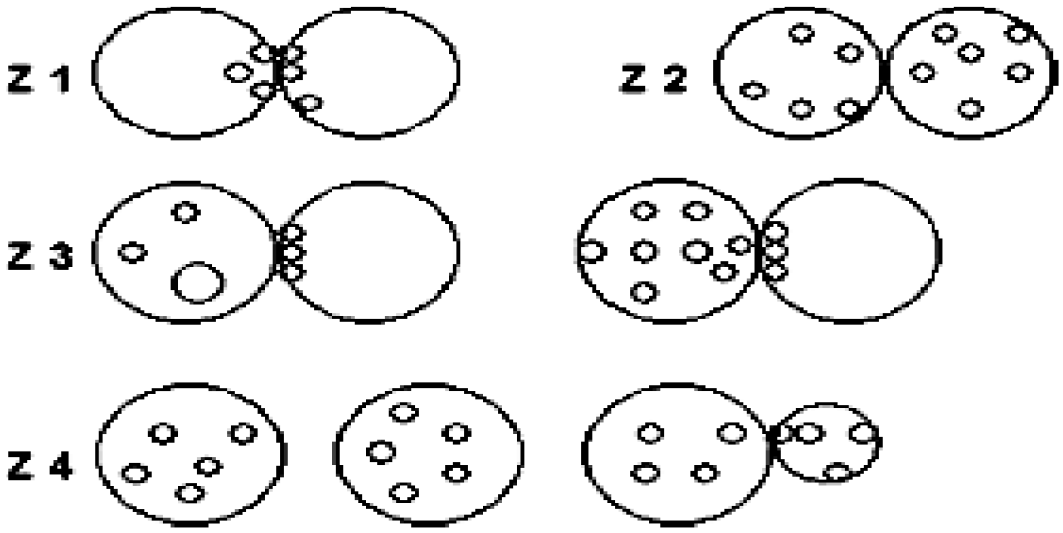
Εικόνα 18. Ανώμαλος σχηματισμός προπυρήνων και μορφολογίας μιτωτικής άρκτου σε ανθρώπινα ωάρια. a. Αναλογία φυσιολογικά γονιμοποιημένων ζυγωτών με δύο προπυρήνες και δύο πολικά σώματα (2PN/2PB) σε σύγκριση με μη

φυσιολογικούς ζυγώτες (3PN/1PB, 3PN/2PB, 1PN, πολλαπλούς PN και δύο- κύτταρα) b. Ακεραιότητα των μειωτικών ατράκτων σε ανθρώπινα ωοκύτταρα. Απεικονίζεται η κανονική μετάφραση II (άνω) και η πρόωρη μετάβαση στην αναφάση II (κάτω)[355].

Η ποιότητα των προπυρήνων αξιολογήθηκε με βάση την παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών που περιελάμβανε τις παρακάτω παραμέτρους:

- Τη μορφολογία και τον προσανατολισμό των προπυρήνων στο γονιμοποιημένο ωάριο με βάση το σύστημα αξιολόγησης Z-score. Οι ζυγώτες περιγράφονται ως Z1, Z2, Z3 και Z4 ανάλογα με το μέγεθος, τον αριθμό και την κατανομή των πυρηνίσκων μέσα στους πυρήνες (**Εικόνα 19**). Στην ιδανική περίπτωση, οι πυρηνίσκοι πρέπει να είναι μεταξύ 3 και 7 ανά πυρήνα[356–358].

- Τη μορφολογία και τον προσανατολισμό των προπυρήνων, τον καταμερισμό και τη μορφολογία των πυρηνίσκων στους προπυρήνες, την ευθυγράμμιση του πολικού σωματίου και τον έλεγχο της παρουσίας κυτταροπλασματικής άλου στους ζυγώτες[223].



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος καταγραφή Z-score. Z1:ζυγώτης με ίσους αριθμούς πυρηνίσκων ανά προπυρήνα, όμοιους σε μέγεθος, που αρχίζουν ή έχουν ήδη ευθυγραμμιστεί στο σημείο σύνδεσης των πυρήνων. Z2: ζυγώτης με ισομεγέθεις πυρήνες, χωρίς ευθυγράμμιση στο σημείο σύνδεσης των προπυρήνων. Z3: ζυγώτης με πυρηνίσκους άνισους σε μέγεθος ή/και αριθμό χωρίς ευθυγράμμιση στην πυρηνική σύνδεση. Z4: ζυγώτης με ανισομεγέθεις προπυρήνες που δεν ευθυγραμμίζονται ή που βρίσκονται σε λάθος θέσεις. Οι πυρηνίσκοι του είναι μικροί ή διάσπαρτοι[357].

Εάν η γονιμοποίηση έχει ολοκληρωθεί φυσιολογικά, τα ωάρια εμφανίζουν διαδοχικά όλα τα φυσιολογικά στάδια: οι προπυρήνες πλησιάζουν ο ένας τον άλλον και συγχωνεύονται (συγγαμία). Λίγες ώρες αργότερα ο διπλοειδής πυρήνας εξαφανίζεται και ακολουθεί η πρώτη μίτωση του ζυγώτη. 24 ώρες μετά από την γονιμοποίηση καταγράφονταν ο αριθμός των ομαλά γονιμοποιημένων ωαρίων.

Τα ομαλά γονιμοποιημένα ωάρια σε ομάδες 2-3, μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας κάτω από διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας που λαμβάνουν υπόψη τόσο την φυσιολογία του εμβρύου όσο και του περιβάλλοντος του ωαγωγού και μήτρας. Πιο συγκεκριμένα, σε κάποιες περιπτώσεις έμβρυα 1ης έως 6ης ημέρας καλλιεργήθηκαν σε πολυφασικά υγρά (sequential culture media system), κάποια άλλα σε σύστημα μεμονωμένης καλλιέργειας με μονοφασικά υγρά (single culture media system/ one-step culture).

2.7.4 Σταδιακή καλλιέργεια

Το σύστημα σταδιακής καλλιέργειας με πολυφασικά υγρά είχε στόχο να εκθέσει τα έμβρυα σε ειδικά για κάθε στάδιο καλλιεργητικά μέσα[359]. Τα εν λόγω μέσα είναι σχεδιασμένα να απαντούν στις μεταβολικές απαιτήσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Το πρωτόκολλο σταδιακής καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε περιληπτικά εφαρμόστηκε ως εξής:

Μέτα την αξιολόγηση της γονιμοποίησης την 1η ημέρα τα γονιμοποιημένα ωάρια και έμβρυα από το στάδιο των 2-8 κυτταρικών διαιρέσεων τοποθετήθηκαν σε προ-εξισορροπημένες μικροσταγόνες 0,5ml καλλιεργητικού υγρού Cleavage Medium (KSICM, Cook). Την 3η ημέρα μετά την γονιμοποίηση έγινε αξιολόγηση και καταγραφή του βαθμού ανάπτυξης των εμβρύων τα οποία ομαδοποιήθηκαν ανά δύο ή τρία ανάλογα με το βαθμό ανάπτυξης και μορφολογία τους. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε προ-εξισορροπημένες μικροσταγόνες 0,5ml Blastocyst medium (KSIBM, Cook) μέχρι στο στάδιο της βλαστοκύστης, δηλαδή την 5-6η ημέρα. Σε όλες τις επωάσεις των εμβρύων προστέθηκε L-carnitine (400 μM) όπου χρειαζόταν με βάση την εκάστοτε πειραματική συνθήκη.

2.7.5 Μεμονωμένη καλλιέργεια

Το σύστημα μεμονωμένης καλλιέργειας με μονοφασικά υγρά στοχεύει στο να επιτρέπει στα αναπτυσσόμενα έμβρυα να επιλέγουν τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιούν το άγχος από την έκθεση σε μια απότομη αλλαγή στο περιβάλλον καλλιέργειάς τους ως και την 3η ημέρα. Το πρωτόκολλο μεμονωμένης καλλιέργειας με μονοφασικά υγρά που χρησιμοποιήθηκε εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω.

Μέτα την αξιολόγηση της γονιμοποίησης την 1η ημέρα, τα γονιμοποιημένα ωάρια και έμβρυα σταδίου 2-8 κυτταρικών διαιρέσεων τοποθετήθηκαν σε προ-εξισορροπημένες μικροσταγόνες 0,5ml τριών διαφορετικών καλλιεργητικών υγρών Global total LP (Life global group H5GT), Sage-1step (Origio), Irvine complete (Irvine Scientific 90165) με ή χωρίς προσθήκη L-carnitine. Την 3η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση έγινε αξιολόγηση και καταγραφή του βαθμού ανάπτυξης των εμβρύων καθώς και

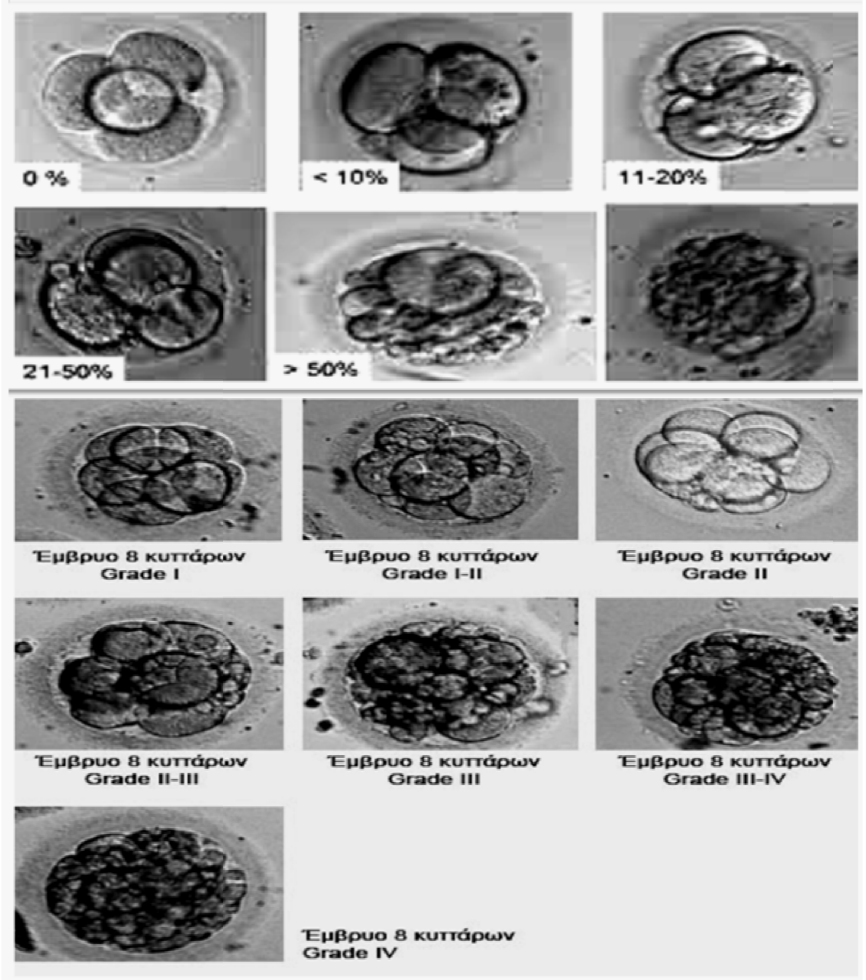
ομαδοποίησή τους. Στην συνέχεια 2-3 έμβρυα της ίδιας ομάδας τοποθετούνταν σε φρέσκιες μικροσταγόνες ίδιου καλλιεργητικού μέσου με η χωρίς προσθήκη L-Carnitine μέχρι στο στάδιο της βλαστοκύστης, δηλαδή μέχρι την 5η-6η ημέρα.

2.7.6 Αξιολόγηση της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης

Η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη αξιολογούνταν και καταγράφονταν καθημερινά τόσο στην ομάδα ελέγχου (Control) όσο και στις ομάδες μελέτης με τη χρήση στερεοσκοπίου (SZ60 Olympus). Η αξιολόγηση γινόταν με βάση δημοσιευμένα μορφολογικά κριτήρια[360] βασισμένα στις παρακάτω παραμέτρους:

1. Το χρόνο διεξαγωγής της πρώτης κυτταρικής διαίρεσης
2. Το μέγεθος και σχήμα (μορφολογία) βλαστομεριδίων, καθώς και την παρουσία υπολειμμάτων από ατελείς κυτταρικές διαιρέσεις
3. Αρτιότητα κυτταρικών διαιρέσεων και καταμερισμός των απύρηνων κυτταρικών θραυσμάτων μέσα στην διαφανή ζώνη του γονιμοποιημένου ωαρίου κατά το στάδιο της αυλάκωσης
4. Ρυθμός ανάπτυξής, δηλαδή ταχύτητα και χρόνος που επιτελούνταν οι κυτταρικές διαιρέσεις κατά το στάδιο της αυλάκωσης
5. Συνδυασμός κριτηρίων

Τα έμβρυα κατατάσσονται σε τέσσερις μορφολογικές κατηγορίες, ανάλογα με την ποιότητά τους, με κύριο κριτήριο το ποσοστό κυτταρικών θραυσμάτων που περιείχαν και την ομοιογένεια των βλαστομεριδίων τους όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 20**. Για τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν μόνο έμβρυα κατηγορίας 1-3, ενώ αποκλείστηκαν τα έμβρυα κατηγορίας 4.



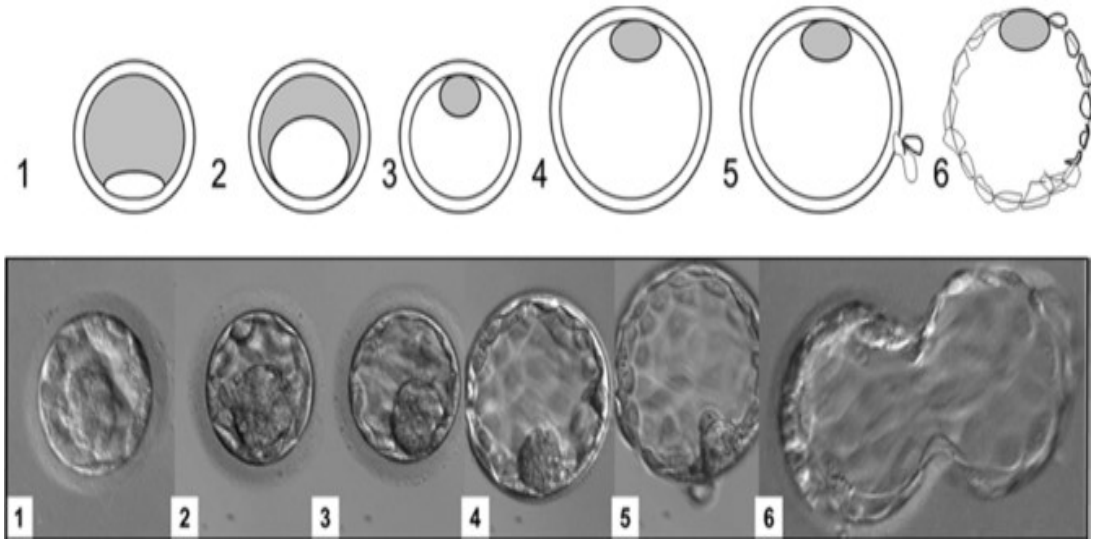
Εικόνα 20. Απεικόνιση μορφολογικής κατηγορίας εμβρύων ανάλογα με το ποσοστό κυτταρικών θραυσμάτων που περιείχαν και την ομοιογένεια των βλαστομεριδίων τους. Τα έμβρυα 1ου βαθμού (I) χαρακτηρίζονται από την απουσία κυτταρικών θραυσμάτων και από ισομεγέθη βλαστομερίδια. Τα έμβρυα 2ου βαθμού (II) περιέχουν σε ποσοστό <20% κυτταρικά θραύσματα., αλλά φέρουν ισομεγέθη βλαστομερίδια. Τα 3ου βαθμού (III) έμβρυα αποτελούνται από 20-50% κυτταρικά θραύσματα και ανισομεγέθη βλαστομερίδια, ενώ τα 4ου βαθμού (IV) φέρουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% κυτταρικά θραύσματα και ανισομεγέθη βλαστομερίδια.

2.7.7 Αξιολόγηση της μορφολογίας βλαστοκύστεων

Την 4η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, στο στάδιο των 16-32 κυττάρων (μορίδιο), τα βλαστομερίδια προοδευτικά συγχωνεύονται (συνείληση ή σύμπηξη) και το έμβρυο προσλαμβάνει όψη άμορφης μάζας με ορατούς μόνο τους πυρήνες των βλαστομεριδίων. Η καταμέτρηση των κυτταρικών διαιρέσεων σε αυτό το στάδιο είναι δύσκολη με κοινό μικροσκόπιο, καθώς επίσης και η διάκριση του διαχωρισμού μεταξύ έσω κυτταρικής μάζας και τροφοβλάστης. Τα έμβρυα σταδίου μοριδίου και βλαστοκύστης εξετάστηκαν ως μία ομάδα λόγω των βραχέων χρονικών διαστημάτων εξέλιξης που τα χωρίζουν. Προκειμένου η εκτίμηση της μορφολογίας της βλαστοκύστης να είναι αποτελεσματική εκτιμάται όχι μόνο ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, αλλά και η έσω κυτταρική μάζα (ICM) με το σύστημα

αξιολόγησης Gardner. Το σύστημα αυτό λαμβάνει υπόψη το ρυθμό επέκτασης της βλαστοκύστης με ένα αριθμητικό ψηφίο από (1έως 6) και βαθμολογεί τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα ανάλογα με τον αριθμό και την σύνδεση μεταξύ τους (A-C) και τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας ανάλογα με την οργάνωση και την συνοχή τους (A-D)[361]. Τα χαρακτηριστικά που λαμβάνονται υπόψη είναι τα παρακάτω, ενώ οι αριθμοί του κειμένου αντιστοιχούν στους αριθμούς της **Εικόνας 21**.

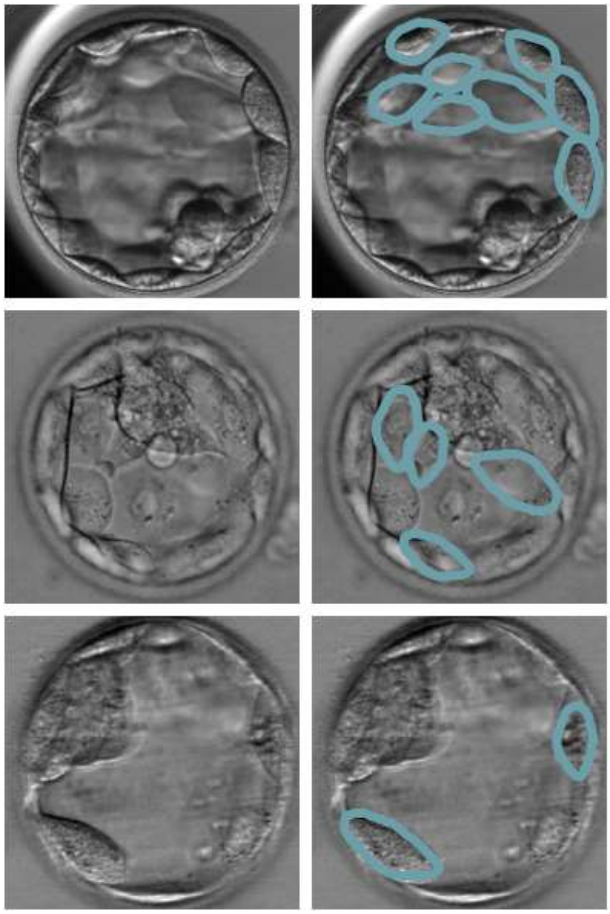
1. Η πρώιμη βλαστοκύστη ή βλαστική κοιλότητα να καταλαμβάνει όγκο λιγότερο από το μισό του όγκου του γονιμοποιημένου ωαρίου με τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας να αρχίζουν μόλις να διακρίνονται.
2. Η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει περισσότερο από το μισό όγκο του γονιμοποιημένου ωαρίου. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας είναι διακριτά (επεκτεινόμενη βλαστοκύστη).
3. Η βλαστική κοιλότητα να καταλαμβάνει ολόκληρο τον όγκο του γονιμοποιημένου ωαρίου (πλήρης βλαστοκύστη).
4. Η βλαστική κοιλότητα να καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο από το έμβρυο (διευρυμένη βλαστοκύστη) με ταυτόχρονη λέπτυνση της διαφανούς ζώνης.
5. Η εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από ρήγμα στη διαφανή ζώνη και τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρά της προεξέχουν.
6. Η εκκολάπτουσα βλαστοκύστη έχει πλήρως εκκολαφθεί και η διαφανής ζώνη δεν είναι πλέον ορατή.



Εικόνα 21. Βαθμολόγηση της διαστολής της κοιλότητας της βλαστοκύστης. Οι αριθμοί της εικόνας αντιστοιχούν στους αριθμούς του παραπάνω κειμένου που τις περιγράφουν[361].

2.7.8 Βαθμολόγιση της έσω κυτταρικής μάζας(ICM)

Η ποιότητα της έσω κυτταρικής μάζας (ICM, inner cell mass) της βλαστοκύστης χαρακτηρίζεται από ένα γράμμα με βάση τα παρακάτω χαρακτηριστικά: (A) η ICM αποτελείται από πολλά κύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, (B) η ICM αποτελείται από αρκετά κύτταρα, αλλά σε χαλαρή σύνδεση μεταξύ τους, (C) η ICM αποτελείται από λίγα κύτταρα. Για τον ταυτόχρονο χαρακτηρισμό του τροφοεξωδέρματος (TE) της εκάστοτε βλαστοκύστης χρησιμοποιείται και ένα δεύτερο γράμμα που εκφράζει την ποιότητά του (**Εικόνες 22, 234**).

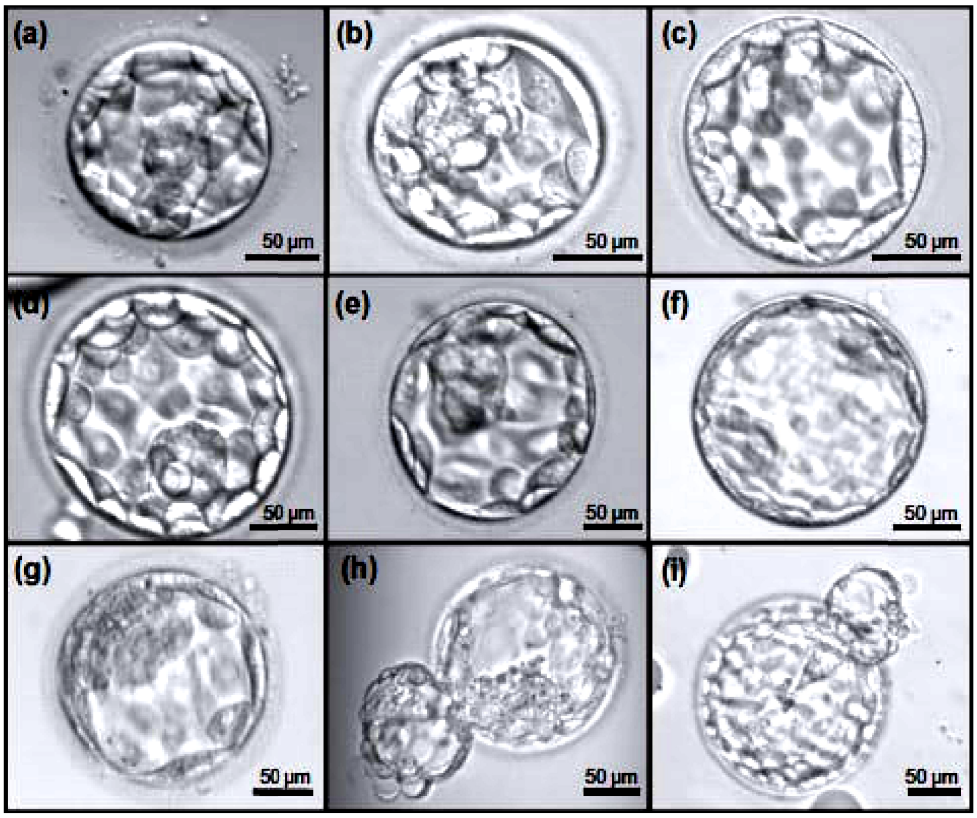


Ποιότητα A: Το TE αποτελείται από πολλά κύτταρα που δημιουργούν ένα συνεχές στρώμα.

Ποιότητα B: Το TE αποτελείται από λίγα κύτταρα που σχηματίζουν ένα χαλαρό επιθήλιο

Ποιότητα C: Το TE αποτελείται από πολύ λίγα και μεγάλα κύτταρα.

Εικόνα 22. Βαθμολόγηση TE. A. Το TE αποτελείται από πολλά κύτταρα που δημιουργούν ένα συνεχές στρώμα. B. Το TE αποτελείται από λίγα κύτταρα που σχηματίζουν ένα χαλαρό επιθήλιο. C. Το TE αποτελείται από πολύ λίγα και μεγάλα κύτταρα[361].



Εικόνα 23. Παραδείγματα ταξινόμησης βλαστοκύστεων. (α) Βλαστοκύστη ποιότητας 3AA. (b) Βλαστοκύστη ποιότητας 3AB. (c) Βλαστοκύστη ποιότητας 3BA. (d) Βλαστοκύστη ποιότητας 4AA. (e) Βλαστοκύστη ποιότητας 4AB. (f) Βλαστοκύστη ποιότητας 4BA. (g) Βλαστοκύστη ποιότητας 4CC. (h) Βλαστοκύστη ποιότητας 5AA. (i) Βλαστοκύστη ποιότητας 5CA[361].

Για τα πειράματα της εν λόγω διατριβής χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα ποιότητας:

- 3AA, 3AB, 3BB
- 4AA, 4AB
- 5AA, 5AB, 5BB, 5AC

Λόγω της έκφρασης ιντεγκρινών στην εξωτερική επιφάνεια της διογκωμένης βλαστοκύστης και τον κρίσιμο ρόλο τους στο να ξεκινήσει η προσκόλληση του εμβρύου στο ενδομήτριο, το κριτήριο για την επιλογή των εμβρύων με την παραπάνω ποιότητα βασιζόταν: α) στο βαθμό επέκτασης της βλαστοκύστης, β) τον υψηλό αριθμό κυττάρων (βαθμού A ή B) της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM), γ) τον υψηλό αριθμό κυττάρων με συνεκτικό επιθήλιο TE (βαθμού A ή B). Τα παραπάνω κριτήρια αντιπροσωπεύουν ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια ποιότητας πριν από τη εμβρυομεταφορά φρέσκων ή κατεψυγμένων εμβρύων.

2.8 Βιοψία εμβρύου

Η βιοψία εμβρύου είναι μια τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που πραγματοποιείται προκειμένου να γίνει προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGD) που αποτελεί μέθοδο ανίχνευσης γενετικών χαρακτηριστικών του ωαρίου πριν από τη γονιμοποίηση, ή του εμβρύου που προκύπτει από εξωσωματική γονιμοποίηση προτού αυτό μεταφερθεί στην κοιλότητα της μήτρας.

Η τεχνική εφαρμόζεται στον άνθρωπο από το 1989. Η αφαίρεση ενός ή δύο κυττάρων του εμβρύου σταδίου 8 κυττάρων, δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του [323,362]. Σήμερα εφαρμόζονται βιοψίες κυτταρικού υλικού σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης: πολικό σωμάτιο (πρώτο και δεύτερο), βλαστομερίδιο (στάδιο 8 κυττάρων) ή μεταγενέστερο (τροφοεξώδερμα βλαστοκύστης).

Η διαδικασία πραγματοποιούνταν σε τριβλίο βιοψίας Nunc™ IVF ICSI Dish (Thermo Scientific) σε μικροσταγόνες όγκου 20 μl καλλιεργητικού μέσου KSIEB (Sydney IVF , COOK) καλυμμένων με ορυκτό έλαιο mineral oil (Ferticult) και ισορροπημένων όλο το βράδυ στους 37ºC και 6% CO_2 σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, σε κάθε μικροσταγόνα τοποθετούνταν από ένα έμβρυο με ελάχιστο χρόνο παραμονής ένα λεπτό και μέγιστο 10 λεπτά. Το επόμενο βήμα πραγματοποιούνταν σε θερμαινόμενη τράπεζα ανεστραμμένου μικροσκοπίου (OLYMPUS IX70), όπου με τη βοήθεια μικροσύριγγας αναρρόφησης και ασκώντας ελάχιστη αρνητική πίεση αέρος, το έμβρυο αναρροφάται και ακινητοποιείται πάνω στην πιπέτα συγκράτησης (K-HPIP-3330, COOK). Ο προσανατολισμός του εμβρύου κατά την ακινητοποίηση και η επιλογή του βλαστομεριδίου έχει καίρια σημασία, ιδιαίτερα για τα έμβρυα σταδίου βλαστοκύστης.

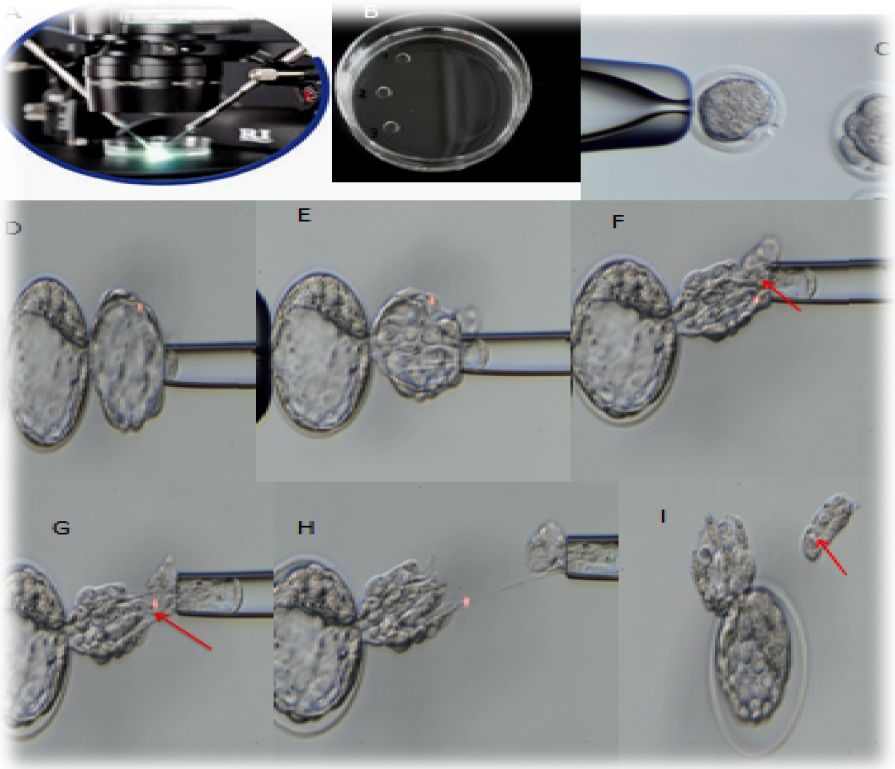
Με τη βοήθεια της πιπέτας συγκράτησης (K-EBPH-3035, COOK), το έμβρυο φέρεται στο βεληνεκές της ακτίνας laser (Saturn 5 active ™, Research Instruments Ltd) και ακτινοβολείται με συχνότητα 1480 nm. Έτσι επιτυγχάνονταν η διάνοιξη σχισμής στη διαφανή ζώνη και η αναρρόφηση ενός βλαστομεριδίου με αποφυγή θερμικής βλάβης στο έμβρυο (**Εικόνα 24**).

Εικόνα 24. Αντεστραμμένο μικροσκόπιο Laser με μικροχειριστήρια για τη διεξαγωγή βιοψίας εμβρύου. Α.,Β. Απεικόνιση μικροσκοπίου OLYMPUS IX70 και εξοπλισμού για τη διεξαγωγή βιοψίας εμβρύων. C. Ακινητοποίηση του εμβρύου με την πιπέτα συγκράτησης (αριστερά) και διάνοιξη της διαφανούς ζώνης με λέιζερ. D.-I. Αναρρόφηση ενός βλαστομεριδίου από έμβρυο με τη χρήση πιπέτας βιοψίας (δεξιά) διαμέσου της οπής της διαφανούς ζώνης.

2.8.1 Βιοψία στο στάδιο βλαστοκύστης

Η βιοψία βλαστοκύστεων πραγματοποιήθηκε με τη **μέθοδο "Pulling"** για τις εκκολαπτόμενες βλαστοκύστεις και με τη μέθοδο "flicking" για τις πλήρως εκκολαπτόμενες βλαστοκύστεις.

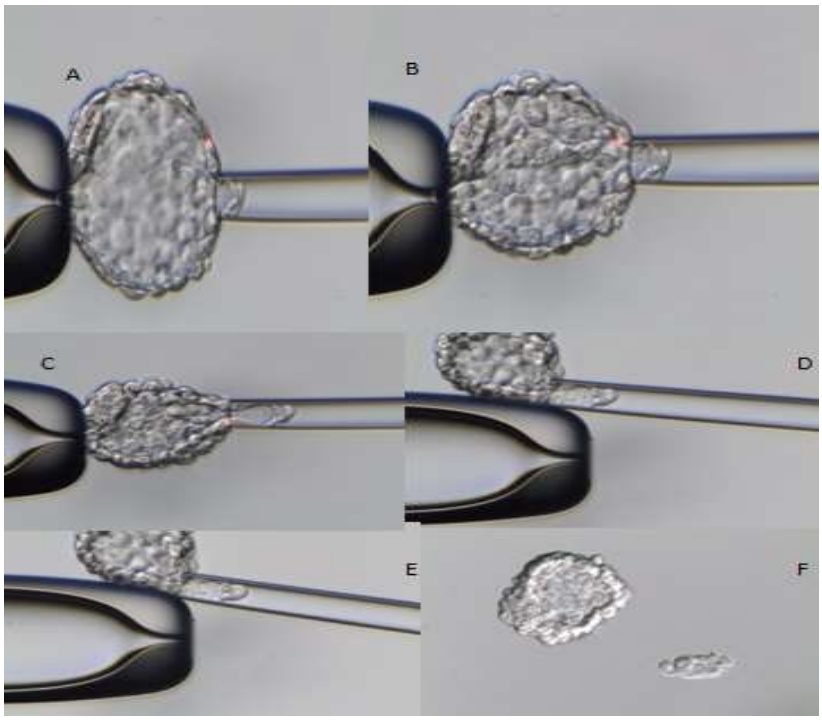
Οι προς βιοψία εκκολαπτόμενη βλαστοκύστες τοποθετούνται στο τριβλίο βιοψίας και μεταφέρονται στο αντεστραμμένο μικροσκόπιο. Ακινητοποιούνται ελαφρά, όπως περιγράφηκε προηγουμένως στη βιοψία εμβρύου, και ακτινοβολούνται ώστε να σχηματιστεί οπή στη διαφανή ζώνη. Προκειμένου να μην τραυματιστούν τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος, η απόσπασή τους πρέπει να επιτευχθεί με λιγότερες από πέντε ριπές λέιζερ. Οι ριπές πρέπει να εφαρμοστούν στα σημεία ένωσης των κυττάρων, ώστε να μπορούν εύκολα να τραβηχτούν μακριά από τη βλαστοκύστη χωρίς να βλάψουν τα κύτταρα της ICM (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25. Βιοψία εκκολαπτόμενης βλαστοκύστης με τη μέθοδο Pulling. A., B. τρίβλιο βιοψίας σε αντεστραμμένο μικροσκόπιο. C. Υποβοηθούμενη εκκόλαψη εμβρύου στο στάδιο του μοριδίου. D., E. Ακινητοποίηση της βλαστοκύστης και ελαφριά αναρρόφηση των κυττάρων ΤΕ. F., G. Αποκοπή των κύτταρων με ακτινοβόληση λέιζερ στο σημείο που δείχνουν τα βέλη. H., I. Τράβηγμα (pulling) των κυττάρων ΤΕ και απελευθέρωσή τους.

Μέθοδος “flicking”

Η μέθοδος “flicking” ή "τίναξης" συνιστάται για πλήρως εκκολαπτόμενες βλαστοκύστεις. Σε αυτή την τεχνική βιοψίας η βλαστοκύστη θα πρέπει να τοποθετηθεί με τρόπο ώστε η ICM να βρίσκεται δίπλα στη πιπέτα συγκράτησης και τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος να βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά. Στη συνέχεια, αναρροφώνται προσεκτικά στην πιπέτα βιοψίας και αμέσως μετά σε ένα άκρο των ΤΕ εφαρμόζεται, μια πρώτη ριπή λέιζερ, που ακολουθείται από δύο ή τρεις, ή και περισσότερες. Ενώ εφαρμόζονται οι ριπές λέιζερ, η βλαστοκύστη χαλαρώνει επιτρέποντας περισσότερα ΤΕ κύτταρα να αποτραβηχτούν μέσα στην πιπέτα βιοψίας. Στη συνέχεια, η χαλαρωμένη βλαστοκύστη απελευθερώνεται απαλά από την πιπέτα συγκράτησης, ενώ το υλικό της βιοψίας απομονώνεται στην πιπέτα βιοψίας. Τα κύτταρα ΤΕ μπορούν στη συνέχεια να αποκολληθούν από τη βλαστοκύστη με γρήγορη κίνηση τινάγματος της πιπέτας βιοψία έναντι της πιπέτας συγκράτησης (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 26. Μεθοδός βιοψίας πλήρως εκκολαπτόμενων βλαστοκύστεων, "flicking". A.-E. ακινητοποίηση της βλαστοκύστης και ελαφριά αναρρόφηση των κυττάρων ΤΕ στην πιπέτα βιοψίας-εφαρμογή ρυπών λέιζερ. C. Σύμπτυξη βλαστοκύστης. D. Απελευθέρωση βλαστοκύστης από την πιπέτα συγκράτησης. E., F. Γρήγορη αποκοπή των κυττάρων του ΤΕ από τη βλαστοκύστη και απελευθέρωση της βλαστοκύστης και του δείγματος.

2.9 Πειράματα ανοσοφθορισμού σε προεμφυτευτικά εμβρύα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η έκφραση των ιντεγκρινών avb3, α5β1, αν, avib, και CE στα ωάρια ποντικών χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ανοσοφθορισμού. Αναλυτικά τα φθορίζοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον εντοπισμό των παραπάνω ιντεγκρινών σε εμβρυικά κύτταρα:

1. Αντι-αvb3 Santa CruzBiotechnology, Inc. (Dallas, Texas, sc-7312)

2. Αντι- α5β1 Chemicon (MAB1969)

3. Αντι-α6β1 Chemicon (MAB1410)

4. Αντι- αν Biolegend (c/s-104105)

5. Αντι- CE Biolegend (c/s-147303)

Όλα τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Για την πυρηνική χρώση, χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχου προπιδίο TOPRO-3 (TOPRO-3, 1:1000 dilution, Molecular Probes, T3605).

Το δευτεροταγές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG ανοσοσφαιρινών του ποντικού συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία (Alexafluor 350, Invitrogen).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τη μονιμοποίηση των ωάριων, ζυγωτών και προεμφυτευτικών εμβρύων (στάδιο των 2 κυττάρων–βλαστοκύστης) με 4% PFA/1% PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν τρεις πλύσεις, με διάλυμα 0,1% BSA/1% PBS (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός), επώαση για 15 λεπτά με διάλυμα 1% PBS/0.1% BSA/0.25% Triton X-100 για δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα 1% PBS/0.1% BSA. Ακολουθούσε επώαση για 35 λεπτά με τα πρωτοταγή αντισώματα (αvb3, α5β1, α6β1) και στη συνέχεια τρεις πλύσεις σε διάλυμα 1% PBS/0.1% BSA. Στις περιπτώσεις που το πρωτοταγές αντίσωμα δεν ήταν φθορίζον ακολουθούσε επώαση για 45 λεπτά με το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο σε τελική συγκέντρωση1 μg/ml και επανάληψη των πλύσεων με 1% PBS/0.1% BSA για την απομάκρυνση περίσσειας αντισώματος. Για τη σήμανση των πυρήνων, τα κύτταρα επώαζονταν για 15 λεπτά σε ιωδιούχο προπίδιο TOPRO-3 σε αραίωση σε1:1000 σε 1% PBS σε σκοτεινό περιβάλλον. Ακολουθούσε έκπλυση των δειγμάτων 3 φορές σε διάλυμα 1% PBS/0,1% BSA και μεταφορά τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα διαλύματος 25% γλυκερόλης. Η παρατήρηση και αξιολόγηση δειγμάτων πραγματοποιούνταν με τις τεχνικές μικροσκοπίας που περιγράφονται παρακάτω.

2.10 Μικροσκόπια φθορισμού

2.10.1 Απεικόνιση με τη μέθοδο γένεσης της τρίτης αρμονικής

Για την απεικόνιση με την μέθοδο γένεσης της τρίτης αρμονικής τα έμβρυα ξεπλύθηκαν σε 0.1% PBS-BSA, μονιμοποιήθηκαν σε 2% PFA/0.05% PBS-BSA (Sigma, 158127) για 15 min, και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0.1% PBS-BSA σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (Marienfeld, πάχους ~70 μm). Η απεικόνιση των εμβρύων με την μέθοδο της γένεσης της τρίτης αρμονικής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (Ηράκλειο, Κρήτη). Η διαδικασία της ανίχνευσης σήματος THG διεξήχθη όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως[363].

Συνοπτικά, ένα femtosecond λέιζερ καθοδηγείται σε ένα τροποποιημένο όρθιο μικροσκόπιο Nikon (Eclipse ME600D) και στη συνέχεια εστιάζεται στο δείγμα μέσω αντικειμενικού φακού (C-Achroplan, Carl Zeiss; 32X, NA 0.85, water immersion). Με τη χρήση ενός φίλτρου στα 340 nm (colour glass filter, Hoya U340) τα σήματα τρίτης αρμονικής ανιχνεύονται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή (PMT Hamamatsu H9305-04). Η μέση ισχύς του λέιζερ στο δείγμα είναι 20 mW (0.4 nJ ανά παλμό). Κάθε δισδιάστατη τομή (500x500 pixels) διαμορφώνεται από τον μέσο όρο 30 σαρώσεων και η κάθε σάρωση καταγράφεται

σε λιγότερο από 1s. Το σήμα του Διφωτονικά Διεγειρόμενου Φθορισμού (TPEF) στα πειράματα συνεντοπισμού καταγράφηκε από δεύτερο φωτοπολλαπλασιαστή (R4220 Hamamatsu) σε άλλη κατεύθυνση επιτρέποντας την ταυτόχρονη χρήση τόσο της γένεσης τρίτης αρμονικής όσο και του διφωτονικά διεγειρόμενου φθορισμού.

Τόσο η επεξεργασία των δεδομένων, όσο και η δημιουργία των τρισδιάστατων απεικονίσεων έγινε μέσω του προγράμματος ImageJ (ImageJ 1.48v, National Institute of Health). Για τα πειράματα σήμανσης των κυτταροπλασματικών μιτοχονδρίων τα έμβρυα ξεπλύθηκαν σε 1% PBS/0.1% BSA, επωάστηκαν με Mitotracker Red (250 nM, CMXRos, Molecular Probes, M-7512) για 30 min στους 37ºC και ξεπλύθηκαν με 0.1% PBS-BSA.

Για τα πειράματα σήμανσης λιπιδιακών σταγόνων στο κυτταρόπλασμα των εμβρύων, αυτά ξεπλύθηκαν σε 1% PBS/0.1% BSA, μονιμοποιήθηκαν σε 1% PBS/0.05% BSA/2% PFA για 15 min, επωάστηκαν σε 1% PBS/025% Triton X-100 (Triton X-100, Sigma, X100) για 15 min και ακολούθησε χρώση με Nile Red (10 μg/ml, Sigma, N3013) για 20 min καθώς και ξέπλυμα με διάλυμα 1% PBS/0.1% BSA.

Σε άλλα πειράματα, τα έμβρυα μετά από χρώση με Nile Red παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS SP2 confocal microscope and LCS software, Leica Microsystems). Στην περίπτωση αυτή, έγινε εγκλεισμός των δειγμάτων σε μέσο μονιμοποίησης (Vectashield, Vector, H-1000).

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, η επεξεργασία και τροποποίηση των εικόνων, όπου χρειάστηκε, πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα ImageJ και Photoshop (version CS6, Adobe).

2.10.2 Ποσοτικοποίηση σήματος μικροσκοπίας

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος της γένεσης τρίτης αρμονικής ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες. Η πρώτη περιελάμβανε τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού των σωματιδίων καθώς και του αντίστοιχου μέσου μεγέθους τους. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ένα κατώτατο όριο των κανονικοποιημένων εικόνων, χρησιμοποιώντας την ίδια τιμή έντασης στα δείγματα (global intensity threshold value). Οι προκύπτουσες εικόνες επεξεργάστηκαν περαιτέρω σε μια προσθήκη του προγράμματος ImageJ (Analyze particles built-in function), ενώ η στατιστική ανάλυση των αποκτηθέντων στοιχείων έγινε μέσω του MATLAB. Η δεύτερη περιλαμβάνει τον υπολογισμό της μέσης έντασης για κάθε δείγμα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας ειδικά σχεδιασμένος αλγόριθμος, προγραμματισμένος σε περιβάλλον MATLAB[363].

3. Αποτελέσματα

3.1 Σύγκριση ποσοστού επιβίωσης εμβρύων σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες. Επίδραση της ωοθηκικής διέγερσης στην επιβίωση των υπό μελέτη εμβρύων.

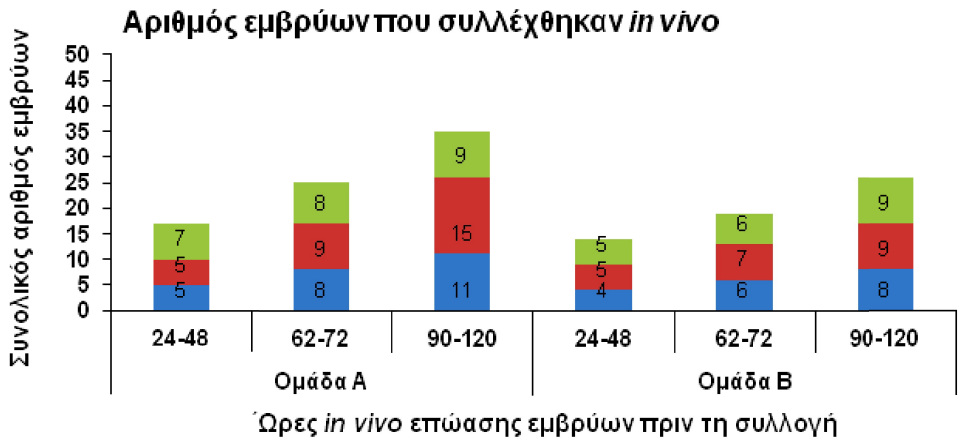
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τη ωοθηκικής διέγερσης στην επιβίωση και επιτυχημένη έκβαση της γονιμοποίησης των υπό μελέτη εμβρύων, συλλέχθηκαν *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα σε διαφορετικές ώρες μετά τη χορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν έμβρυα από τον ωαγωγό 18-20 ώρες μετά τη χορήγηση hCG στο στάδιο του ζυγώτη (ημέρα μηδέν εγκυμοσύνης), 42-44 ώρες μετά στο στάδιο των 2 κυτταρικών διαιρέσεων (ημέρα πρώτη εγκυμοσύνης), 68-72 ώρες μετά στο στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων (ημέρα δεύτερη εγκυμοσύνης) και 92-93 ώρες μετά στο στάδιο της βλαστοκύστης (ημέρα τρίτη εγκυμοσύνης). Η απομόνωση των εμβρύων από την μήτρα ποντικών πραγματοποιήθηκε μετά από επιβεβαίωση της ύπαρξης κολπικού βίσματος. Μελετήθηκαν δύο υποσύνολα ποντικών, η Ομάδα Α αποτελούμενη από θηλυκούς ποντικούς που είχαν υποβληθεί σε φαρμακευτική διέγερση ωοθηκών πριν την συλλογή των εμβρύων και η Ομάδα Β στην οποία η διαδικασία πραγματοποιήθηκε φυσικά χωρίς την πρόκληση ωοθηκικής διέγερσης με εξωτερική παρέμβαση. Συνολικά συλλέχθηκαν 77 ζυγώτες (51 στην Ομάδα Α, 26 στην Ομάδα Β), 63 έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων (37 από την Ομάδα Α, 26 από την Ομάδα Β), 56 έμβρυα 8 κυττάρων (34 από την Ομάδα Α, 22 από την Ομάδα Β), 23 βλαστοκύστες (14 από την Ομάδα Α, 9 από την Ομάδα Β). Οι ακριβείς αριθμοί συλλογής εμφανίζονται στην **Εικόνα 27Α, 27Β**.

Η βιωσιμότητα των εμβρύων στις 24-48 και στις 62-72 ώρες στο εμβρυικό στάδιο των 2-8 κυτταρικών διαιρέσεων προέκυψε από τη συχνότητα ανάπτυξης βιώσιμων εμβρύων με φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά ανάλογα με το ποσοστό κυτταρικών θραυσμάτων που περιείχαν και την ομοιογένεια των βλαστομεριδίων τους. Στη συνέχεια τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν περαιτέρω σε συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας. Στις 90-120 ώρες καλλιέργειας η βιωσιμότητα των εμβρύων καθορίστηκε από το ποσοστό ανάπτυξης βιώσιμων βλαστοκύστεων με φυσιολογική μορφολογία βασισμένη στην εκτίμηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων αλλά και στην ποιότητα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM). Στο **γράφημα 27Γ** απεικονίζεται συγκριτικά ως προς τις ομάδες Α-Β η συχνότητα επιβίωσης τών έμβρυων σε in vitro καλλιέργεια που συλλέχθηκαν in vivo υπό την επίδραση ή μη φαρμακευτικής διέγερσης των ωοθηκών καθώς και ο αριθμός των εμβρύων που έφτασαν στο εμβρυικό στάδιο του μοριδίου και βλαστοκύστης.

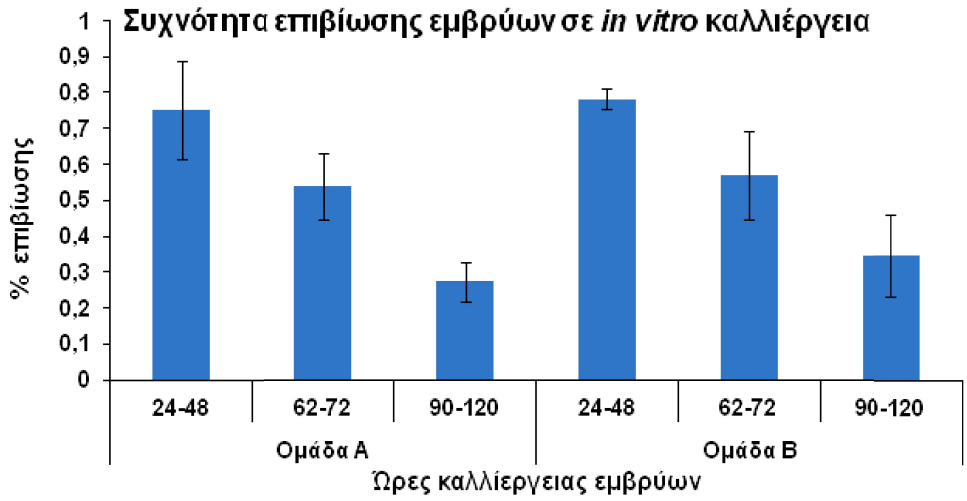
Α.

	ΗΣΕ 0	ΗΣΕ 1	ΗΣΕ 2	ΗΣΕ 3
Εμβρυϊκό στάδιο	2PN/2PB	2 κυττάρων	8 κυττάρων	Βλαστοκύστης
Ομάδα Α	51	37	34	14
Ομάδα Β	26	26	22	9
Σύνολο	77	63	56	23

Β.



Γ.



Εικόνα 27. Α. Πίνακας απεικόνισης του συνολικού αριθμού εμβρύων που συλλέχθηκαν σε *in vivo* συνθήκες σε ομάδες ποντικών με (Ομάδα Α) και χωρίς (Ομάδα Β) ωοθηκική διέγερση. ΗΣΕ: Ημέρα Συλλογής Εμβρύων, 2PN/2PB: έμβρυο σταδίου 2 προπυρήνων με δύο πολικά σωμάτια ενδεικτικού φυσιολογικής ολοκλήρωσης της γονιμοποίησης ενός ωαρίου. Β. Απεικόνιση των ομάδων συλλογής και του αριθμού εμβρύων που συλλέχθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες πειραματικές επαναλήψεις (N=3). Γ.

Συχνότητα επιβίωσης των εμβρύων σε in vitro καλλιέργεια που συλλέχθηκαν *in vivo* υπό την επίδραση ή μη φαρμακευτικής διέγερσης των ωοθηκών των ποντικών από τα οποία προέρχονταν (N=3).

Από τις παρατηρήσεις μας προέκυψε ότι η συχνότητα επιβίωσης στις 24-48 ώρες είναι υψηλότερη και στις δύο ομάδες αφού από τα 31 συνολικά έμβρυα επιβίωσαν τα 24, ενώ η ομάδα Β εμφανίζει υψηλότερη συχνότητα (0,78) από την ομάδα Α (0,75). Παρατηρείται επίσης πως καθώς αυξάνεται ο χρόνος καλλιέργειας των εμβρύων και προχωρεί η ανάπτυξη τους στο επόμενο εμβρυικό στάδιο, το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται εμφανίζοντας χαμηλότερη συχνότητα στην Ομάδα Α (0,54) έναντι της Ομάδας Β (0,57). Εντονότερη μείωση στο ποσοστό επιβίωσης των εμβρύων εμφανίζεται μετά από 90-120 ώρες καλλιέργειας αφού από τα 61 συνολικά έμβρυα επιβίωσαν τα 19 με χαμηλότερη τιμή στην Ομάδα Α 28%(10/35) έναντι 35%(9/26) της Ομάδας Β.

3.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση με και χωρίς ωοθηκική διέγερση

Οι συνολικοί αριθμοί των ζυγωτών η εμβρύων κάθε σταδίου προέκυψαν από εξωσωματική γονιμοποίηση και ακόλουθη *in vitro* καλλιέργεια των εμβρύων. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε έως τρείς φορές και ο αριθμός πειραματόζωων ανά πείραμα κυμαίνονταν από 1έως 3. Στον **πίνακα Α** της **εικόνας 28** απεικονίζεται η εκατοστιαία αναλογία των ώριμων (MII) και ανώριμων (MI) ωαρίων καθώς και των βλαστικών κυστιδίων (GV) που προέκυψαν με (Ομάδα Α) ή χωρίς (Ομάδα Β) προηγούμενη ωοθηκική διέγερση επί του συνόλου των ωαρίων που συλλέχτηκαν. Το ποσοστό των επιτυχώς γονιμοποιημένων ωάριων που παρουσιάζουν 2 προπυρήνες και 2 πολικά (2PN/2PB) σωμάτια προκύπτει από την εκατοστιαία αναλογία των ομαλά γονιμοποιήμενων ωαρίων που 24 ώρες μετά την *in vitro* γονιμοποίηση έχουν υποστεί την πρώτη τους διαίρεση (στάδιο 2 κυττάρων). Τα έμβρυα που συνεχίζουν κανονικά τη διαίρεση τους μελετήθηκαν μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης.

Από τα 88 συνολικά ωάρια που συλλέχθηκαν 14-15 ώρες μετά από την χορήγηση της HCG, τα 76 ήταν ώριμα έχοντας μεταβεί στη μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης (MII), ποσοστό το οποίο αντιστοιχεί στο 86% του συνόλου. Το ποσοστό των ώριμων ωάριων MII εμφανίζει σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες αφού από τα 56 ωάρια που συλλέχθηκαν από την ομάδα των μυών με διέγερση ωοθηκών τα 47 ήταν ώριμα MII (84%), ενώ στην ομάδα απουσίας ωοθηκικής διέγερσης το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 90%. Αξιοσημείωτη διαφορά παρατηρήθηκε επίσης και στο ποσοστό ανώριμων ωάριων (μετάφαση 1ης μειωτικής διαίρεσης-MI, GV) το οποίο ήταν αυξημένο στην Ομάδα Α με διέγερση ωοθηκών (**Εικόνα 28Α**).

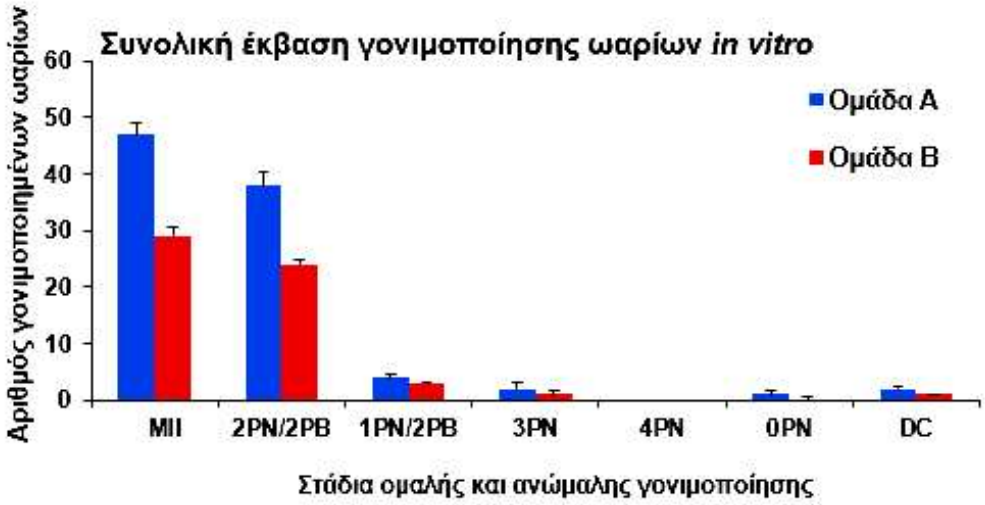
Στα αποτελέσματα που αφορούν στη συνολική έκβαση της γονιμοποίησης (**Εικόνα 28Β**) και τα συγκριτικά ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης (**Εικόνα 28Γ**) μεταξύ των εμβρύων των δύο ομάδων 24

ώρες μετά την *in vitro* γονιμοποίηση παρατηρήθηκε συνολικά υψηλότερο ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης στην Ομάδα μυών Β (2PN/2PB:69%) έναντι της Ομάδας Α (2PN/2PB:64%).

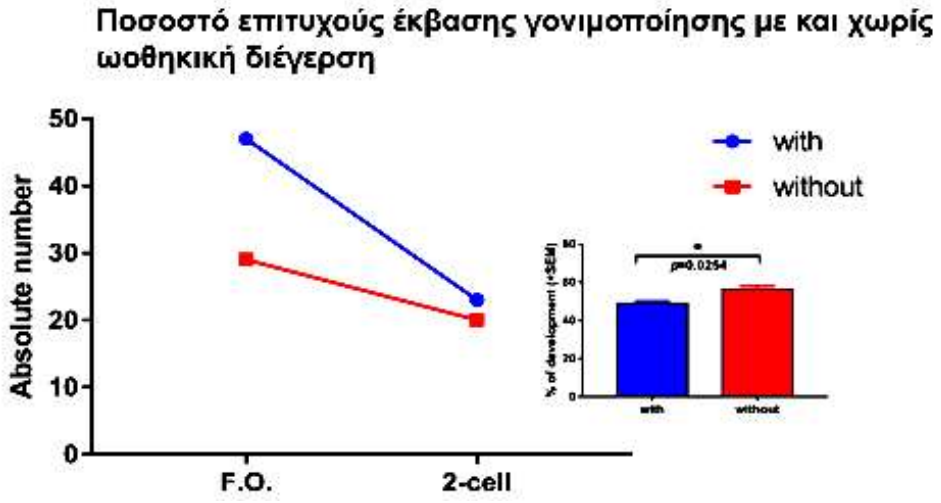
Α.

	Ωάρια	MII	MI	GV	ΚΔΖ
Ομάδα Α	56	47(84%)	5(9%)	3(5%)	1(1,7%)
Ομάδα Β	32	29(90%)	2(6%)	1(3%)	0
Σύνολο	88	76(86%)	7(8%)	4(4%)	1(1,1%)

Β.



Γ.



Εικόνα 28. Α. Πίνακας απεικόνισης του ποσοστού ωαρίων με ομαλή και ανώμαλη ωρίμανση στις ομάδες Α και Β. ΜΙΙ: μετάφαση 2ης μειωτικής διαίρεσης. ΜΙ: μετάφαση 1ης μειωτικής διαίρεσης. GV: βλαστικό κυστίδιο. ΚΔΖ: κενή διαφανής ζώνη. Β. Έκβαση *in vitro* γονιμοποίησης στις δύο ομάδες Α,Β (N=3). ΜΙΙ: μετάφαση 2ης μειωτικής διαίρεσης. PN: Προπυρήνας. PB: Πολικό σωμάτιο. DC: Άμεση αυλάκωση (Direct Cleavage). Γ. Ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης ωάριων (2PN/2PB) προκύπτει από την ανάπτυξη των εμβρύων τα οποία 24 ώρες μετά την in vitro γονιμοποίηση έχουν υποστεί την πρώτη τους διαίρεση (στάδιο 2 κυττάρων).

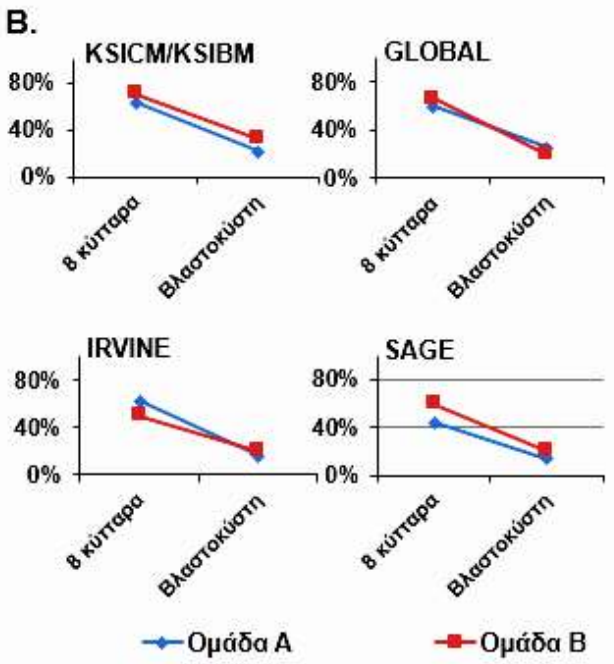
3.3 Επίδραση διαφορετικών συστημάτων καλλιέργειας στην *in vitro* ανάπτυξη εμβρύων με και χωρίς ωοθηκική διέγερση.

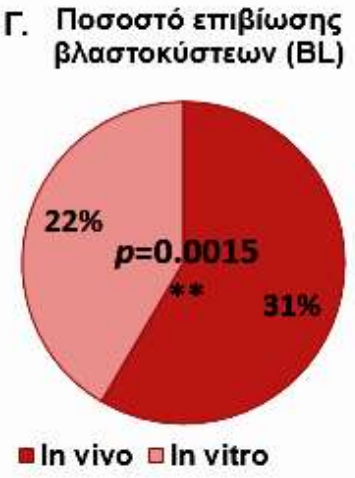
Ομαλά γονιμοποιημένα ωάρια μυών καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε ομάδες 2-3 σε είτε πολυφασικά υγρά (KSICM-KSIBM COOK), ή σε μονοφασικά υγρά (Global total LP, Irvine complete, Sage-1step). Σε πολυφασικά υγρά σταδιακής καλλιέργειας καλλιεργήθηκαν 9 έμβρυα από την ομάδα Α των μυών με διέγερση ωοθηκών και 6 από την ομάδα Β των μυών χωρίς διέγερση. Το ποσοστό των εμβρύων που επιβίωσε και πέρασε στο στάδιο των 8 κυττάρων ήταν μεγαλύτερο στην Ομάδα Β (71%) έναντι της ομάδας Α (63.6%). Η ποιότητα των εμβρύων που προέκυψαν ήταν υψηλότερη στην Ομάδα Β (**Εικόνα 29Α**), ενώ το ποσοστό ανάπτυξης των εμβρύων στο τελικό εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης συνέχισε να είναι υψηλότερο στην ομάδα Β (33% έναντι 22% της Ομάδας Α). Με το σύστημα μεμονωμένης καλλιέργειας σε μονοφασικά υγρά καλλιεργήθηκαν συνολικά 21 έμβρυα από την πρώτη ομάδα και 15 από την δεύτερη (8 -5 στο Global total LP, 6-5 στο Irvine complete,7-4 στο Sage-1step). Το ποσοστό διαίρεσης στην πρώτη ομάδα ήταν υψηλότερο όταν χρησιμοποιήθηκε ως υγρό καλλιέργειας το Irvine complete, ενώ η καλλιέργεια των εμβρύων στα υπόλοιπα δύο υγρά ευνόησε την Ομάδα Β των εμβρύων. Αντίστοιχα επηρεάστηκε και η ποιότητα των εμβρύων που προέκυψε από την κάθε συνθήκη καθώς και η επιτυχής διαίρεση τους μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης **(Εικόνα 29Α, 29Β)**.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν με ένα δεύτερο τρόπο μετρήσεων τα παραπάνω αποτελέσματα που δείχνουν την απουσία ωοθηκικής διέγερσης να ευνοεί την ανάπτυξη των εμβρύων, συγκεντρώθηκαν έμβρυα που διαιρεθήκαν *in vivo* μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων (ημέρα 2 μετά τη γονιμοποίηση) και έμβρυα των οποίων η γονιμοποίηση και περαιτέρω διαίρεση πραγματοποιήθηκε *in vitro*. Συγκεκριμένα συλλεχθήκαν συνολικά 61 έμβρυα *in vivo* 50 *in vitro* από τα οποία αναπτυχτήκαν συνολικά 19 και 11 βλαστοκύστες αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το ποσοστό επιβίωσης ήταν υψηλότερο (31%) στην περίπτωση των *in vivo* διαιρεμένων εμβρύων συγκριτικά με τα in vitro διαιρεμένα έμβρυα (22%) καταδεικνύοντας την αναγκαιότητα βελτιστοποίησης των *in vitro* συνθηκών καλλιέργειας των εμβρύων.

A.

	2 κυττάρων		8 κυττάρων		Ποιότητα		Βλαστοκύστες (BL)		Ποιότητα (BL)	
	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Α	Ομάδα Β
KSICM/KSIBM	9	6	7(63,6%)	5(71%)	6(I-II), 1(IV)	3(I) 2(III)	2 (22%)	3(33%)	1(2AA) 1(1AB)	2(1AA) 1(2AA)
Global total LP	8	5	6 (60%	4(66%)	5(I-II) 1(III)	4(I-II)	2(25%)	1(20%)	1(1AA) 1(3AA)	1(2AB)
Irvine complete	6	5	5(62,5%)	3(50%)	4(I-II) 1(III)	2(I-II) 1(III)	1(16%)	1(20%)	1(1BA)	1(3AA)
Sage-1step	7	4	4(44%)	3(60%)	4(I-II)	3(I-II)	1(14%)	1(20%)	1(1AB)	1BA
Σύνολο	30	20	22(58%)	15(63%)			6(20%)	5(25%)		



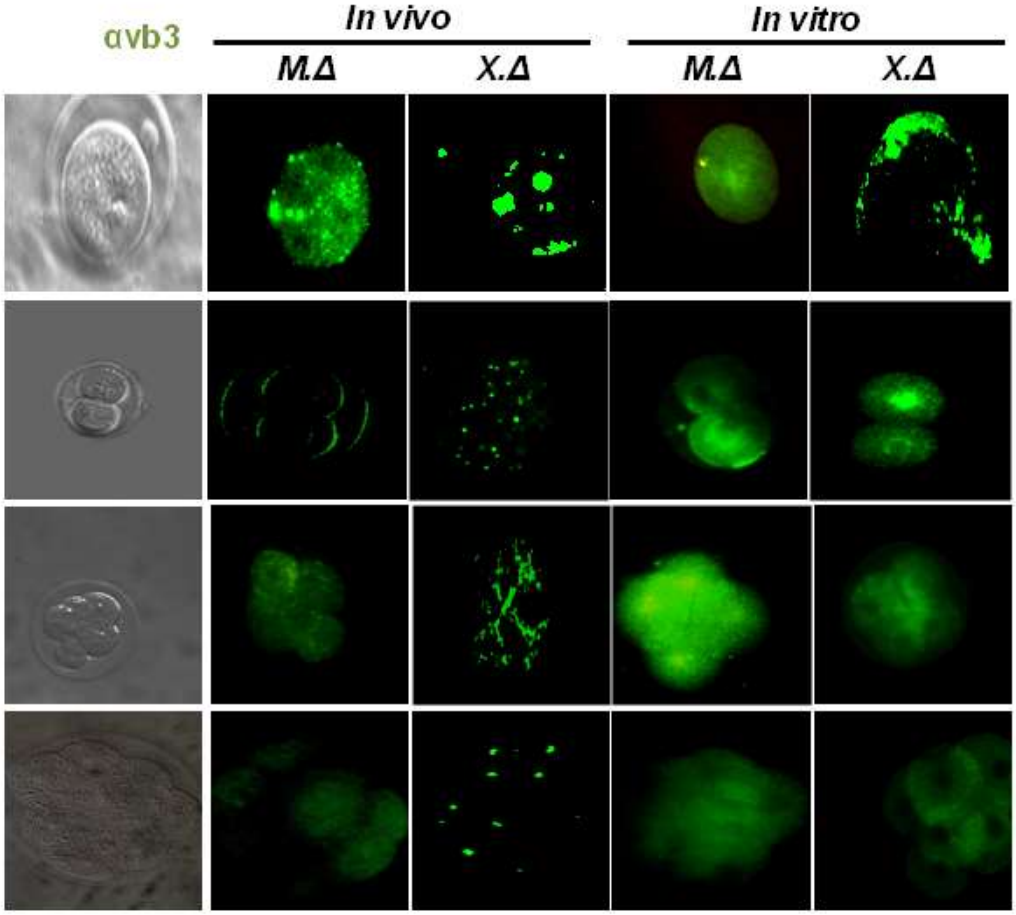


Εικόνα 29. Α. Πίνακας απεικόνισης του ρυθμού εξέλιξης εμβρύων *in vitro* στις ομάδες με (Ομάδα Α) και χωρίς ωοθηκική διέγερση (Ομάδα Β). Εικονιζόμενες ποιότητες βλαστοκύστεων: πρώιμη βλαστοκύστη (AA,AB,BA),επεκτεινόμενη βλαστοκύστη (AA), πλήρης βλαστοκύστη (AA). Β. Συγκριτικό γράφημα του ποσοστού διαίρεσης και ανάπτυξης σε βλαστοκύστες των υπό μελέτη εμβρύων σε συνθήκες σταδιακής και μεμονωμένης καλλιέργειας. Η συλλογή εμβρύων προς καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα (N=3). Γ. Συγκριτικό γράφημα του ποσοστού επιβίωσης και ανάπτυξης σε βλαστοκύστες μετά από in vivo και in vitro καλλιέργεια εμβρύων προερχόμενων από ποντικούς χωρίς ωοθηκική διέγερση(N=3).

3.4 Έκφραση των μορίων συνάφειας

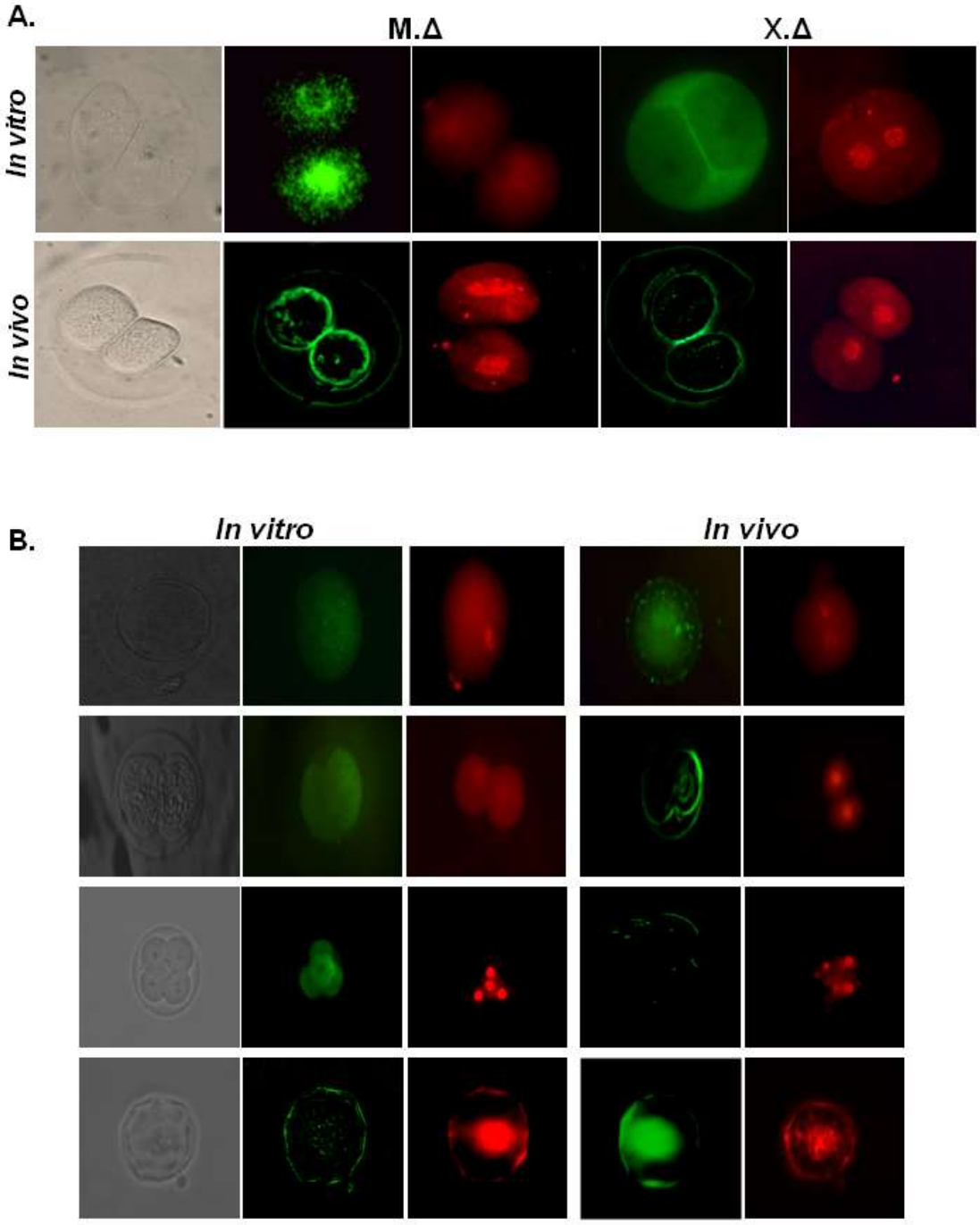
Στην προσπάθειά μας να ερευνήσουμε τον ρόλο της έκφρασης των μορίων συνάφειας συμπεριλαμβανομένων των υπομονάδων ιντεγκρινών αvb3, α5b1, α6b, αv, CE στο ρυθμό εξέλιξής και ανάπτυξης των εμβρύων μετά από διέγερση ωοθηκών, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα μελετήσαμε και συγκρίναμε την έκφραση των παραπάνω μορίων στα *in vivo* και *in vitro* αναπτυσσόμενα προεμφυτευτικά έμβρυα ποντικού ανά στάδιο εξέλιξης.

Η έκφραση της αvb3, ανιχνεύτηκε σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια μέχρι την βλαστοκύστη τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Ωστόσο, η ένταση και η πόλωση της έκφρασης διέφεραν στις δύο περιπτώσεις. Έτσι, τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα εμφάνισαν χαμηλότερη, αλλά περισσότερο πολωμένη ένταση χρώσης σε σύγκριση με τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης που εξετάστηκαν. Επιπλέον η ωοθηκική διέγερση έδειξε να μειώνει την έκφραση της ίδιας ιντεγκρίνης (**Εικόνα 30**).



Εικόνα 30. Έκφραση της αvb3 (πράσινο), με (Μ.Δ) ή χωρίς (Χ.Δ) ωοθηκική διέγερση σε *in vitro* και *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα δημιουργήθηκαν 18 έως 96 ώρες μετά τη χορήγηση hCG στον ωαγωγό ή στη μήτρα ποντικών θετικών στην ύπαρξη κολπικού βίσματος. Τα αναπτυσσόμενα *in vitro* έμβρυα προέκυψαν από *in vitro* καλλιέργειες *in vivo* απομονωμένων ζυγωτών ή IVF ζυγωτών. Η χρώση των εμβρύων περιγράφεται αναλυτικά στις παρατιθέμενες μεθόδους. Η χρώση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον 5 έμβρυα ανά αναπτυξιακό στάδιο. Εμφανίζονται μόνο αντιπροσωπευτικά έμβρυα σε μεγέθυνση 40Χ/10Χ.

Η ιντεγκρίνη a5b1, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη εμβρύου προκειμένου να εξασφαλιστεί η καθοδήγηση συνάθροισης της εξωκυττάριας ύλης, αποδείχθηκε ότι εκφράζεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα στα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα μέχρι το στάδιο του μοριδίου, ενώ παρουσιάζει υψηλή και καλά οργανωμένη έκφραση στο στάδιο της βλαστοκύστης (**Εικόνα 31Α**). Αντίθετα, τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της ιντεγκρίνης a5b1 από τα αρχικά ακόμα στάδια της ανάπτυξής τους. Η ιντεγκρίνη α6β1 είναι ο κύριος υποδοχέας για τις αγγειακές λαμινίνες και παίζει ρόλο στην προσκόλληση, την ενεργοποίηση και εξάπλωση των αιμοπεταλίων. Πειραματικά έδειξε μια καλά οργανωμένη έκφραση στο τροφοεκτοδέρμα στις *in vivo* αναπτυσσόμενες καλλιέργειες, ενώ η αντίστοιχη έκφραση στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ήταν μια διάχυτη και χαμηλής έντασης. Αντιθέτως τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα δεν εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης (**Εικόνα 31Β**).

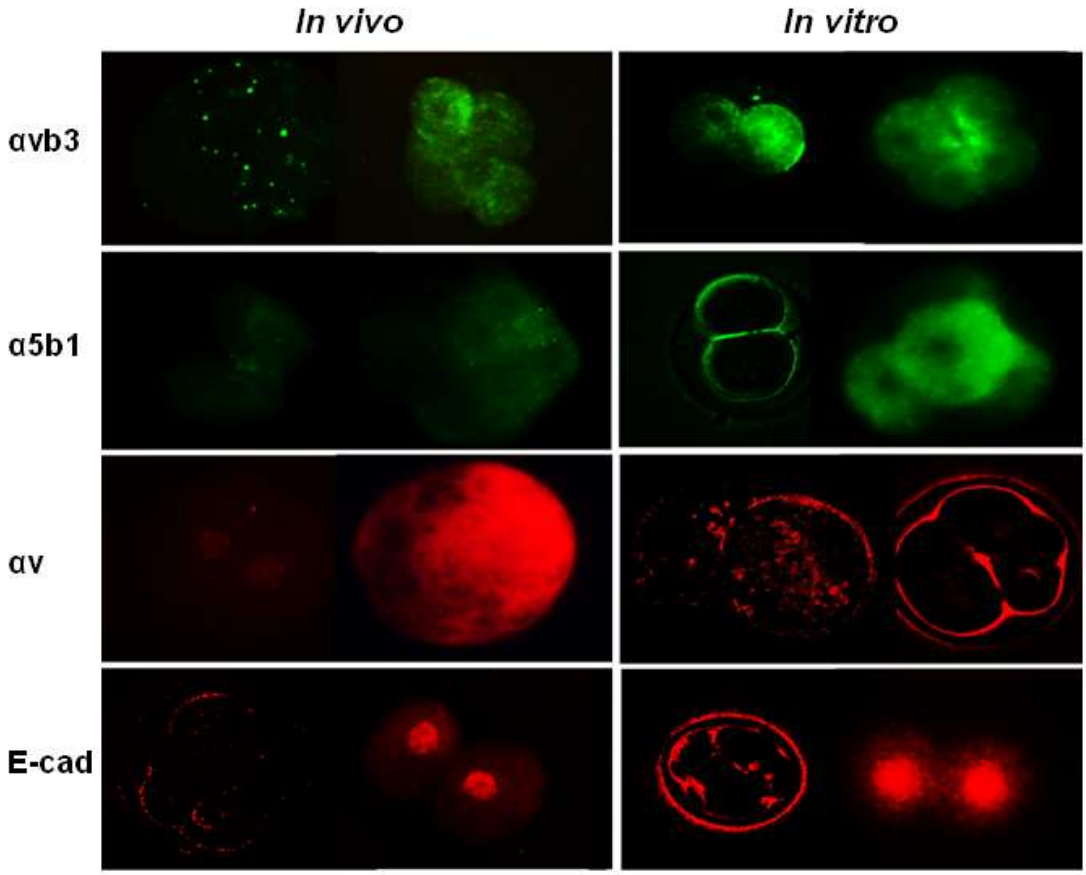


Εικόνα 31. Α. Έκφραση της α5β1 (πράσινο) με (Μ.Δ) ή χωρίς (Χ.Δ) διέγερση ωοθηκών σε *in vitro* και *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα στο εμβρυικό στάδιο των δύο κυτταρικών διαιρέσεων. Χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχου προπίδιο (TOPRO-3) για την πυρηνική χρώση (κόκκινο). Β. Έκφραση της α6β1 (πράσινο) ιντεγκρίνης σε *in vitro* και *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο προπίδιο (TOPRO-3) για την πυρηνική χρώση (κόκκινο).

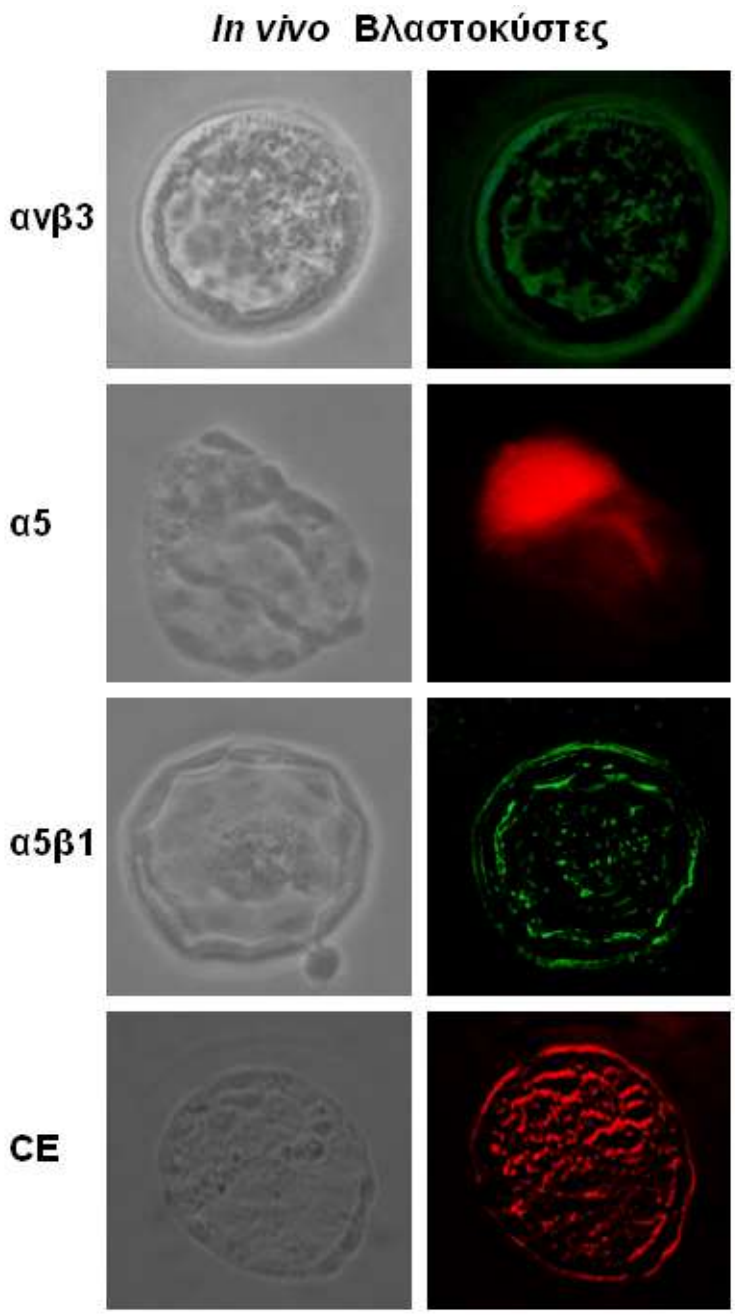
Η έκφραση της υπομονάδας ιντεγκρίνης αν, απαραίτητης για την αγγειογένεση, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα, σε αντίθεση με τα *in vivo* έμβρυα, ενώ εντοπίστηκε στην

εξωτερική μεμβράνη του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Η σχετική χρώση στα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα ήταν διάχυτη σε όλα τα προ-εμφυτευτικά εμβρυϊκά στάδια, αλλά ισχυρή στο στάδιο της βλαστοκύστης (**Εικόνα 32, 33**).

Τέλος, η Ε-καντερίνη (σημαντική στην επιθηλιοποίηση του πρώιμου εμβρύου ποντικού), εκφράστηκε ειδικά μετά το στάδιο 8-κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης στα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Αυξημένο, αλλά παρόμοιο πρότυπο έκφρασης εμφάνισαν και τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα (**Εικόνα 32, 33**).



Εικόνα 32. Έκφραση των ιντεγκρινών αvb3, α5b1, a5 και E-cad σε *in vitro* και *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Σε ορισμένες περιπτώσεις (*in vitro* και e-cad *in vitro* και *in vivo*) χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο προπίδιο TOPRO-3 (κόκκινο) για την πυρηνική χρώση. Έγινε χρώση σε τουλάχιστον 5 έμβρυα για κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Εμφανίζονται μόνο αντιπροσωπευτικά έμβρυα. Μεγέθυνση 40X/10X.



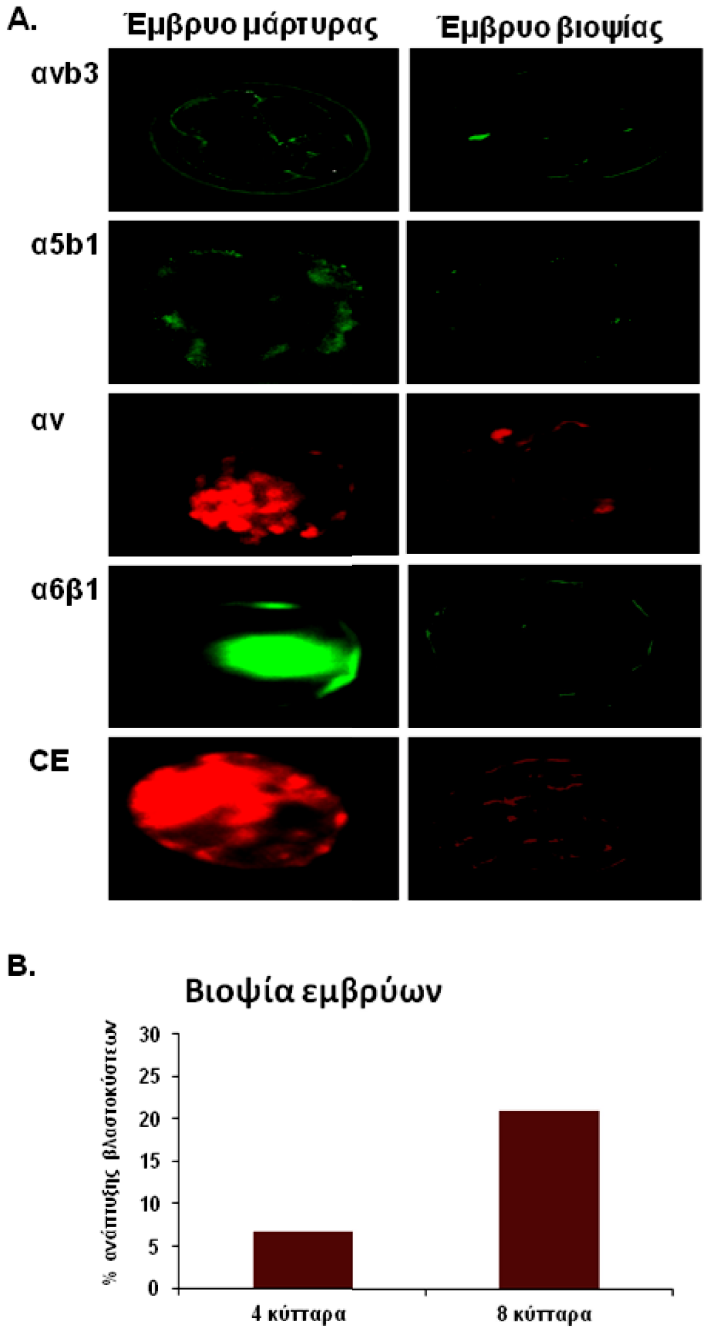
Εικόνα 33. Έκφραση των avb3 (πράσινο), α5b1 (πράσινο), a5 (κόκκινο) υπομονάδων και e-cad (κόκκινο) σε *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα απομονωμένα 96 ώρες μετά τη χορήγηση hCG στην μήτρα των υπό μελέτη ποντικών.

3.5 Βιοψία εμβρύων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της βιοψίας των εμβρύων στην έκφραση των μορίων συνάφειας, συμπεριλαμβανομένων των αvb3, α5b1, α6b1, αv, CE, αναπτυσσόμενα προεμφυτευτικά έμβρυα σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας υποβλήθηκαν σε βιοψία την 2 ή 3 ημέρα στο εμβρυικό στάδιο των 4-8

κυττάρων με αφαίρεση ενός ή δύο βλαστομεριδίων. Η βιοψία εμβρύων αποτελεί τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που πραγματοποιείται προκειμένου να γίνει προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGD). Συνολικά μελετήθηκαν 44 προεμφυτευτικά έμβρυα σε τρία ανεξάρτητα πειράματα (N=3). Υποβλήθηκαν σε βιοψία 15 έμβρυα στο εμβρυικό στάδιο των τεσσάρων κυτταρικών διαιρέσεων και 24 στο εμβρυικό στάδιο των οκτώ κυτταρικών διαιρέσεων. Ο ρυθμός ανάπτυξης και το ποσοστό επιβίωσης μετά από την βιοψία ήταν υψηλότερα στην ομάδα των εμβρύων πού έγινε η βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων (20,8%) με αφαίρεση ενός βλαστομεριδίου έναντι του 6,6% της ομάδας των εμβρύων στην οποία η βιοψία πραγματοποιήθηκε στο εμβρυικό στάδιο των 4 κυτταρικών διαιρέσεων (**Εικόνα 34B**). Συγκεκριμένα, στην ομάδα των εμβρύων που έγινε η βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 4 κυτταρικών από τα 15 συνολικά έμβρυα αναπτύχθηκε 1 σε βλαστοκύστη, ενώ στην ομάδα των εμβρύων πού πραγματοποιήθηκε βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων αναπτύχτηκαν συνολικά 5 βλαστοκύστες από 24 αρχικά έμβρυα.

Η έκφραση των υπομονάδων ιντεγκρινών αvb3, α5b1, στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα 8 ώρες μετά από βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων έδειξε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων αvb3, α5b1 σε αντίθεση με το έμβρυο μάρτυρα που παρουσιάζει υψηλή και καλά οργανωμένη έκφραση των αντίστοιχων ιντεγκρινικών υπομονάδων **(Εικόνα 34A)**. Η έκφραση των υπομονάδων α6b1, αv, ce στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα 24 ώρες μετά από την βιοψία στο εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης έδειξε χαμηλής έντασης έκφραση στο τροφοεκτοδέρμα συγκριτικά με την υψηλή και καλά οργανωμένη έκφραση στο έμβρυο μάρτυρα **(Εικόνα 34A)**.



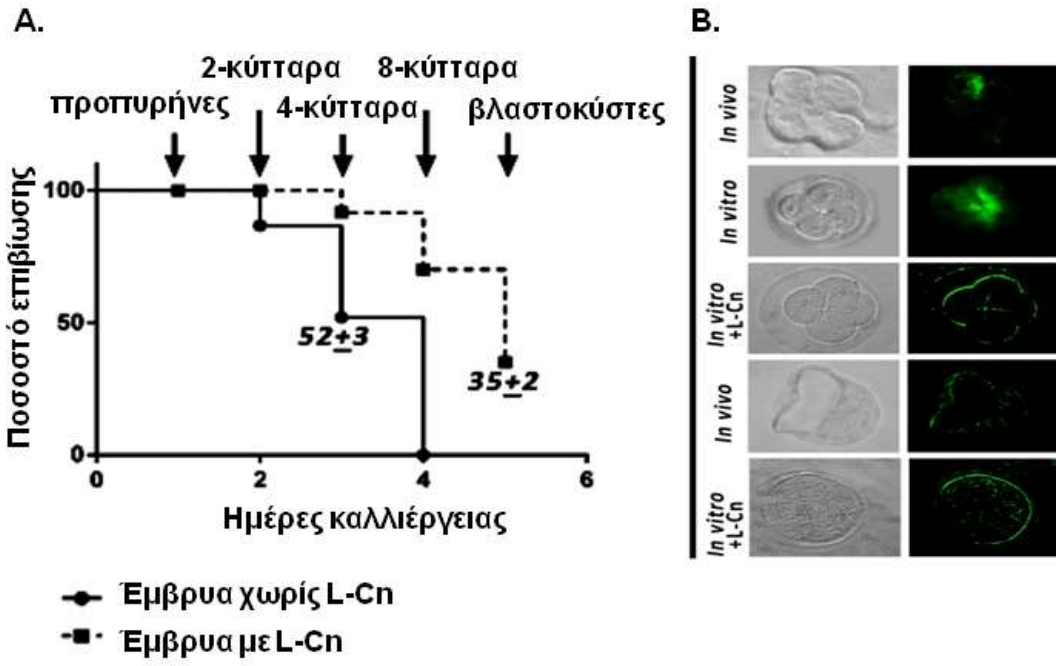
Εικόνα 34. Α. Η έκφραση των μορίων συνάφειας αvb3, α5b1, α6b, αv, CE. σε *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα 8 με 24 ώρες μετά από βιοψία. Β. Ποσοστό ανάπτυξης βλαστοκύστεων μετά από βιοψία εμβρύων. Συνολικά Υποβλήθηκαν σε βιοψία 15 έμβρυα στο εμβρυικό στάδιο των τεσσάρων κυτταρικών διαιρέσεων και 24 στο εμβρυικό στάδιο των οκτώ κυτταρικών διαιρέσεων.

3.6 Επίδραση της L-Καρνιτίνης (L-Cn) στην ανάπτυξη προ-εμφυτευτικών εμβρύων *in vitro*

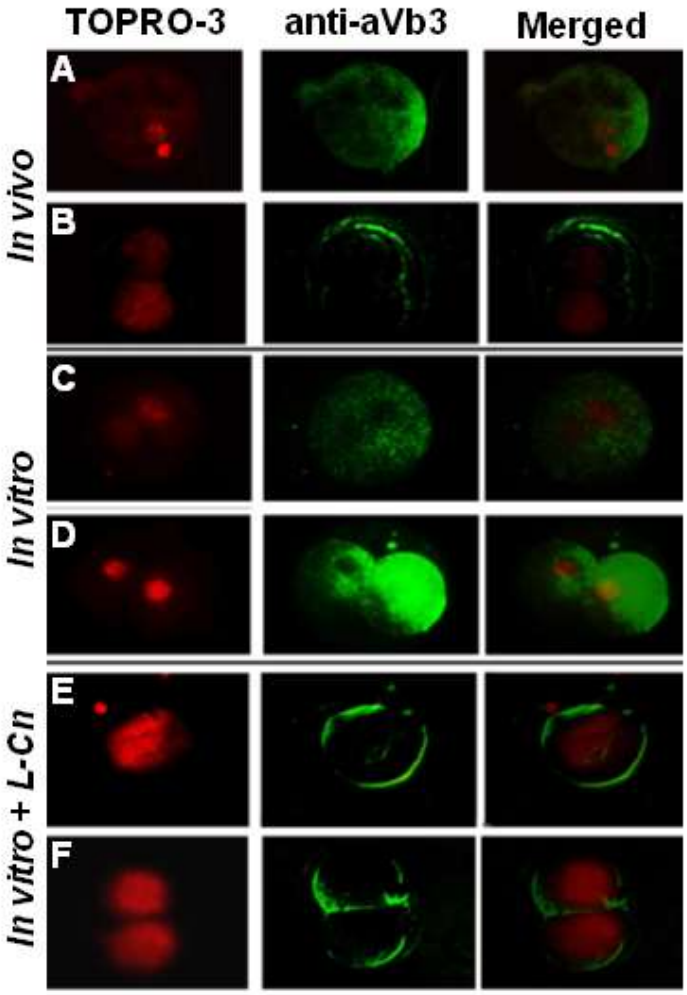
Προκειμένου να εκτιμηθεί εάν η L-Καρνιτίνη (L-Cn) θα μπορούσε να βελτιώσει την επιβίωση και την έκφραση ιντεγκρίνης στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα συγκριτικά με τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα, προστέθηκε L-Cn στο μέσο εμβρυϊκής καλλιέργειας για τη μετάβαση στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο και αξιολογήθηκε: α) ο ρυθμός ανάπτυξης, β) το ποσοστό επιβίωσης των εμβρύων, γ) η έκφραση της ιντεγκρίνης και δ) η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού TGF-β.

Ομαλά γονιμοποιημένα ωάρια μυών καλλιεργήθηκαν *in vitro* μέχρι το εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης. Τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν σε ομάδες 2-3 σε πολυφασικά υγρά (KSICM-KSIBM COOK), ή σε μονοφασικά υγρά (Global total LP) παρουσίας ή μη L-Cn. Στις καλλιέργειες κοντρόλ στο μονοφασικό καλλιεργητικό μέσο "Global" το ποσοστό επιβίωσης ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με το πολυφασικό μέσο "COOK". Έτσι, το 67% των εμβρύων έφτασε στο στάδιο των 8 κυττάρων στο καλλιεργητικό μέσο «Global», ενώ μόνο το 52% του εμβρύου έφτασε στο στάδιο των 4 κυττάρων στο καλλιεργητικό μέσο «COOK». Παρουσία L-Cn, το 35% των εμβρύων έφτασε στο στάδιο της βλαστοκύστης όταν καλλιεργήθηκε στο καλλιεργητικό μέσο «Cook» ($p < 0,05$), ενώ μόνο το 17% των εμβρύων (p = μη σημαντικό) έφτασε στο επίπεδο της βλαστοκύστης όταν καλλιεργήθηκε στο καλλιεργητικό μέσο «Global» (**Εικόνα 35Α).**

Προκειμένου να αξιολογηθεί εάν η έκφραση της ιντεγκρίνης μεταβάλλεται με την παρουσία της L-Cn, τα έμβρυα που καλλιεργήθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο "COOK" υποβλήθηκαν σε πειράματα ανοσοφθορισμού 24 ώρες μετά την προσθήκη L-Cn. Εστιάζοντας στην ανβ3, α5β1, αν και ε-καντερίνη, αποδείχθηκε ότι γενικώς υπήρχε μια καλά οργανωμένη χρώση, ενώ τα αντίστοιχα έμβρυα ήταν καλύτερης ποιότητας και πλησίαζαν στην *in vivo* εμβρυϊκή συμπεριφορά ανάπτυξης (**Εικόνα 35Β, Εικόνα 36**).

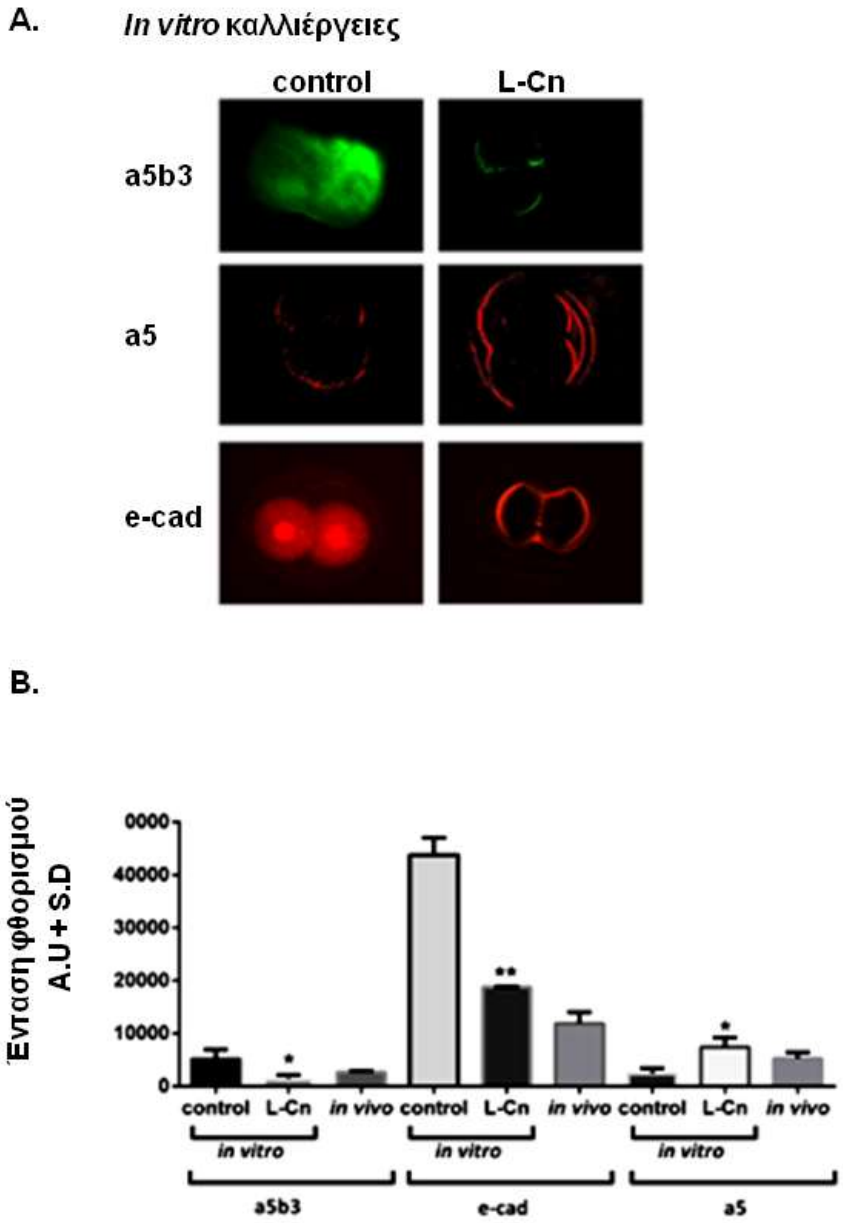


Εικόνα 35. Α. Ανάπτυξη προεμφυτευτικών εμβρύων/ποσοστό επιβίωσης παρουσία ή μη της L-Cn, στο καλλιεργητικό μέσο "COOK". Τριάντα έμβρυα μελετήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Β. Χαρακτηριστικά aVb3 χρώσης σε έμβρυα που αναπτύχθηκαν *in vitro* και *in vivo* στο εμβρυικό στάδιο 4-κυττάρων, 8-κυττάρων και βλαστοκύστεων παρουσία ή μη L-Cn. Μεγέθυνση 40Χ.



Εικόνα 36: Έκφραση της aVb3 σε έμβρυα που αναπτύχθηκαν *in vivo* (A, B) και *in vitro* (C, D) με (E, F) ή χωρίς L-C. Τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα δημιουργήθηκαν 18 και 44 ώρες μετά τη χορήγηση hCG στον ωαγωγό ποντικών, ενώ τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα δημιουργήθηκαν από *in vitro* καλλιέργειες ζυγωτών προερχόμενων από IVF. Το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού των εμβρύων περιγράφεται στις μεθόδους. Οι πυρήνες προδιορίστηκαν με την χρώση TOPRO-3 (κόκκινο). Πραγματοποιήθηκε χρώση σε τουλάχιστον 5 έμβρυα για κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Εμφανίζονται μόνο αντιπροσωπευτικά έμβρυα. Μεγέθυνση 40 X.

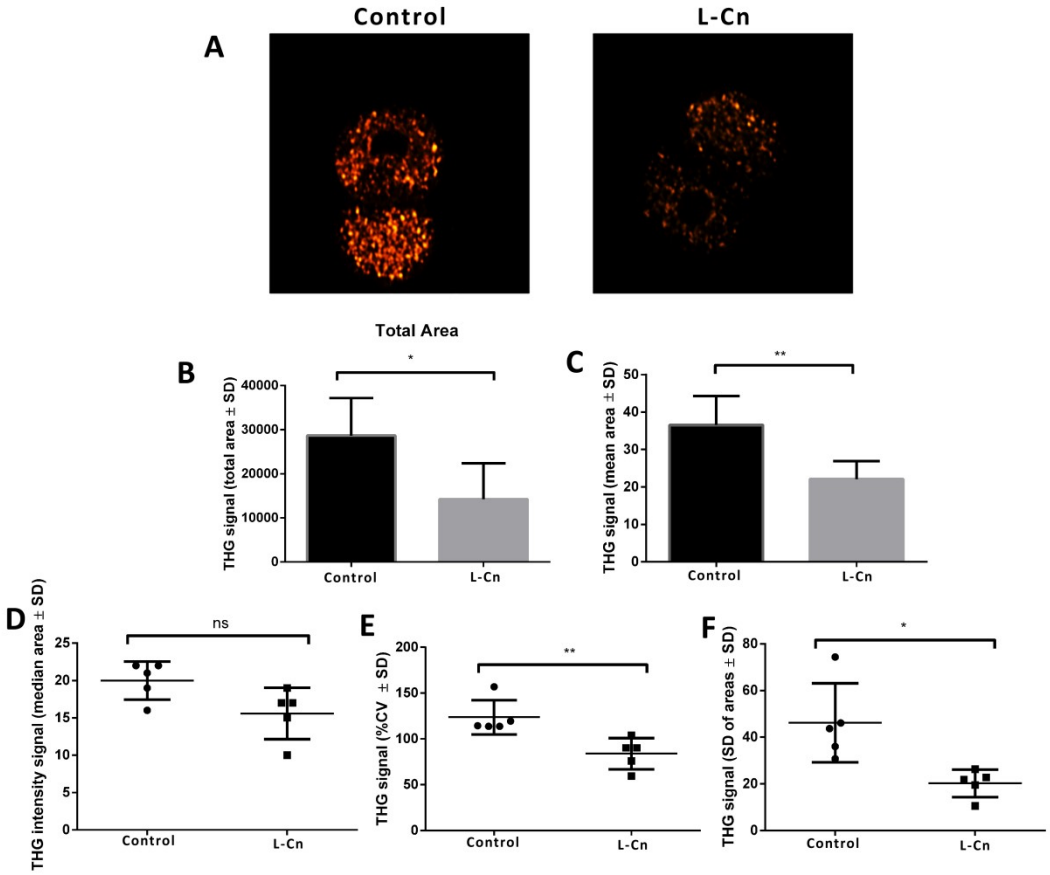
Η ποσοτικοποίηση της έντασης στα πειράματα ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού ανάλυσης εικόνων και έδειξε ότι αν και η L-Cn μειώνει στατιστικώς σημαντικά κατά 71% και 57% (p= 0,0185, p= 0,0019) αντίστοιχα την ένταση της έκφρασης της a5b3 και e-cadherin στο εμβρυϊκό στάδιο 2 κυτταρικών διαιρέσεων, αυξάνει εν αντιθέσει κατά 205% (p = 0,0134) την έκφραση της α5, η οποία σε όλες τις περιπτώσεις εντοπίστηκε συγκεντρωμένη στην κυτταρική μεμβράνη (**Εικόνα 37**).



Εικονα 37. Α. Έκφραση α5b3, a5 και e-cad κατά την *in vitro* ανάπτυξη εμβρύων παρουσία ή μη L-Cn (control). Οι ζυγώτες που παρήχθησαν από IVF καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία L-Cn πριν το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού. Η ένταση της χρώσης (φωτεινότητα) προσδιορίστηκε ποσοτικά χρησιμοποιώντας λογισμικό ανάλυση εικόνας (ImageJ) και (Β) εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες (A.U) ± SD. Τριάντα έμβρυα εξετάστηκαν σε κάθε περίπτωση. Μεγέθυνση 40X/10X. *p <0,01, **p <0,005.

Η ποιότητα του εμβρύου αξιολογήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας απεικόνιση THG (**Εικόνα 38**), η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορεί να ανιχνεύσει ενδοκυτταρικά λιποκυστίδια τα οποία αντιπροσωπεύουν σε μεγάλο βαθμό την ενεργητική δυναμική του εμβρύου. Πράγματι, η προσθήκη της L-Cn προκάλεσε μείωση του μεγέθους των λιποκυστιδίων σε σχέση με τα έμβρυα μάρτυρες (κοντρόλ-control) τα οποία αντιπροσωπεύουν σε μεγάλο βαθμό την ενεργειακή δυναμική του εμβρύου. Πράγματι,

παρουσία της L-καρνιτίνης τόσο η μέση επιφάνεια (**Εικόνα 38C**) όσο και η συνολική επιφάνεια (**Εικόνα 38B**) των λιποκυστιδίων μειώθηκαν κατά 39.5% (*p*=0,0075) και 50.3% αντίστοιχα .Επομένως, η *in vitro* παρουσία της L-καρνιτίνης επηρεάζει την ανάπτυξη των εμβρύων πιθανώς επιδρώντας στη σύσταση τους σε λιποκυστίδια, και κατ' επέκταση μειώνοντας την THG σηματοδότηση. Αν και το μέσο THG σήμα δεν ήταν διαφορετικό σε σχέση με τα κοντρόλ και τα έμβρυα που είχαν επωαστεί με L-Cn (**Εικόνα 38D**), ο συντελεστής μεταβολής CV (**Εικόνα 38E**) και η τυπική απόκλιση των περιοχών SD (**Εικόνα 38E**) μειώθηκαν σημαντικά κατά 32% (p= 0,0074) και 55% (p= 0,0118) παρουσία L-Cn στα έμβρυα. Μια τέτοια μείωση αντικατοπτρίζει την πόλωση σήματος, η οποία έχει αποδειχθεί προηγουμένως ότι συσχετίζεται με την επικείμενη κυτταρική διαίρεση.



Εικονα 38. *In vitro* επίδραση του L-Cn στην ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου. Οι ζυγώτες επωάστηκαν με 400 μM L-Cn για 24 ώρες στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 και επεξεργάστηκαν σε απεικόνιση THG A. ακολουθούμενη από ανάλυση της συνολικής περιοχής σήματος, B. της μέσης περιοχής, C,D. του συντελεστή μεταβολής CV, E. και της τυπικής απόκλισης των περιοχών (SD) οι οποίες υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 5 πειραμάτων (± SD). Προσέγγιση μεγέθους 32X. *p <0,01, **p <0,005.

4. Συζήτηση

Παρά τις βελτιώσεις της τεχνολογίας και της τεχνογνωσίας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στον άνθρωπο, τα ποσοστά εγκυμοσύνης παραμένουν χαμηλά. Πιθανές αιτίες είναι η ανισορροπία αλληλεπίδρασης εμβρύου και μήτρας μετά από διέγερση των ωοθηκών αλλά και η οικονομική, σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση που δημιουργείται στο εκάστοτε ζευγάρι.

4.1 Επίδραση της διέγερσης των ωοθηκών στην ποιότητα ωαρίων και στο ρυθμό εξέλιξης των εμβρύων

Η φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία απαιτεί την ακριβή χρονική και ποσοτική ρύθμιση της έκκρισης των ορμονών σε όλα τα επίπεδα του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Το ορμονικό περιβάλλον των ωοθηκών στο οποίο αναπτύσσεται και ωριμάζει το προ-ωορρηξικό ωάριο σε έναν φυσικό ή ελεγχόμενο κύκλο ωορρηξίας των ωοθηκών (COS) έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει την ποιότητα του ωάριου τη στιγμή της γονιμοποίησης και συνεπώς το ρυθμό ανάπτυξης και την "εμφυτευτική ικανότητα" του εμβρύου.

Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης είναι ένα πολύπλοκο φυσικό μοντέλο ανάπτυξης. Πολυάριθμες μελέτες εμπλέκουν τη συμμετοχή της διακυτταρικής συνάφειας στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και την ωρίμανση και διατήρηση του ωχρού σωματίου που απαιτεί δυναμικές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ωοθυλακίου (ωοκύτταρο, κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης) και της εξωκυττάριας ύλης και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρχιτεκτονική του ωοθυλακίου και από διάφορους ενδοκρινείς, παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες που δρουν με χωρικό και χρονικό τρόπο για να ρυθμίσουν και να συντονίσουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου[364]. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τον ενεργό και κυρίαρχο ρόλο που διαδραματίζει το ωοκύτταρο στην κατεύθυνση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου συνθέτοντας παράγοντες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη λειτουργία, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων, την πρόσληψη κυττάρων της θήκης και την έκκριση ουσιών της ΕΘΟ[365–367].

Η ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται σε διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες και ερεθίσματα ρυθμίζονται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος και συγκεκριμένων διαμεμβρανικών υποδοχέων. Στους υποδοχείς αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα μόρια συνάφειας και ιδιαίτερα οι ιντεγρκρινικοί υποδοχείς[368]. Οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με πολλούς καθοριστικούς παράγοντες κυτταρικών φαινοτύπων και παίζουν ρόλους στον έλεγχο της ανάπτυξης, της δομικής ακεραιότητας και της λειτουργίας κάθε τύπου ιστού. Η έκφραση των ιντεγκρινών ελέγχεται από

τις στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών. Έχει αποδειχθεί ότι η ωοθηκική διέγερση μπορεί να μειώσει την έκφραση των ιντεγκρινών, οι οποίες επηρεάζουν τη δεκτικότητα του ενδομητρίου, όπου οι υπομονάδες ιντεγκρινών εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο[294,296]. Τα τελευταία χρόνια, τα πρωτόκολλα διέγερσης έχουν βελτιωθεί και είναι "ηπιότερα", με μικρότερες δόσεις φαρμάκων και λιγότερα αριθμητικά, αλλά καλύτερα ποιοτικά ωάρια. Ωστόσο πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα διαφορετικά ποσοστά διαίρεσης και ανάπτυξης σε βλαστοκύστες που παρατηρούνται στα ανθρώπινα προεμφυτευτικά έμβρυα συνδέονται με διαφορές στη μορφολογία και στο βαθμό κυτταροπλασματικών θραυσμάτων, όμως δεν έχει διευκρινιστεί εάν αυτό οφείλεται στις συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* ή στη διέγερση των ωοθηκών[369–372]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές καθώς υπήρξε χαμηλότερη διαφορά στατιστικώς σημαντική στο ποσοστό ώριμων ωαρίων MII που συλλέχθηκαν στην ομάδα των μυών με διέγερση ωοθηκών 84% έναντι του 90%. στην ομάδα απουσίας ωοθηκικής διέγερσης. Αξιοσημείωτη διαφορά παρατηρήθηκε επίσης και στο ποσοστό ανώριμων ωάριων (μετάφαση 1ης μειωτικής διαίρεσης-MI, GV) το οποίο ήταν αυξημένο στην ομάδα των μυών με διέγερση ωοθηκών. Πιθανή αιτία αυτού είναι ενδογενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της έκφρασης των ιντεγκρινών μετά από την διέγερση των ωοθηκών. Οι συνθήκες για τα πειραματόζωα ήταν ίδιες (τροφή, νερό, φως) και οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το χρόνο που όριζε το πρωτόκολλο. Το ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης παρατηρήθηκε συνολικά υψηλότερο στην ομάδα μυών απουσίας ωοθηκικής διέγερσης 69% έναντι 64% της ομάδας των μυών με διέγερση ωοθηκών. Όσο αφορά το ποσοστό διαίρεσης των εμβρύων ήταν υψηλότερο στην ομάδα των μυών χωρίς διέγερση 63% και 58% αντίστοιχα στην ομάδα των μυών με διέγερση ωοθηκών, ενώ το ποσοστό ανάπτυξης των εμβρύων στο τελικό εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης συνέχισε να είναι υψηλότερο στην ομάδα των μυών χωρίς διέγερση 25% έναντι 20% της ομάδας των μυών με διέγερση. Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης 31% στην περίπτωση των *in vivo* διαιρεμένων εμβρύων μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων (ημέρα 2 μετά τη γονιμοποίηση) συγκριτικά με τα το 22% των *in vitro* διαιρεμένων εμβρύων (γονιμοποίηση και η περαιτέρω διαίρεση πραγματοποιήθηκε *in vitro*), καταδεικνύοντας την αναγκαιότητα βελτιστοποίησης των *in vitro* συνθηκών καλλιέργειας των εμβρύων. Η απουσία ωοθηκικής διέγερσης φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη των εμβρύων.

4.2 Έκφραση των μορίων συνάφειας σε προεμφυτευτικά έμβρυα μετά από βιοψία

Ο καθορισμός της ποιότητας του εμβρύου και της επιλογής βιώσιμων με μεγάλη εμφυτευτική ικανότητα *in vitro* γονιμοποιημένων ωάριων είναι μία από τις δύσκολες πλευρές της τεχνολογίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Παρόλο που το έμβρυο είναι ένας μεταβαλλόμενος και συνεχώς εξελισσόμενος οργανισμός μπορεί να ελεγχθεί μόνο μορφολογικά και γενετικά. Τα μορφολογικά κριτήρια επιλογής εμβρύου καλύτερης ποιότητας αποτελούν έναν σημαντικό προγνωστικό δείκτη που όμως δεν εξασφαλίζει απαραίτητα την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με το ενδομήτριο, να προσκολλάται και να εμφυτεύεται. Ούτε όμως θα μπορούσαν να αποδειχθούν με τη μορφολογική εκτίμηση ορισμένες αλλαγές στους βιοδείκτες και στη γονιδιακή έκφραση. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η ύπαρξη ανευπλοειδικών ωαρίων, εμβρύων μετά από την διέγερση ωοθηκών στον άνθρωπο είναι υψηλότερη σε σχέση με άλλα θηλαστικά και με μεγαλύτερη κλινική σημασία, που μεταφράζεται σε αποτυχία εμφύτευσης ή σε αυτόματες αποβολές περισσοτέρων από 70% επί του συνόλου των εμβρύων[373]. Πολλές μελέτες συσχετίζουν τη μορφολογία του εμβρύου με χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως ο χαοτικός *μωσαϊκισμός*, πολυπυλοειδίες και πολυπυρήνωση[369,374].Ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος χρωμοσωμάτων και η εμβρυομεταφορά μόνο ευπλοειδικών εμβρύων στη μήτρα προς εμφύτευση μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ωστόσο, αποτελέσματα από πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ορισμένα έμβρυα που ταξινομούνται ως χρωμοσωμικά φυσιολογικά αποτυγχάνουν να φθάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης και την εμφύτευση, ενώ άλλα που μεταφέρουν χρωμοσωμικές διαταραχές, μπορούν να αναπτυχθούν κανονικά σε βλαστοκύστες[375,376]. Σε μία πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη, ο Matstenbrooke και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η PGS με FISH μείωσε κατά 12% το ποσοστό των κυήσεων[377].Η βελτίωση της τεχνόλογιας και της τεχνοδωσίας στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και μοριακής βιολογίας και η εφαρμόγη νέων μεθοδολογιών και τεχνικών συνέλαβαν στο να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που επέβαλε η FISH στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση . Η παρατεταμένη καλλιέργεια των έμβρύων μέχρι το εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης επιτρέπει τη βιοψία του τροφοεκτοδέρματος και τη δειγματοληψία περισσότερων κυττάρων. Σε συνδιασμό με τις μέθοδους της μοριακής βιολογίας του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες comparative genomic hybridization analysis (array-CGH) και την αλληλούχιση επόμενης γενιάς-next generation sequencing (NGS), βελτιώνουν την ακρίβεια ανίχνευσης ανωμάλιων σε συγκεκριμένα γονίδια, αλλά μπορεί να μην αντανακλούν τη χρωμοσωμική κατάσταση του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Η εκτέλεση βιοψίας κατά τη διάρκεια ή μετά τη σύμπηξη, λόγω του επεμβατικού της χαρακτήρα, είναι πιθανό να διαταράζει την έκφραση των μορίων συνάφειας προκαλώντας ασυμμετρία του L/R άξονα, ο οποίος δημιουργείται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια που μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ανάπτυξης του εμβρύου. Επιπλέον παρεμβαίνει στις διακυτταρικές επαφές στα δεσμοσώματα και στους στενοσύνδεσμους και την ακτινική πολικότητα του εμβρύου που εγκαθιδρύεται στο στάδιο των 8 βλαστομεριδίων και κατευθύνει την κυτταροσκελετική ασυμμετρία η οποία είναι σημαντική για τον καθορισμό της κατεύθυνσης κυτταρικών κινήσεων (προς τα έξω/μέσα-outward/inward) κατά τη γαστριδίωση[378,379].

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης και το ποσοστό επιβίωσης μετά από την βιοψία ήταν υψηλότερα (20,8%) στην ομάδα των εμβρύων στα οποία έγινε η βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων με αφαίρεση ενός βλαστομεριδίου έναντι του 6,6% της ομάδας των εμβρύων στην οποία η βιοψία πραγματοποιήθηκε στο εμβρυικό στάδιο των 4 κυτταρικών διαιρέσεων.

Η έκφραση των υπομονάδων ιντεγκρινών αvb3, α5b1, στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα 8 ώρες μετά από βιοψία στο εμβρυικό στάδιο των 8 κυτταρικών διαιρέσεων έδειξε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων αvb3, α5b1 σε αντίθεση με το έμβρυο μάρτυρα που παρουσιάζει υψηλή και καλά οργανωμένη έκφραση των αντίστοιχων ιντεγκρινικών υπομονάδων. Η έκφραση των υπομονάδων α6b1, αv, ce στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα 24 ώρες μετά από την βιοψία στο εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης έδειξε χαμηλής έντασης έκφραση στο τροφοεκτοδέρμα συγκριτικά με την υψηλή και καλά οργανωμένη έκφραση στο έμβρυο μάρτυρα.

4.3 Έκφραση των μορίων συνάφειας σε έμβρυα *in vitro* και *in vivo* και επίδραση της L-Cn στην ανάπτυξη του εμβρύου

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη έκφρασης μορίων συνάφειας σε έμβρυα *in vitro* και *in vivo* και έδειξε διαφορική κατανομή και ένταση χρώσης στις δύο περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι αν και το έμβρυο μπορεί να φαίνεται υγιές, τα επίπεδα και η κατανομή των μορίων προσκόλλησης μπορεί να εμποδίζουν σημαντικά την αλληλεπίδραση με το ενδομήτριο, οδηγώντας έτσι σε αποτυχία εμφύτευσης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη δείχνουν ότι η L-Cn μπορεί να οδηγήσει τον *in vitro* φαινότυπο μορίων προσκόλλησης προς τον *in vivo* φαινότυπο, ο οποίος συσχετίζεται με παρατηρήσεις που αποδίδουν στην *in vitro* παρουσία της L-Cn έναν χρήσιμο ρόλο ως προς την επιτυχία εμφύτευσης του εμβρύου.

Όταν τα *in vitro* και *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα συγκρίθηκαν ως προς την έκφραση των μορίων συνάφειας, και απεικονίστηκαν τα επίπεδα διαφορικής κατανομής. Έτσι, η αvb3 έδειξε χαμηλότερη

ένταση αλλά ένα σήμα περισσότερο πολωμένο *in vivo* σε σύγκριση με τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα, ενώ οι ίδιες παρατηρήσεις αφορούν την χρώση α5b1. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα έδειξαν πολύ οργανωμένη έκφραση στο επίπεδο των βλαστοκύστεων, ενώ τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια. Στην περίπτωση έκφρασης της υπομονάδας α5, στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή και οργανωμένη έκφραση σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ στα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα η έκφρασή της ανιχνεύθηκε μόνο σε επίπεδο βλαστοκύστης.

Η ιντεγκρίνη α6β1 έδειξε πειραματικά μια καλά οργανωμένη έκφραση στο τροφοεκτοδέρμα στις *in vivo* αναπτυσσόμενες καλλιέργειες εμβρύων, ενώ η αντίστοιχη έκφραση στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ήταν διάχυτη και χαμηλής έντασης. Αντιθέτως τα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα δεν εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης. Η Ε-καντερίνη, αν και παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα, είχε παρόμοιο πρότυπο κατανομής με τα *in vivo* αναπτυσσόμενα έμβρυα.

Επομένως, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα έμβρυα που φαίνονται μορφολογικά υγιή, δεν εκφράζουν απαραιτήτως τα απαιτούμενα μόρια για την αλληλεπίδραση και εισβολή στο επιθήλιο του ενδομητρίου. Προηγούμενες μελέτες έχουν παρουσιάσει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα ως προς την επίδραση της L-Cn στην ανάπτυξη του εμβρύου προ της εμφύτευσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, θεωρήθηκε ότι η L-Cn προάγει την ανάπτυξη εμβρύου και την εμφύτευση όταν παρέχεται στο μέσο καλλιέργειας των αναπτυσσόμενων εμβρύων[380,381] ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι η L-Cn μειώνει κατά 30% την ικανότητα των ζυγωτών να υποστούν την πρώτη διαίρεση στο εμβρυικό στάδιο των 2 κυττάρων[382]. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη παρούσα μελέτη έδειξαν ότι η προσθήκη L-Cn στις καλλιέργειες θα μπορούσε να αυξήσει τον αριθμό των εμβρύων που φθάνουν στο εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης, το οποίο όμως εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας. Έτσι, το καλλιεργητικό μέσο "COOK" αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό. Σε αυτή την περίπτωση, η L-Cn φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα και την κατανομή των μορίων αvb3, α5 και E-cadherin, προσομοιάζοντας τη μορφολογία τους με το *in vivo* παρατηρούμενο προφίλ. Αντίθετα, στην περίπτωση του καλλιεργητικού μέσου "Global", η L-Cn αποδείχθηκε ότι επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς μείωσε σημαντικά τον αριθμό των εμβρύων που έφθασαν στο εμβρυικό στάδιο της βλαστοκύστης.

Η L-Cn είναι ένα μόριο που αυξάνει την παραγωγή ενέργειας των κυττάρων μέσω της μεταφοράς λιπαρών οξέων μακράς αλύσου στη μήτρα του μιτοχονδρίου προκειμένου να καταβολιστούν μέσω του μονοπατιού της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων και συμβάλλει στην παραγωγή ενεργητικά υψηλών ενδιάμεσων[383]. Μια σημαντική πηγή λιπαρών οξέων είναι τα λιποκυστίδια, τα οποία θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με απεικόνιση THG. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι η L-Cn μείωσε σημαντικά την ένταση

του σήματος και την κατανομή των λιποκυστιδίων. Σε προηγούμενες μελέτες αποδείχθηκε ότι το σήμα THG των προ-εμφυτευτικών εμβρύων μπορεί να συσχετιστεί με την υγεία των εμβρύων και προτάθηκε ότι η απεικόνιση THG θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για την ποιότητα του εμβρύου πριν από τη μεταφορά στο ενδομήτριο[363]. Η συσχέτιση της απεικόνισης THG με την έκφραση των ιντεγκρινών θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την αύξηση των ποσοστών εμφύτευσης των εμβρύων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή τη μελέτη κατέδειξαν ότι το έμβρυο που θεωρείται μορφολογικά υγιές χρησιμοποιώντας μικροσκοπική παρατήρηση μπορεί να είναι ακατάλληλο για εμφύτευση λόγω της μη φυσικής έκφρασης των μορίων συνάφειας, γεγονός που υπαγορεύει τη μετανάστευση του εμβρύου και την προσκόλλησή του στις θέσεις εμφύτευσης στο ενδομητρίου. Η παρατήρηση ότι η βιοψία των εμβρύων μειώνει την έκφραση των μορίων συνάφειας πιθανότατα λόγου του επεμβατικού χαρακτήρα της τεχνικής θα μπορούσε να εξηγήσει την αποτυχία εμφύτευσης μορφολογικά και γενετικά υγιών εμβρύων. Η παρατήρηση ότι η προσθήκη της L-Cn στο μέσο εμβρυϊκής καλλιέργειας ως παράγοντας παροχής ενέργειας έδειξε ότι εντείνει την έκφραση μορίων συνάφειας στα προεμφυτευτικά έμβρυα προσομοιάζοντας τον *in vitro* φαινότυπο των αναπτυσσόμενων εμβρύων μορίων συνάφειας προς τον *in vivo* φαινότυπο, γεγονός το οποίο είναι σημαντικό για την ανάπτυξη της πρώιμης πολικότητας και θα μπορούσε να έχει μεγάλη σημασία κατά της αποτυχίας της εμφύτευσης. Η πρώιμη πολικότητα καθορίζει την επακόλουθη ανάπτυξη του εμβρύου και την επιτυχή εμφύτευση του, κάτι που *in vivo* υπαγορεύεται από τα κύτταρα του επιθηλίου της σάλπιγγας μέσω αλληλεπιδράσεων με τα μόρια συνάφειας, γεγονός που δεν παρατηρείται στα *in vitro* αναπτυσσόμενα έμβρυα. Περαιτέρω ανάπτυξη της τεχνολογίας θα μπορούσε να προσφέρει βιομιμητικές επιφάνειες ικανές να προσομοιάσουν το κροσσωτό περιβάλλον της σάλπιγγας, παρέχοντας έτσι ένα φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης για τα έμβρυα, και συνεπώς μια βελτιωμένη έκβαση εμφύτευσης των εμβρύων.

5. Βιβλιογραφία

1. Darribere, T. *et al.* Integrins:regulators of embryogenesis. *Biol. Cell.* **92**, 5–25 (2000).

2. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. (Garland Science, 2002).

3. Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. & Penttinen, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* **61**, 198–223 (2009).

4. Humphries, J. D. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* **119**, 3901–3903 (2006).

5. Leitinger, B. & Hohenester, H. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* **26**, 146–155 (2007)

6. Harburger, D. S. & Calderwood, D. A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 1472–1472 (2009).

7. Xian, X., Gopal, S. & Couchman, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* **339**, 31–46 (2010).

8. Schmidt, S. & Friedl, P. Interstitial cell migration: Integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* **339**, 83–92 (2010).

9. Frantz, Christian 1 Kathleen M. Stewart, 1 and Valerie M. Weaver1. The extracellular matrix at a glance Christian. *cell Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).

10. Hudson, B. G., Stephen, T. & Tryggvasonll, K. Type I Collagen: Strucutre, Gene Organization, and Role in Human diseases. *J. Biol. Chem.* **3**, 260133–6 (1993).

11. Yamada, K. M. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. (Plenum Press, 1991).

12. Keller, K., Brauer, P. & Keller, J. Modulation of cell surface heparan sulfate structure by growth of cells in the presence of chlorate. *Biochemistry.* **28**, 8100-8107. (1989).

13. Choudhury, R. *et al.* Differential regulation of elastic fiber formation by fibulin-4 and -5. *J. Biol. Chem.* **284**, 24553–24567 (2009).

14. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* **233**, 491–497 (1987).

15. Hörmann, H. & Richter, H. Models for the subunit arrangement in soluble and aggregated plasma fibronectin. *Biopolymers* **25**, 947–958 (1986).

16. Haugen, P. K., McCarthy, J. B., Skubitz, A. P. ., Furcht, L. T. & Letourneau, P. C. Recognition of the A chain carboxy-terminal heparin binding region of fibronectin involves multiple sites: Two contiguous

sequences act independently to promote neural cell adhesion. *J. Cell Biol.* **111**, 2733–2745 (1990).

17. Petersen, T. E. *et al.* Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: Three types of internal homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 137–141 (1983).

18. Hynes, R. Fibronectins. *Sci. Am.* **254(6)**, 42–51

19. Stathakis, N. E., Mosesson, M. W., Chen, a B. & Galanakis, D. K. Cryoprecipitation of fibrin-fibrinogen complexes induced by the cold-insoluble globulin of plasma. *Blood* **51**, 1211–22 (1978).

20. Olden, K., Pratt, R. M. & Yamada, K. M. Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3343–3347 (1979).

21. Yamada, K. . & Kennedy. *Biology of Extracellular matrix a series:Fibronectin*. (Elsevier Science & Technology Books, 1984).

22. Plow, E. ., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. . & Ginsberg, M. H. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Cell Biol.* **82**, 8057–8061 (1985).

23. Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R. & Wartiovaara, J. Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **76**, 100–114 (1980).

24. Cooper, A. R. & MacQueen, H. A. Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos. *Dev. Biol.* **96**, 467–471 (1983).

25. Dziadek, M. & Timpl, R. Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* **111**, 372–382 (1985).

26. Zagris, N., Chung, A. E. & Stavridis, V. Differential expression of laminin genes in early chick embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 815–818 (2000).

27. Zagris, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* **32**, 427–438 (2001).

28. Boron, W. & Boulpaep, E. *Medical Physiology*. (2016).

29. Jenne, D. & Stanley, K. K. Nucleotide sequence and organization of the human S-protein gene: repeating peptide motifs in the 'pexin' family and a model for their evolution. *Biochemistry* **26**, 6735–6742 (1987).

30. Zhou, A., Huntington, J., Pannu, N., Carrell, R. & Read, R. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 541–544 (2003).

31. Blasi, F. *et al.* The urokinase receptor and regulation of cell surface plasminogen activation. *Cell Differ. Dev.* **32**, 247–253 (1990).

32. Vassalli, J. D., Sappino, A. P. & Belin, D. The plasminogen activator / plasmin system. *J. Clin. Invest.* **88**, 1067–1072 (1991).

33. Huarte, J., Belin, D., Bosco, D., Sappino, A. P. & Vassalli, J. D. Plasminogen activator and mouse spermatozoa: Urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J. Cell Biol.* **104**, 1281–1289 (1987).

34. King, N., Hittinger, C. T. & Carroll, S. B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science.* **301**, 361–363 (2003).

35. Harwood, A. & Coates, J. C. A prehistory of cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 470–476 (2004).

36. Danen, E. *Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects*. (Austin (TX): Landes Bioscience).

37. Tamkun, J. W. *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271–282 (1986).

38. Kumar, C. C. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**, 1365–1373 (1998).

39. Χαραλαμπόπουλος, Κ. Α. Μόρια προσκόλλησης νέα εργαλεία στο Γρίφο του καρκίνου. *Arch. Hell. Med.* **25**, 7–35 (2008).

40. Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T. A. & Walz, T. The integrins. *Genome Biol.* **8**, 215 (2007).

41. Hynes, R. O. Integrins: versitility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* (1992).

42. Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**, 1–5 (1991).

43. Springer, T. A. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin -subunits into a -propeller domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 65–72 (1997).

44. Qu, A. & Leahy, D. J. Crystal structure of the I-domain from the CD11a / CD18 (LFA-1 ,aLB2) integrin. *PNAS Biophys.* **92**, 10277–10281 (1995).

45. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **275**, 21785–21788 (2000).

46. Tsung, H. L. *et al.* Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: Evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **136**, 1385–1395 (1997).

47. Luo, Bing-Hao, Carman, C. . & Springer, T. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* **25**, 619647 (2007).

48. Ni, H., Li, A., Simonsen, N. & Wilkins, J. A. Integrin activation by dithiothreitol or Mn2+ induces a ligand-

occupied conformation and exposure of a novel NH2-terminal regulatory site on the β1 integrin chain. *J. Biol. Chem.* **273**, 7981–7987 (1998).

49. Suzuki, S. & Naitoh, Y. Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* **9**, 757–63 (1990).

50. Fässler, R., Georges-labouesset, E. & Hirsch, E. Genetic analyses of integrin function in mice. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 641–646 (1996).

51. Brakebusch, C., Hirsch, E., Potocnik, A. & Fassler, R. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* **110**, 2895–2904 (1997).

52. Sheppard, D. In vivo functions of integrins: Lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* **19**, 203–209 (2000).

53. Stupack, D. G., Cho, S. Y. & Klemke, R. L. Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol. Res.* **21**, 83–88 (2000).

54. Takagi Junichi. Structure of integrin α5β1in complex with fibronectin. *EMBO J* **22**, 4607–4615 (2003).

55. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5985–5988 (1984).

56. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. & Yamada, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* **294**, 1708–1712 (2001).

57. Goh, K. L., Yang, J. T. & Hynes, R. O. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development* **124**, 4309–4319 (1997).

58. Yang, J. T., Rayburn, H. & Hynes, R. O. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* **119**, 1093–1105 (1993).

59. Matzuk, K. H., Burns, G. E., Owens, J. M., Fernandez, J. H. & Nilson, M. M. Characterization of integrin expression in the mouse ovary. *Biol Reprod* **67**, 743–51 (2001).

60. Ruoslahti, E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 229–255 (1988).

61. Piotrowicz R.S, Yamada, K. Y. Fibronectin Receptor on Human Platelets. **106**, 1359–1364 (1988).

62. Poncz, M. *et al.* Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. *J.Biol.Chem.* **262**, 8476-8482. (1987).

63. Sastry, S. K. & Horwitz, A. F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 819–831 (1993).

64. Thys, M. *et al.* Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction* **138**, 471–482 (2009).

65. Sutherland, A. ., Calarco, P. . & Damsky, C. . Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119**, 1175–86 (1993).

66. Brooks, P. C., Clark, R. A. F. & Cheresh, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (80-.).* **264**, 569–571 (1994).

67. Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. & Hynes, R. O. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all αv integrins. *Cell* **95**, 507–519 (1998).

68. Schaff, M. *et al.* Integrin α6β1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* **128**, 541–552 (2013).

69. Hauck, C. R., Hsia, D. A., Puente, X. S., Cheresh, D. A. & Schlaepfer, D. D. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J.* **21**, 6289–6302 (2002).

70. Parsons, J. T. & Parsons, S. J. Src family protein tyrosine kinases: Cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 187–192 (1997).

71. Franke, T. F., Kaplan, D. R. & Cantley, L. C. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435–437 (1997).

72. Attwell, S., Roskelley, C. & Dedhar, S. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* **19**, 3811–3815 (2000).

73. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).

74. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 823–862 (1997).

75. Del Buono, R., Pignatelli, M., Bodmer, W. F. & Wright, N. A. The role of the arginine-glycine-aspartic acid-directed cellular binding to type I collagen and rat mesenchymal cells in colorectal tumour differentiation. *Differentiation* **46**, 97–103 (1991).

76. Elices, M. J. *et al.* VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. *Cell* **60**, 577–584 (1990).

77. Springer, T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425–434 (1990).

78. Bechter, O. E. *et al.* Expression of LFA-1 identifies different prognostic subgroups in patients with advanced follicle center lymphoma (FCL). *Leuk. Res.* **23**, 483–488 (1999).

79. Ginsberg, M., Partridge, A. & Shattil, S. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 509–516 (2005).

80. Ratnikov, B. I., Partridge, A. W. & Ginsberg, M. H. Integrin activation by talin. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1783–1790 (2005).

81. Arnaout, M. A., Mahalingam, B. & Xiong, J.-P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381–410 (2005).

82. Advances in Immunology. in *Advances in Immunology* (ed. Frederick, W. .) 296 (Elsevier, 2006).

83. Xiao, T., Takagi, J., Coller, B., Wang, J. & Springer, T. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**, 59–67 (2002).

84. Xiong, J. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* **296**, 151–155 (2002).

85. Adair, B. D. *et al.* Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin αVβ3 in a complex with fibronectin. *J. Cell Biol.* **168**, 1109–1118 (2005).

86. Sarantos, M. R., Raychaudhuri, S., Lum, A. F. H., Staunton, D. E. & Simon, S. I. LFA-1 mediated adhesion stability is dynamically regulated through affinity and valency during bond formation with ICAM-1. *Biol. Chem.* **280**, 28290–28298 (2005).

87. Dedhar, S. Cell – substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 250–256 (2000).

88. Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. & Van der Geer, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786–791 (1994).

89. Dedhar, S. Integrins and signal transduction. *Curr. Opin. Hematol.* **6**, 37 (1999).

90. Sieg, D. J. *et al.* FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* **2**, 249–256 (2000).

91. Schlaepfer, D. D. & Hunter, T. Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* **272**, 13189–13195 (1997).

92. Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F. G. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**, 625–634 (1998).

93. Hannigan, G. E. *et al.* Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91–96 (1996).

94. Delcommenne, M. *et al.* Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 11211–11216 (1998).

95. Troussard, A. A., Tan, C., Yoganathan, T. N. & Dedhar, S. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7420–7427 (1999).

96. Yamaji, S. *et al.* A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J. Cell Biol.* **153**, 1251–1264 (2001).

97. Hemler, M. E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 397–422 (2003).

98. Byzova, T. V *et al.* A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: Activation of the integrins. *Mol. Cell* **6**, 851–860 (2000).

99. Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 816–826 (2004).

100. Kuwada, S. K. & Xiufen, L. Integrin α5/β1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2485–2496 (2000).

101. Soldi, R. Role of αvβ3 integrin in the activation of vascular endothelialgrowth factor receptor-2. *EMBO* **18**, 882–892 (1999).

102. Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferrière, J. & Huot, J. Integrin αvβ3requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones* **8**, 37–52 (2003).

103. Le Boeuf, F., Houle, F., Sussman, M. & Huot, J. Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3508–20. (2006).

104. Avraham, H. K. *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 36661–36668 (2003).

105. Eliceiri, B. P. Mechanisms of signal transduction in vascular permeability: Potential targets. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **33**, 5–6 (2003).

106. Eliceiri, B. P. *et al.* Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin αvβ5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* **157**, 149–159 (2002).

107. Muramatsu, H. *et al.* α4β1- and α6β1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J. Cell Sci.* **117**, 5405–5415 (2004).

108. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circ. Res.* **100**, 782–794 (2007).

109. Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A. & Takeichi, M. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): Subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.* **105**, 2501–2510 (1987).

110. Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. & Takeichi, M. Identification of a neural α-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* **70**, 293–301 (1992).

111. Ozawa, M. & Kemler, R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J. Cell Biol.* **116**, 989–996 (1992).

112. Nose, A., Tsuji, K. & Takeichi, M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* **61**, 147–155 (1990).

113. Hatta, K., Okada, T. & Takeichi, M. A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: Possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 2789–2793 (1985).

114. Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S. & Pouliot, Y. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev. Biol.* **139**, 227–229 (1990).

115. Pignatelli, M. & Bodmer, W. F. Genetics and biochemistry of collagen binding-triggered glandular differentiation in a human colon carcinoma cell line. *Cell Biol.* **85**, 5561–5565 (1988).

116. Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (80-.).* **251**, 1451–1455 (1991).

117. Shapiro, L. *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327–37 (1995).

118. Robertson, S., Mayrhofer, G. & Seamark, R. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol. Reprod.* **54**, 183–196 (1996).

119. Steinberg, M. & Takeichi, M. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 206–209

(1994).

120. Pignatelli., M. Integrins, cadherins, and catenins : Molecular cross-talk in cancer cells. *J. Pathol.* **186**, 1–2 (1998).

121. Chung, T. W., Park, M. J., Kim, H. S., Choi, H. J. & Ha, K. T. Integrin αvβ3 and αvβ5 are required for leukemia inhibitory factor-mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 936–940 (2016).

122. Natt, E., Magenis, R., Zimmer, J., Mansouri, A. & Scherer, G. Regional assignment of the human loci for uvomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. *Cytogenet. Cell Genet.* **50**, 145–148 (1989).

123. Woodruff, T. K. & Shea, L. D. The Role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod. Sci.* **14**, 6–10 (2007).

124. Laws, S. C., Webster, J. C. & Miller, W. L. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology* **127**, 381–386 (1990).

125. Heffner, L. J. *Ανθρώπινη Αναπαραγωγή με μια ματιά*. (Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ., 2005).

126. Scott, R. . & Hodgen, G. D. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock. *Clin. Obstet. Gynecol.* **33**, 551–562 (1990).

127. Strauss, J. . & Carmen, J. . *Ovarian Life Cycle*. (Elsevier, 2004).

128. Rivier, C., Rivier, J. & Vale, W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science (80-.).* **234**, 205–208 (1986).

129. Woodruff, T., D'Agostino, J., Schwartz, N. & Mayo, K. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science (80-.).* **239**, 1296–1299. (1988).

130. Smokovitis, A., Alexakitzivanidou, E. & Kokolis, N. The plasminogen activator activity is markedly increased mainly at the area of the rupture of the follicular wall at the time of ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* **16**, 285–294 (1988).

131. Egbert, J. *et al.* Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cGMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. *Biol. Reprod.* **94**, 110 (2016).

132. Rama Raju, G. *et al.* Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *J. Hum. Reprod. Sci.* **6**, 227–234 (2013).

133. Channing, C. P. & Tsafriri, A. Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the ovary in vitro. *Metabolism* **26**, 413–468 (1977).

134. Couzinet, B., Le Strat, N., Ulmann, A., Baulieu, E. & Schaison, G. Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristone). *N Engl J Med.* **315**, 1565–1570 (1986).

135. Greb, R. R. *et al.* Disparate actions of mifepristone (RU 486) on glands and stroma in the primate endometrium. *Hum. Reprod.* **14**, 198–206 (1999).

136. Kayisli, U. A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, R. & Arici, A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J. Immunol.* **171**, 2305–2313 (2003).

137. Luck, M., Zhao, Y. & Silvester, L. Identification and localization of collagen types I and IV in the ruminant follicle and corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* **49**, 517–21 (1995).

138. Rodgers, H. *et al.* Distribution of the alpha1 to alpha6 chains of type IV collagen in bovine follicles. *Biol. Reprod.* **59**, 1334–41 (1998).

139. Yamada, S. *et al.* Human granulosa cells express integrin α2 and collagen type IV: possible involvement of collagen type IV in granulosa cell luteinization. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 607–617 (1999).

140. Iwahashi, M., Muragaki, Y., Ooshima, A. & Nakano, R. Type VI collagen expression during growth of human ovarian follicles. *Fertil. Steril.* **74**, 343–347 (2000).

141. Rajah, R. & Sundaram, G. S. Protein distribution and gene expression of collagen type IV in the neonatal rat ovary during follicle formation. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 769–780 (1994).

142. Wordinger, R. J., Rudick, V. L. & Rudick, M. J. Immunohistochemical localization of laminin within the mouse ovary. *J. Exp. Zool.* **228**, 141–143 (1983).

143. Rodgers, R., Irving-Rodgers, H. & Russell, D. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* **126**, 415–424 (2003).

144. Robertson, S., Brannstrom, M. & Seamark, R. Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. *Curr Opin Immunol* **4**, 585–590 (1992).

145. Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F., Van Wezel, I. L., Krupa, M. & Lavranos, T. C. Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. *Mol. Cell. Endocrinol.* **171**, 41–48 (2001).

146. Vuori K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J. Membr. Biol.* **165**, 191–199 (1998).

147. Amsterdam, A. *et al.* Oncogene-transformed granulosa cells as a model system for the study of steroidogenic processes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 875–884 (1992).

148. Bronson, R. A. & Fusi, F. M. Integrins and human reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 153–168 (1996).

149. Schipper, I., Fauser, B., van Gaver, E., Zarutskie, P. & Dahl, K. Development of a human granulosa cell culture model with follicle stimulating hormone responsiveness. *Hum. Reprod.* **8**, 1380–1386 (1993).

150. Clavero, A. *et al.* Expression of integrin fraction and adhesion molecules on human granulosa cells and its relation with oocyte maturity and follicular steroidogenesis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **21**, 187–195 (2004).

151. Honda, T. *et al.* Integrin alpha5 is expressed on human luteinizing granulosa cells during corpus luteum formation, and its expression is enhanced by human chorionic gonadotrophin in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 979–984 (1997).

152. Le Bellego, F., Pisselet, C., Huet, C., Monget, P. & Monniaux, D. Laminin-α6β1integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *J. Endocrinol.* **172**, 45–59 (2002).

153. Nakamura, K. *et al.* Integrin α6 is involved in follicular growth in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 524–528 (1997).

154. Gersak, K. & Tomazevic, T. Subpopulations of human granulosa-luteal cells in natural and stimulated in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.* **65**, 608–613 (1996).

155. Tanida, I., Hasegawa, A., Iida, H., Ohya, Y. & Anraku, Y. Cooperation of calcineurin and vacuolar H(+)-ATPase in intracellular Ca2+ homeostasis of yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 10113–10119 (1995).

156. Aten, R. ., Kolodecik, T. . & Behrman, H. . A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **136**, 1753–1758 (1995).

157. Aharoni, D., Meiri, I., Atzmon, R., Vlodavsky, I. & Amsterdam, A. Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Curr. Biol.* **7**, 43–51 (1997).

158. Shiokawa, S. *et al.* Functional role of arg-gly-asp (RGD)-binding sites on beta1 integrin in embryo implantation using mouse blastocysts and human decidua. *Biol. Reprod.* **60**, 1468–74 (1999).

159. Sites, C. K., Kessel, B. & LaBarbera, A. R. Adhesion proteins increase cellular attachment, follicle-stimulating hormone receptors, and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **212**, 78–83 (1996).

160. Schoolcraft, W. *et al.* Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with

leuprolide acetate. *Fertil. Steril.* **55**, 563–566 (1991).

161. Stouffer R.L. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: Beyond steroidogenesis. *Hum. Reprod. Update* **9**, 99–117 (2003).

162. Kumar, C. C. *et al.* Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual avb3 and avb5 integrin receptor antagonist. *Cancer Res.* **61**, 2232–2238 (2001).

163. Even-Ram, S. . *et al.* Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha vbeta 5 integrin. *J. Biol. Chem.* **276**, 10952–10962 (2001).

164. Harlow, C. R. & Hillier, S. Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Mollecular Cell. Endocrinol.* **187**, 23–27 (2002).

165. Babic, A. ., Chen, C. . & Lau, L. F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2958–2966 (1999).

166. Jedsadayanmata, A., Chen, C., Kireeva, M. L., Lau, L. F. & Lam, S. C. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin αIIbβ3. *J. Biol. Chem.* **274**, 24321–24327 (1999).

167. Burns, K. H., Yan, C., Kumar, T. R. & Matzuk, M. M. Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone beta knockout mice. *Endocrinology* **142**, 2742–2751 (2001).

168. Jungnickel, M. K., Sutton, K. A. & Florman, H. M. In the beginning: Lessons from fertilization in mice and worms. *Cell* **114**, 401–404 (2003).

169. Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B. & Thompson, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* **139**, 685–695 (2010).

170. Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. & De Kruif, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 414–424 (2002).

171. Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E. & Paul, D. L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* **385**, 525–529 (1997).

172. Li, T. Y., Colley, D., Barr, K. J., Yee, S. P. & Kidder, G. M. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *J. Cell Sci.* **120**, 4117–4125 (2007).

173. Huang, Z. & Wells, D. The human oocyte and cumulus cells relationship: New insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 715–725 (2010).

174. Lam, X., Gieseke, C., Knoll, M. & Talbot, P. Assay and importance of adhesive interaction between hamster (Mesocricetus auratus) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* **62**, 579–88 (2000).

175. Dobrinski, I., Smith, T. T., Suarez, S. S. & Ball, B. A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* **56**, 861–869 (1997).

176. Murray, S. C. & Smith, T. T. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil. Steril.* **68**, 351–357 (1997).

177. Yano, R. *et al.* Bactericidal/permeability-increasing protein is associated with the acrosome region of rodent epididymal spermatozoa. *J. Androl.* **31**, 201–214 (2010).

178. Lippes, J., Krasner, J., Alfonso, L. A., Dacalos, E. D. & Lucero, R. Human oviductal fluid proteins. *Fertil. Steril.* **36**, 623–629 (1981).

179. Lorenzo, I. M., Liedtke, W., Sanderson, M. J. & Valverde, M. A. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 12611–12616 (2008).

180. Miki, K. & Clapham, D. E. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr. Biol.* **23**, 443–452 (2013).

181. De Blas, G. A. *et al.* TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* **4**, e6095 (2009).

182. Pérez-Cerezales, S. *et al.* Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. *Sci. Rep.* **5**, (2015).

183. Hunter, R. H., Bogh, I. B., Einer-Jensen, N., Müller, S. & Greve, T. Pre-ovulatory graafian follicles are cooler than neighbouring stroma in pig ovaries. *Hum. Reprod.* **15**, 273–283 (2000).

184. Hunter, R. . Temperature gradients in female reproductive tissues. *Reprod. Biomed. Online* **24**, 377–380 (2012).

185. Bahat, A. *et al.* Thermotaxis of mammalian sperm cells : A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat. Med.* **9**, 149–150 (2003).

186. Grinsted, J., Kjer, J. J., Blendstrup, K. & Pedersen, J. F. Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development? *Fertil. Steril.* **43**, 34–39 (1985).

187. Ye, J. *et al.* Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes in vitro. *Reproduction* **133**, 877–886 (2007).

188. Isobe, T. *et al.* The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum. Reprod.* **17**, 1441–1446 (2002).

189. Caballero-Campo, P. *et al.* A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis. *J. Cell. Physiol.* **229**, 68–78 (2014).

190. Cretoiu, S. M., Cretoiu, D., Suciu, L. & Popescu, L. M. Interstitial Cajal-like cells of human Fallopian tube express estrogen and progesterone receptors. *J. Mol. Histol.* **40**, 387–394 (2009).

191. Overstreet, J. W. & Cooper, G. . Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II: The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* **19**, 115–132 (1978).

192. Redgrove, K. A. *et al.* The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* **7**, e50851 (2012).

193. Redgrove, K. A. *et al.* Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 120–135 (2013).

194. Bromfield, E. G., Mclaughlin, E. A., Aitken, R. J. & Nixon, B. Heat Shock Protein member A2 (HSPA2) forms a stable complex with angiotensin converting enzyme (ACE) and protein disulfide isomerase A6 (PDIA6) in human spermatozoa . *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 93–109 (2016).

195. Vitaioli, L., Gobbetti, A. & Baldoni, E. Arylsulphatase A activity and sulphatide concentration in the female rabbit oviduct are under physiological hormonal influence. *Histochem. J.* **28**, 149–156 (1996).

196. Griffiths, G. S., Miller, K. A., Galileo, D. S. & Martin-DeLeon, P. A. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: Acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction* **135**, 293–301 (2008).

197. Schaller, J., Glander, H. & Dethloff, J. Evidence of beta 1 integrins and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. *Hum Reprod.* **8**, 1873–1878 (1993).

198. Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, Montesano M, Ferrari A, B. R. The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Mollecular Hum. Reprod.* **2**, 169–175 (1996).

199. Fusi, F., Lorenzetti, I., Vignali, M. & Bronson, R. Sperm surface proteins after capacitation. Expression of vitronectin on the spermatozoan head and laminin on the sperm tail. *J. Androl.* **13**, 488–497 (1992).

200. Fusi, F. ., Bernocchi, N., Ferrari, A. & Bronson, R. . Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 859–866 (1996).

201. Tesarík, J., Pilka, L. & Trávník, P. Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* **83**, 487–495 (1988).

202. Blobel, C. P. *et al.* A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248–252 (1992).

203. Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G. & White, J. M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: Multipotential functions in cell-cell and cell- matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275–278 (1995).

204. Almeida, E. a *et al.* Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* **81**, 1095–1104 (1995).

205. Bronson, R. . & Fusi, F. Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* **43**, 1019–25 (1990).

206. Campbell, S., Swann, H. R., Seif, M. W., Kimber, S. J. & Aplin, J. D. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Mol. Hum. Reprod.* **1**, 171–178 (1995).

207. Tarone, G. *et al.* Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development* **117**, 1369–1375 (1993).

208. D'Cruz, O. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Front. Biosci.* **1**, 161–176 (1996).

209. Goodwin, L. O., Karabinus, D. S. & Pergolizzi, R. G. Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **6**, 487–497 (2000).

210. Wassarman, P. M. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* **96**, 175–183 (1999).

211. Avella, M. A., Baibakov, B. A., Jimenez-Movilla, M., Sadusky, A. B. & Dean, J. ZP2 peptide beads select human sperm in vitro, decoy mouse sperm in vivo, and provide reversible contraception. *Sci. Transl. Med.* **8**, 336ra60 (2016).

212. Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G. J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, 483–487 (2014).

213. Belokopytova, I. A., Kostyleva, E. I., Tomilin, A. N. & Vorob'ev, V. I. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol. Reprod. Dev.* **34**, 53–57 (1993).

214. Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G. & Primakoff, P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* **125**, 1157–1163 (1994).

215. Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J. & Wolf, E. Mammalian oocyte activation: Lessons from the

sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 797–809 (2001).

216. Davidson, E. H. Lineage-specific gene expression and the regulative capacities of the sea urchin embryo: a proposed mechanism. *Development* **105**, 421–445 (1989).

217. Wilkins, A. . *Genetic analysis of animal development*. (Wiley-Interscience, 1987).

218. Edwards, R. G. & Beard, H. K. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 863–905 (1997).

219. Nagy, Z. *et al.* The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum. Reprod.* **10**, 3171–3177 (1995).

220. Gabrielsen, A., Petersen, K., Mikkelsen, A. L. & Lindenberg, S. Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional in-vitro fertilization and normal spermatozoa. *Hum. Reprod.* **11**, 1963–1965 (1996).

221. Lim, A., Goh, V., Su, C. & Yu, S. Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive. *Hum. Genet.* **107**, 62–68 (2000).

222. Λουτράδης, Κ. Ε. & Ταρλατζής, Β. Κ. Μορφολογικά χαρακτηριστικά αξιολόγησης της ποιότητας ωαρίων και εμβρύων για εμβρυομεταφορά. *Ελληνική Μαιευτική & Γυναικολογία* **18**, 279–286 (2006).

223. Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Fortini, D. & Grieco, N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil. Steril.* **80**, 341–349 (2003).

224. Manor, D., Drugan, A., Stein, D., Pillar, M. & Itskovitz-Eldor, J. Unequal pronuclear size—A powerful predictor of embryonic chromosome anomalies. *Assist. Reprod. Genet.* **16**, 385–389 (1999).

225. Croxatto, H. B. Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod. Biomed. Online* **4**, 160–169 (2002).

226. Folmes, D. C. & Terzic, A. Metabolic determinants of embryonic development and stem cell fate. *Reprod. Fertil. Dev.* **27**, 82–88 (2014).

227. Hughes, T. R. & de Boer, C. G. Mapping yeast transcriptional networks. *Genetics* **195**, 9–36 (2013).

228. Dumollard, R., Ward, Z., Carroll, J. & Duchen, M. R. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development* **134**, 455–465 (2006).

229. Sathananthan, A. H. & Trounson, A. O. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum. Reprod.* **15**, 148–159 (2000).

230. Christians, E. *et al.* Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 778–788 (1997).

231. Parsell, D. A. & Lindquist, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437–496 (1993).

232. Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289–296 (1996).

233. Guérin, P., El Mouatassim, S. & Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **7**, 175–189 (2001).

234. Harvey, M., Arcellana-Panlilio, M., Zhang, X., Schultz, G. & Watson, A. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol. Reprod.* **53**, 532–540 (1995).

235. Hansen, J. M. & Harris, C. Glutathione during embryonic development. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 1527–1542 (2015).

236. Gardiner, C. S. & Reed, D. J. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* **51**, 1307–1314 (1994).

237. Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A. & Shen, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* **206**, 306–335 (2005).

238. Haddad, S. N. & Wira, C. R. Estradiol regulation of constitutive and keratinocyte growth factor-induced CCL20 and CXCL1 secretion by mouse uterine epithelial cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 34–44 (2015).

239. Winuthayanon, W. *et al.* Oviductal estrogen receptor α signaling prevents protease-mediated embryo death. *Elife* **4**, e10453 (2015).

240. Li, S. *et al.* Estrogen receptor a is required for oviductal transport of embryos. *FASEB J.* **31**, 1595–1607 (2017).

241. Kimber, S. J. Glycoconjugates and cell surface interactions in pre- and peri-implantation mammalian embryonic development. *Int. Rev. Cytol.* **120**, 53–167 (1990).

242. Damsky, C., Sutherland, A. & Fisher, S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J.* **7**, 1320–1329 (1993).

243. Xu, J. S. *et al.* Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells enhances proliferation, suppresses apoptosis and stimulates the expression of the β1 subunit of sodium-potassium ATPase in mouse embryos. *Hum. Reprod.* **19**, 2919–2926 (2004).

244. Adachi, K. *et al.* Estrogen induces epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands in human fallopian tube: involvement of EGF but not transforming growth factor-alpha in estrogen-induced tubal cell growth in vitro. *Endocrinology* **136**, 2110–2119 (1995).

245. Carlsson, B., Hillensjö, T., Nilsson, A., Törnell, J. & Billig, H. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat fallopian tube: possible autocrine and paracrine action of fallopian tube-derived IGF-I on the fallopian tube and on the preimplantation embryo. *Endocrinology* **133**, 2031–2039 (1993).

246. Daliri, M. *et al.* Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo (Bubalus bubalis) embryos and oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* **117**, 61–70 (1999).

247. Chegini, N., Zhao, Y., Williams, R. & Flanders, K. Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1), TGF beta 2, TGF beta 3, and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF beta 1-binding sites. *Endocrinology* **135**, 439–449 (1994).

248. Sutherland, A. E., Calarco, P. G. & Damsky, C. H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119**, 1175–1186 (1993).

249. Shirayoshi, Y., Okada, T. S. & Takeichi, M. The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* **35**, 631–638 (1983).

250. Nance, J. Getting to know your neighbor: Cell polarization in early embryos. *J. Cell Biol.* **206**, 823–832 (2014).

251. Edwards, R. G. Aspects f the molecular regulation of early mammalian development. *Reprod. Biomed. Online* **6**, 97–113 (2003).

252. García-Castro, M. I., Vielmetter, E. & Bronner-Fraser, M. N-cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science (80-.).* **288**, 1047–1051 (2000).

253. Cohen, D., Müsch, A. & Rodriguez-Boulan, E. Selective control of basolateral membrane protein polarity by cdc42. *Traffic* **2**, 556–564 (2001).

254. Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C. & Jacob, F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* **21**, 927–934 (1980).

255. Johnson, M. H., Maro, B. & Takeichi, M. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **93**, 239–255 (1986).

256. Hirate, Y. *et al.* Polarity-dependent distribution of angiomotin localizes hippo signaling in preimplantation

embryos. *Curr. Biol.* **23**, 1181–1194 (2013).

257. Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D. & Yamanaka, Y. Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **141**, 2813–2824 (2014).

258. Gladden, A. ., Hebert, A. ., Schneeberger, E. . & McClatchey, A. . The NF2 tumor suppressor, Merlin, regulates epidermal development through the establishment of a junctional polarity complex. *Dev. Cell* **19**, 727–739 (2010).

259. Yi, T. Z. *et al.* Prognostic value of E-cadherin expression and CDH1 promoter methylation in patients with endometrial carcinoma. *Cancer Invest.* **29**, 86–92 (2011).

260. Orihuela, P. . & Horacio, B. . Acceleration of oviductal transport of oocytes induced by estradiol in cycling rats is mediated by nongenomic stimulation of protein phosphorylation in the oviduct. *Biol. Reprod.* **65**, 1238–1245 (2001).

261. Ekerhovd, E., Brännström, M., Alexandersson, M. & Norström, A. Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum. Reprod.* **12**, 301–305 (1997).

262. Janković, S. M., Varjacić, M. & Protić, B. Relaxant effect of oxytocin on isolated human oviduct. *Croat. Med. J.* **42**, 511–516 (2001).

263. Wånggren, K., Stavreus-Evers, A., Olsson, C., Andersson, E. & Gemzell-Danielsson, K. Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. *Hum. Reprod.* **23**, 2359–2368 (2008).

264. Al-Alem, L. *et al.* Endothelin-2 induces oviductal contraction via endothelin receptor subtype A in rats. *J. Endocrinol.* **193**, 383–391 (2007).

265. Reik, W. *et al.* Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo. *Development* **119**, 933–942 (1993).

266. Guo, H. *et al.* The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* **511**, 606–610 (2014).

267. Okae, H. *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet.* **10**, e1004868 (2014).

268. Smith, Z. D. *et al.* DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* **511**, 611–615 (2014).

269. Okamoto, Y. *et al.* DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry. *Sci. Rep.* **6**, 19134 (2016).

270. Lee, J. T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 815–826 (2011).

271. Yeung, W. S. B., Ho, P. C., Lau, E. Y. L. & Chan, S. T. H. Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum. Reprod.* **7**, 1144–1149 (1992).

272. Vlad, M., Walker, D. & Kennedy, R. C. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum. Reprod.* **11**, 1678–1686 (1996).

273. Stern, J. E. *et al.* Optimizing the number of cleavage stage embryos to transfer on day 3 in women 38 years of age and older: a society for assisted reproductive technology database study. *Fertil. Steril.* **91**, 767–776 (2009).

274. Hess, A. P. *et al.* The human oviduct transcriptome reveals an anti-inflammatory, anti-angiogenic, secretory and matrix-stable environment during embryo transit. *Reprod. Biomed. Online* **27**, 423–435 (2013).

275. Greve, T. & Callesen, H. Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev. Sci. Tech.* **24**, 405–412 (2005).

276. Viuff, D. *et al.* Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo- developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. *Biol. Reprod.* **65**, 204–208 (2001).

277. Ertzeid, G. & Storeng, R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum. Reprod.* **16**, 221–225 (2001).

278. Shi, W. & Haaf, T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 329–334 (2002).

279. Li, S., Edgar, D., Fässler, R., Wadsworth, W. & Yurchenco, P. D. The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **4**, 613–624 (2003).

280. Psychogios, A. Uterine Receptivity for Nidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **476**, 36–42 (1986).

281. Valles, C. S. & Dominguez, F. Embryo-endometrial interaction. *Chang Gung Med. J.* **29**, 9–14 (2006).

282. Sutherland, A. E., Calarco, P. G. & Damsky, C. H. Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J. Cell Biol.* **106**, 1331–1348 (1988).

283. Kim, S. . & Kim, J. . A review of mechanisms of implantation. *Dev. Reprod.* **21**, 351–359 (2017).

284. Lessey, B. A. *et al.* Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest.* **90**, 188–195 (1992).

285. Tabibzadeh, S. S. & Poubouridis, D. Expression of leukocyte adhesion molecules in human endometrium.

Am. J. Clin. Pathol. **93**, 183–189 (1990).

286. Lessey, B. A. *et al.* Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: Implications for implantation, contraception, and infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* **35**, 195–204 (1996).

287. Bowen, J. a, Bazer, F. W. & Burghardt, R. C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. *Biol. Reprod.* **55**, 1098–1106 (1996).

288. Damsky, C. H. *et al.* Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* **120**, 3657–3666 (1994).

289. Montanez, E. *et al.* Analysis of integrin functions in peri-implantation embryos, hematopoietic system, and skin. *Methods Enzymol.* **426**, 239–289 (2007).

290. Albers, A., Thie, M., Hohn, H. & Denker, H. Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. *Acta Anat.* **153**, 12–19 (1995).

291. Palomino, W. A. *et al.* Differential expression of endometrial integrins and progesterone receptor during the window of implantation in normo-ovulatory women treated with clomiphene citrate. *Fertil. Steril.* **83**, 587–593 (2005).

292. Baart, E. B., Macklon, N. S. & Fauser, B. J. Ovarian stimulation and embryo quality. *Reprod. Biomed. Online* **18**, 45–50 (2009).

293. Haouzi, D. *et al.* Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: Protocol effects. *Biol. Reprod.* **82**, 679–686 (2010).

294. Fayazi, M., Beigi Boroujeni, M., Salehnia, M. & Khansarinejad, B. Ovarian stimulation by exogenous gonadotropin decreases the implantation rate and expression of mouse blastocysts integrins. *Iran. Biomed. J.* **18**, 8–15 (2014).

295. Ruan, H. C. *et al.* Ovarian stimulation with GnRH agonist, but not GnRH antagonist, partially restores the expression of endometrial integrin β3 and leukaemia-inhibitory factor and improves uterine receptivity in mice. *Hum. Reprod.* **21**, 2521–2529 (2006).

296. Chen, Q. ju *et al.* Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin β3 and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase. *Fertil. Steril.* **89**, 1357–1363 (2008).

297. Meyer, W. R. *et al.* Effect of exogenous gonadotropins on endometrial maturation in oocyte donors. *Fertil. Steril.* **71**, 109–114 (1999).

298. Kimber, S. J. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. *Semin. Reprod. Med.* **18**, 237–253 (2000).

299. Cheng, J. G., Chen, J. R., Hernandez, L., Alvord, W. G. & Stewart, C. L. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8680–8685 (2001).

300. Salehnia, M. Stimulated mouse endometrium. *Exp. Anim.* **54**, 349–352 (2005).

301. Meschner, A. . *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. (Broken Hill Publishers LTD, 2013).

302. Boeddeker, S. & Hess, A. The role of apoptosis in human embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* **108**, 114–122 (2015).

303. Agostinis, C. *et al.* An alternative role of C1q in cell migration and tissue remodeling: contribution to trophoblast invasion and placental development. *J. Immunol.* **185**, 4420–4429 (2010).

304. Cross, J. C., Werb, Z. & Fisher, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science (80-.).* **266**, 1508–1518 (1994).

305. Aplin, J. D. Expression of integrin α6β4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* **14**, 203–215 (1993).

306. Zhou, Y. *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* **99**, 2139–2151 (1997).

307. Damsky, C. H., Fitzgerald, M. L. & Fisher, S. J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J. Clin. Invest.* **89**, 210–222 (1992).

308. Mongioi, L. *et al.* The role of carnitine in male infertility. *Andrology* **4**, 800–807 (2016).

309. Choi, W. J. *et al.* Oxidative stress and tumor necrosis factor-α-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertil. Steril.* **88**, 1220–1231 (2007).

310. Burton, G. J., Hempstock, J. & Jauniaux, E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod. Biomed. Online* **6**, 84–96 (2003).

311. Catt, J. W. & Henman, M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum. Reprod.* **15**, 199–206 (2000).

312. Jurisicova, A., Varmuza, S. & Casper, R. F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 93–98 (1996).

313. Wyllie A. Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* **391**, 20–21 (1998).

314. Hardy, K. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.* **4**, 125–134 (1999).

315. Martin, S. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545–1556 (1995).

316. Levy, R., Benchaib, M., Cordonier, H., Souchier, C. & Guerin, J. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 775–783 (1998).

317. Lopata, A., Kohlman, D. & Johnston, I. The fine structure of normal and abnormal human embryos developed in culture. in *Fertilization of the Human Egg In Vitro* (eds. Beier, H. M. & Lindner, H. R.) 189–210 (Springer, Berlin, 1983).

318. Trounson, A. & Sathananthan, A. H. The application of electron microscopy in the evaluation of two- to four-cell human embryos cultured in vitro for embryo transfer. *J. Vitr. Fertil. Embryo Transf.* **1**, 153–165 (1984).

319. Mohr, L. R., Trounson, A. O., Leeton, J. F. & Wood, C. Evaluation of normal and abnormal human embryo development during procedures in vitro. in *Fertilization of the Human Egg In Vitro* (eds. Beier, H. M. & Lindner, H. R.) 211–221 (Springer, Berlin, 1983). doi:10.1007/978-3-642-68800-3_15

320. Hardy, K., Winston, R. M. L. & Handyside, A. H. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *Reprod Fertil.* **98**, 549–558 (1993).

321. Handyside, A. H. & Hunter, S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**, 519–526 (1986).

322. Monk, M., Hardy, K., Handyside, A. & Whittingham, D. Preimplantation diagnosis of deficiency of hypoxanthine phosphoribosyl transferase in a mouse model for lesch-nyhan syndrome. *Lancet* **330**, 423–425 (1987).

323. Coutelle, C. *et al.* Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *BMJ* **299**, 22–24 (1989).

324. Pellestor, F., Girardet, A., Andreo, B., Lefort, G. & Charlieu, J. P. Preimplantation embryo chromosome analysis by primed in situ labeling method. *Fertil. Steril.* **66**, 781–786 (1996).

325. Stupack, D. G. & Cheresh, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* **115**, 3729–3738 (2002).

326. Meredith, J. E., Fazeli, B. & Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* **4**, 953–961 (1993).

327. Ingber, L. & Rosen, B. Genetic algorithms and very fast simulated reannealing: A comparison. *Math. Comput. Model.* **16**, 87–100 (1992).

328. Green, D. & Reed, J. Mitochondria and apoptosis. *Science (80-.).* **281**, 1309–12 (1996).

329. Wolf, B. B., Schuler, M., Echeverri, F. & Green, D. R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol. Chem.* **274**, 30651–30656 (1999).

330. Kovacsovics, M. *et al.* Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr. Biol.* **12**, 838–843 (2002).

331. Kothakota, S. *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin : effector of morphological change in apoptosis. *Science (80-.).* **278**, 294–298 (1997).

332. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* **116**, 4077–4085 (2003).

333. Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 217–45 (2000).

334. Frisch, S. M. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr. Biol.* **9**, 1047–1049 (1999).

335. Zhou, Y., Scamurra, R., Molitor, T. W. & Murtaugh, M. P. Characterization of transforming growth factor-β1 gene expression in porcine immune cells. *Mol. Immunol.* **29**, 965–970 (1992).

336. Tartaglia, L. A. *et al.* The two different receptors for TNF mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 9292–9296 (1991).

337. Bowen, J. A. & Hunt, J. S. The role of integrins in reproduction. *Exp. Biol. Med.* **223**, 331–343 (2000).

338. Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. & Kemler, R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8263–8267 (1994).

339. Lighten, A., Moore, G., Winston, R. & Hardy, K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* **13**, 3144–50 (1998).

340. Brison, D. R. & Schultz, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* **56**, 1088–1096 (1997).

341. O'Neill, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal

development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.* **58**, 1303–1309 (1998).

342. Spanos, S. *et al.* Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction* **124**, 353–363 (2002).

343. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science.* **267**, 1449–1456 (1995).

344. Warner, C. M. *et al.* Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum. Reprod.* **13**, 178–190 (1998).

345. Strömblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C. & Cheresh, D. A. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **98**, 426–433 (1996).

346. Matter, M. L. & Ruoslahti, E. A signaling pathway from the α5β1 and αvβ3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 27757–27763 (2001).

347. Brooks, P. C. *et al.* Integrin αvβ3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**, 1157–1164 (1994).

348. Scatena, C. D. *et al.* Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and taxol-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* **273**, 30777–30784 (1998).

349. Turkcapar, F., Ozdener, T. & Batuoglu, S. Influence of ovarian stimulation with HMG or recombinant FSH on OHSS prevention in PCO patients undergoing IVF. *Hum. Reprod.* **92**, S96 (2009).

350. Thurin, A. *et al.* Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. *Hum. Reprod.* **20**, 1876–1880 (2005).

351. Sendag, F., Akdogan, A., Ozbilgin, K., Giray, G. & Oztekin, K. Effect of ovarian stimulation with human menopausal gonadotropin and recombinant follicle stimulating hormone on the expression of integrins alpha3, beta1 in the rat endometrium during the implantation period. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **150**, 57–60 (2010).

352. Van Royen, E. *et al.* Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum. Reprod.* **14**, 2345–2349 (1999).

353. Takeo, T. & Nakagata, N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS One* **10**, e0128330 (2015).

354. Kito, S. *et al.* Improved in vitro fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.* **54**, 564–570 (2004).

355. Tachibana, M. *et al.* Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* **493**, 627–631 (2013).

356. Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F. & Matthews, C. D. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum. Reprod.* **12**, 532–541 (1997).

357. Scott, L., Alvero, R., Leondires, M. & Miller, B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* **15**, 2394–2403 (2000).

358. Lundqvist, M. *et al.* Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential ? *Reprod. Biomed. Online* **2**, 12–16 (2000).

359. Jones, G. M. *et al.* Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum. Reprod.* **13**, 169–177 (1998).

360. Stone, B. A., Greene, J., Vargyas, J. M., Ringler, G. E. & Marrs, R. P. Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 2014–2019 (2005).

361. D.K., G. & Schoolcraft, W. B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **11**, 307–311 (1999).

362. Handyside, A. H. *et al.* Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1**, 347–349 (1989).

363. Kyvelidou, C. *et al.* Following the course of pre-implantation embryo patterning by non-linear microscopy. *J. Struct. Biol.* **176**, 379–386 (2011).

364. Groten, T. *et al.* Cell junctional proteins in the human corpus luteum: Changes during the normal cycle and after HCG treatment. *Hum. Reprod.* **21**, 3096–3102 (2006).

365. Brower P, S. R. No TitleIntracellular commmunications between granulosa and moyse oocytes:Existence and possible nutritional role during oocyte growt. *Dev Biol.* **90**, 144–153 (1982).

366. Haghighat, N. & Van Winkle, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system gly. *J. Exp. Zool.* **253**, 71–82 (1990).

367. Hutt, K. J. & Albertini, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online* **14**, 758–764 (2007).

368. Gospodarowicz, D., Brown, K. D., Birdwell, C. R. & Zetter, B. R. Control of proliferation of human

vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J. Cell Biol.* **77**, 774–778 (1978).

369. Magli, M. C. *et al.* Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* **87**, 534–541 (2007).

370. Alikani, M. *et al.* Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.* **71**, 836–842 (1999).

371. Alikani, M. *et al.* Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum. Reprod.* **15**, 2634–2643 (2000).

372. Ziebe, S., Lundin, K., Janssens, R., Helmgaard, L. & Arce, J. C. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF. *Hum. Reprod.* **22**, 2404–2413 (2007).

373. Menasha J1, Levy B, Hirschhorn K, K. N. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med.* **7(4)**, 251–63.

374. J.Munne S.; Alikani M.; Tomkin G.; Grifo J.; Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *FERTIL STERIL* **64/2**, 382–391 (1995).

375. Lee, A. & Kiessling, A. A. Early human embryos are naturally aneuploid—can that be corrected? *J. Assist. Reprod. Genet.* **34**, 15–21 (2017).

376. Sandalinas, M. *et al.* Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* **16**, 1954–1958 (2001).

377. Mastenbroek, S., Twisk, M., van der Veen, F. & Repping, S. Preimplantation genetic screening: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum. Reprod. Update* **17**, 454–466 (2011).

378. Hardy, K., Warner, A., Winston, R. M. L. & Becker, D. L. Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 621–632 (1996).

379. Sugawara, A. & Ward, M. A. Biopsy of embryos produced by in vitro fertilization affects development in C57BL/6 mouse strain. *Theriogenology* **79**, 234–241 (2013).

380. Zare, Z. *et al.* Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 635–643 (2015).

381. Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R. & Agarwal, A. L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil. Steril.* **91**, 589–596 (2009).

382. Kyvelidou, C. *et al.* L-Carnitine affects preimplantation embryo development toward infertility in mice. *Reproduction* **152**, 283–291 (2016).

383. Arachidonate, M. G. *Metabolism and Eicosanoids. In Biochemical Pathways. John Wiley & Sons, Inc* (1999).

ARTICLE IN PRESS

Reproductive Biology xxx (xxxx) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/repbio

Differential integrin expression in pre-implantation embryos developing under *in vivo* and *in vitro* conditions

Aliki Anyfantaki[a,b], Christiana Kyvelidou[c], Margarita Tsagkaraki[a,d], George Filippidis[d], Mattheos Fraidakis[b], Alexandros Zafiropoulos[a], Irene Athanassakis[c,*]

[a] Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion 71409, Crete, Greece
[b] Crete Fertility Centre, 56 Arch. Makariou & Sof. Venizelou Str., Heraklion 71202, Crete, Greece
[c] Department of Biology, University of Crete, Heraklion 70013, Crete, Greece
[d] Institute of Electronic Structure and Laser, Foundation of Research and Technology, Heraklion 70013, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:
Assisted reproductive technology
Embryo culture
In vitro fertilization (IVF)
In vitro maturation (IVM)
Integrins
Pre-implantation embryo

ABSTRACT

Implantation failure is a major problem in human assisted reproduction, which persists regardless the optimization of endometrial receptivity and selection of genetically and morphologically healthy embryos. Since embryo-endometrium interaction depends on cell junctional, cell adhesion and cell-substratum adhesion molecules, the present study inquired whether *in vitro* growing murine embryos display similar to the *in vivo* growing embryos patterns of adhesion molecules. To this extend aVb3 expression and distribution in zygotes and 2-cell stage embryos were studied. The results demonstrated that only the *in vivo* growing embryos displayed specifically polarized aVb3 distribution, indicating their potential successful interaction with endometrium. Based on previous studies showing that L-carnitine (L-Cn) could affect embryonic development, it was demonstrated that the addition of L-Cn to the culture medium, could lead the *in vitro* growing embryos to acquire aVb3 expression and distribution similar to the *in vivo* growing embryos. Visualization of the effect of L-Cn using third harmonic generation imaging showed decreased lipid droplet levels in 2-cell-stage embryos, observation that correlates with an active energetic state of the growing embryos. Thus, the application of L-Cn to the culture medium could assist pre-implantation-state embryos to acquire aVb3 expression and distribution similar to the *in vivo* developing conditions.

1. Introduction

During embryo development, cells interact with each other as well as with their environment, establishing cell junctions and cell-extracellular matrix interactions respectively. These interactions involve cell-junctional molecules, cell adhesion molecules, cell-substratum adhesion molecules as well as their receptors. Such receptors include mainly integrins, which along with cadherins, selectins, and syndecans, mediate cell-cell and cell-matrix interactions, allowing thus cell and tissue organization [1].

Integrins are transmembrane receptors that upon binding to specific ligands of the extracellular matrix facilitate adhesion and migration, while activating signal transduction pathways to regulate the cell cycle, organize cytoskeleton, and lead new receptors to the cell membrane [2]. Integrins are heterodimers of independent α and β subunits forming specific combinations. Through different combinations, 18 α and 8 β subunits form approximately 24 unique integrin molecules [3]. Different integrins can bind to the same ligand, while one integrin can interact with various ligands. The most commonly recognized tripeptide in integrin-reacting ligands is the sequence Arg-Gly-Asp (RGD) of the substrate. The cytoplasmic domain of integrins interacts with cytoskeletal proteins (a-actinin, talin, filamin), providing thus a physical link between the extracellular matrix and cytoskeletal structures, participating thus in various signal transduction processes regulating cell fate [1].

From invertebrates to vertebrates, integrins have been shown to play an important role in embryo development [4,5]. Especially in mammals, extracellular matrix interactions with the epithelium hosting each embryonic stage play a crucial role in the fate of the developing embryo, its ability to migrate to the uterus, to implant, and develop until birth [1].

In mammals, fertilization and the first divisions of the developing embryo occur in the fallopian tube and at the stage of early blastocyst the embryo migrates to the uterus for implantation [6,7]. It is believed

* Corresponding author at: Department of Biology, University of Crete, University Campus, Vassilika Vouton, Crete, Heraklion, 71003, Greece.
E-mail address: athanire@uoc.gr (I. Athanassakis).

https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.07.006
Received 6 March 2018; Received in revised form 22 July 2018; Accepted 25 July 2018
1642-431X/ © 2018 Published by Elsevier B.V. on behalf of Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn.

that early embryo polarization determines its subsequent growth [8]. Such polarization is dictated by in the oviduct epithelium cells, apparently through adhesion molecule interactions [9]. Apparently, during assisted reproduction, in the absence of natural oviduct epithelium interactions, pre-implantation embryos do not receive the necessary signals to regulate adhesion molecule expression and distribution.

Previous studies from our laboratory were able to follow pre-implantation embryo development and assess embryo quality using a third harmonic generation (THG) non-linear microscopic imaging technology [10]. According to this technology, which is known to be sensitive to local differences as to the refractive index, three photons of the fundamental angular frequency ω will be destroyed and a new photon of angular frequency 3ω will be simultaneously created in a single-quantum mechanical process [11]. In the case of pre-implantation embryo imaging the most prominent sub-cellular contributors of strong THG signals were lipid bodies, which reflect the energetic profile of a cell [10,12]. Exhausting poly-unsaturated lipid depots from the maternal organisms by L-carnitine (L-Cn), which delivers long chain fatty acids to the β-oxidation pathway in the mitochondrial matrix for catabolism [13], has been shown to severely affect blastocyst development, and abolish offspring production *in vivo* [12]. However, studies on *in vitro* growing embryos have suggested that L-Cn ameliorates maturation of immature mouse oocytes and early embryo development of immature mouse oocytes [14], decreases DNA damage, while improving the *in vitro* blastocyst development rate in mouse embryos [15].

Taking into account the above observations, the present study compared integrin expression in *in vivo versus in vitro* developing embryos and examined the effect of L-Cn in the *in vitro* growing embryos. The study concentrated on integrin aVb3, which is primarily a vitronectin receptor but it also recognizes and binds fibronectin, fibrinogen, osteopontin, Cyr61 and thyroxine. It is a receptor for phagocytosis on macrophages and dendritic cells, has been shown to be upregulated in response to vascular damage, during angiogenesis, bone resorption and in certain types of malignancy, while it is highly expressed in osteoclasts [16]. This integrin is considered to be expressed continuously throughout implantation [17].

Thus in the present report, comparing the early developmental stages of embryos directly isolated from the animal or growing in IVF culture conditions, differential integrin expression could be detected, while in the presence of L-Cn the *in vitro* growing embryos were shown to organize integrin expression towards the *in vivo* phenotype and exhibit better development.

2. Materials and methods

2.1. Animals

BALB/c mice (*Mus musculus*) were purchased from Charles River (Milan, Italy), maintained in the animal facility at the University of Crete (Crete, Greece) and approved according to national guidelines (EL91-BIObr-09). Six to 14 weeks old male and female mice (20 ± 0.3 g) were used in all experiments. BALB/c female mice were superovulated by intraperitoneal injections of pregnant mare serum (PMSG, 5 IU/mice, Sigma, G4877) and human chorionic gonadotropin (hCG, 5 IU/mice, Sigma, CG5–1VL) at an interval of 47 h. The time of administration of gonadotropins was based on the light cycle used. At least three mice were tested each time in every developmental state.

2.2. Antibodies and reagents

Fluorescein conjugated anti-aVb3 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, sc-7312) and used at the concentration of 1 μg/ml. L-Carnitine (L-Carnitine inner salt, Sigma, C0158) was added to embryo culture medium at the concentration of 400 μM [10,12].

2.3. Embryo harvesting, culture and staining

In vitro and *in vivo* growing mouse embryos were initially compared as to the expression of aVb3. *In vivo* growing embryos were isolated from oviducts of superovulated pregnant mice 18 h post-hCG injection for zygotes and 44 h post-hCG for 2-cell embryos. For the *in vitro* growing embryos, oocytes were submitted to *in vitro* fertilization for the acquisition of zygotes, which were thereafter cultured for further development.

For the *in vivo* embryo collection, plug-positive females were sacrificed at 18 h post-hCG injection (Day 0) to obtain zygotes or 44 h post-hCG injection (Day 1) to obtain 2-cell stage embryos. For the *in vivo* embryo collection, zygotes were produced by *in vitro* fertilization (IVF) procedures. Thus, superovulated females were sacrificed 15–17 h post-hCG injection for oocyte collection, while males were sacrificed 3 h prior to IVF for sperm collection and capacitation. Sperm was excised from the epididymis into 300 μl KSISM COOK (Cook, Australia), placed in the incubator at 37°C, with a 6% CO2 atmosphere for 10–15 min and then washed with 5 ml KSISM. After discarding the supernatant, the pellet was gently over-layered onto 0,5 ml KSIFM COOK medium, inclined at 45 degrees and kept at 37 °C in 6% CO2 for 35–45 minutes. A sterile Pasteur pipette was used to remove the supernatant containing actively motile sperms. The sperm was kept in incubator for 1–3 hrs prior to insemination. Oocyte-cumulus complexes intended for IVF were released from the oviduct into pre-warmed at 37 °C KSIGB COOK medium (Cook, Australia), washed 3 times and placed directly into fertilization dishes in 100 μl micro droplets of KSIFM equilibrated overnight under mineral oil FERTIPRO 37 °C in a 6% CO2 atmosphere and inseminated with capacitated sperm at a final concentration in the fertilization drop of 2×10^5 sperm/ml in the presence or not of 400 μM L-Cn. After 6 to 7 h the oocytes were washed with KSIGB COOK medium and were examined for the presence of two polar bodies and two pro-nuclei. The fertilized oocytes were moved into 50 μl micro drops of KSICM COOK medium under mineral oil (Fertipro N.V., Beernem, Belgium) equilibrated overnight, for further development with or without 400 μM L-Cn. All oocyte and embryo manipulations were carried out on a heated microscope stage that was maintained at 37 °C. For the non-linear microscopy experiments, *in vivo* generated zygotes were cultured as mentioned above in mHTF [18] medium with or without 400 μM L-Cn (with maximum 10 embryos per drop).

In vitro or *in vivo* developing embryos were in most cases stained with TOPRO-3 (TOPRO-3, 1:1000 dilution, Molecular Probes, T3605), fixed using the fix and perm kit (FIX &PERM cell permeabilization kit, Invitrogen, CA, USA, GAS-003) and incubated with anti-aVb3 for 30 min at room temperature. Upon staining, embryos were transferred in 25% glycerol and processed to fluorescent microscopy analysis (Leika, Solms, Germany).

2.4. Third harmonic generation imaging

For THG imaging, harvested embryos were washed in PBS-BSA 0.1% w/v (Sigma P4417; Sigma, A7906), fixed with PFA 2% w/v (Sigma, 158,127) and placed in PBS-BSA 0.1% w/v between two very thin (~70 μm) round glass slides (Marienfeld), separated with a 100 μm thick spacer in order to avoid damaging the samples. The process of the THG signal detection was performed as previously described [10]. Briefly, a femtosecond laser beam (1028 nm, 200 fs, 50 MHz) was guided into a modified Nikon upright microscope (Eclipse ME600D) and subsequently focused tightly into the sample through an objective lens (C-Achroplan, Carl Zeiss; 32X, NA 0.85, water immersion). A pair of galvanometric mirrors was used for the lateral scanning, whereas a motorized translation Z-stage was employed for the focal plane selection. Following the filtering with a 340 nm color glass filter, THG signals were detected in the forward direction by a photomultiplier tube (H9305-04, Hamamatsu). The average laser power on the sample plane was 20 mW (0.4 nJ per pulse). Every recorded slice image (500 × 500

pixels) was the result of 30 averaged scans, each of them recorded in less than 1 s.

The quantification of THG signals consisted of two distinct image processing methodologies. The first included the determination of the total number of particles (total area) and their respective average size (mean area). Following this type of processing, a threshold of the normalized slice images was applied, using a global intensity threshold value. The resulting binary images were further processed through the "Analyze particles" built-in function of the java based software ImageJ, whereas the statistical analysis (mean values calculation/t-tests) of the acquired data was performed through MATLAB.

The second image processing calculated of the mean THG intensity for each measured specimen. To this extend, a custom designed algorithm, programmed in MATLAB environment was used. The algorithm loaded the normalized Z-stack of images and delimited automatically the representative embryo region for each slice through proximity of intensity selection function for a fixed tolerance level. The selected pixel values served as input for the calculation of the embryo's mean THG intensity, the variability of the signals and the statistical hypothesis testing between different sample groups.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed with two-tailed paired or unpaired Student's *t*-test. P values < 0.05 were considered significant (*), values < 0.01 were considered very significant (**) and values < 0.001 and < 0.0001 were considered highly significant (*** and ****). Statistics were performed using GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software).

3. Results

The expression of aVb3, was visualized in all embryos tested in both *in vivo* and *in vitro* conditions (Fig. 1). However, intensity and polarization of expression differed in the two cases. The *in vivo* generated zygotes showed intense polarized staining, while the IVF-derived zygotes showed low diffused staining (Fig. 1A, 1C). The *in vivo* generated 2-cell stage embryos showed oriented membrane staining in blastomeres (and in some cases cytoplasmic, data not shown), while the IVF-derived zygotes showed intense staining at both blastomeres (Fig. 1B, 1D). In the presence of L-Cn, the *in vitro* growing embryos gained membrane staining resembling more to the *in vivo* growing embryos (Fig. 1E, 1F).

Embryo quality was further evaluated using THG imaging (Fig. 2A), which as previously shown could detect intracellular lipid bodies and reflect the energetic profile of the embryo [10]. Indeed, in the presence of L-Cn, THG signal was significantly reduced as compared to *in vitro* growing control embryos. Thus, total signal area (Fig. 2B) decreased by 50% ($p = 0.0255$) and mean signal area (Fig. 2C) by 39.5% ($p = 0.0075$). These results indicated that L-Cn promoted lipid body-energy usage, leading thus to THG signal reduction. Although THG intensity median values were not different in control and L-Cn-treated embryos (Fig. 2D), the variation coefficient (CV, Fig. 2E) and standard deviation of areas (SD, Fig. 2E) were significantly reduced by 32 ($p = 0.0074$) and 55% ($p = 0.0118$) in the L-Cn treated embryos, respectively. It has to be noted that *the vitro* growing control embryos did not show any statistically significant difference from *in vivo* growing embryos (Fig. 2A). However, using THG imaging, previous studies have shown differential lipid body distribution during the process of development within the same pre-implantation embryonic state [10]. Thus, the *in vivo* growing 2-cell stage embryos show dynamic changes in THG signal within each hour of development and therefore cannot be easily compared to the *in vitro* growing embryos. Nevertheless, the reduction of THG signal parameters observed in the *in vitro* growing embryos, could reflect signal polarization, which as previously shown, could be correlated with the forthcoming cellular division [10].

In order to evaluate whether L-Cn could ameliorate the *in vitro* developing embryo survival at later pre-implantation stages, *in vitro* generated embryos were cultured until the stage of blastocyst in the presence or not of L-Cn (Fig. 3A). Thus, 52% of the embryos reached the 4-cell stage, while in the presence of L-Cn, 35% of the embryos reached the stage of blastocyst ($p < 0.05$). Interestingly, aVb3 staining in 4-cell stage embryos growing *in vitro* in the presence of L-Cn showed peripheral membrane staining, whereas in the absence of L-Cn, staining was centrally placed in the junction of blastomeres (Fig. 3B). The *in vivo* growing 4-cell stage embryos showed blastomere polarized staining (Fig. 3B). Finally, the *in vitro* growing embryos in the presence of L-Cn reached the stage of blastocyst, which showed a similar to the *in vivo* growing embryos pattern (Fig. 3B).

4. Discussion

Implantation failure in human assisted reproduction is considered as the most common cause of unsuccessful outcome. The major counterparts ensuring a successful implantation process include good quality embryos and receptive endometrium. Although various procedures diagnose and treat endometrial receptivity, embryo quality can only be controlled morphologically and genetically, which do not necessarily ensure its ability to interact with endometrium, adhere and implant. The present study focused on the study of the aVb3 adhesion molecule expression in *in vitro* and *in vivo* growing embryos and showed differential distribution and intensity of staining in the two cases, allowing to hypothesize that although the embryo may look healthy, the levels and distribution of adhesion molecules may significantly obstruct interaction with endometrium, leading thus to implantation failure. Interestingly, the results presented in this study show that L-Cn may drive the *in vitro* phenotype of adhesion molecules, towards the *in vivo* phenotype, which correlates with observations attributing to the *in vitro* presence of L-Cn a helpful role as to the embryo implantation success.

When *in vitro* and *in vivo* growing embryos were compared as to adhesion molecule expression, differential distribution levels were visualized. Thus, aVb3 showed lower intensity but a more polarized signal *in vivo* as compared to the *in vitro* growing embryos. In this case, L-Cn was shown to affect the levels and distribution of aVb3 driving their morphology closer to the *in vivo* observed profiles.

It is therefore important to note that when embryos look morphologically healthy, they do not necessarily express the required molecules/mechanisms for interaction and invasion to the endometrial epithelium. Previous studies have been showing controversial results as to the effect of L-Cn on pre-implantation embryo growth. In some cases, it has been considered that L-Cn promotes embryo growth and implantation when provided in the culture medium of developing embryos [14,15], while other studies show that L-Cn decreases by 30% the ability of zygotes to undergo the first division towards the 2-cell stage embryos [12]. The results presented herein showed that the addition of L-Cn to the cultures could increase the number of embryos reaching the blastocyst levels, which showed a similar to the *in vivo* growing embryos aVb3 expression pattern. L-Cn is an energy generating molecule, which by delivering long chain fatty acids to the β-oxidation pathway in the mitochondrial matrix for catabolism, contributes to the production energetically high intermediates [13]. One important source of fatty acids is lipid droplets, which could be visualized by THG imaging. Indeed, it was observed that L-Cn significantly reduced the signal intensity and distribution of lipid droplets. In previous studies it was demonstrated that the THG signal of pre-implantation embryos could be correlated to embryo health and was proposed that THG imaging could be used as a diagnostic tool for embryo quality prior to intrauterine transfer [10]. Correlating THG imaging to integrin expression could provide a significant tool for embryo diagnosis and increase of implantation rates.

In conclusion, the results presented in this study demonstrated that the embryo considered as morphologically healthy using a microscopic observation, may be inappropriate for implantation due to aberrant

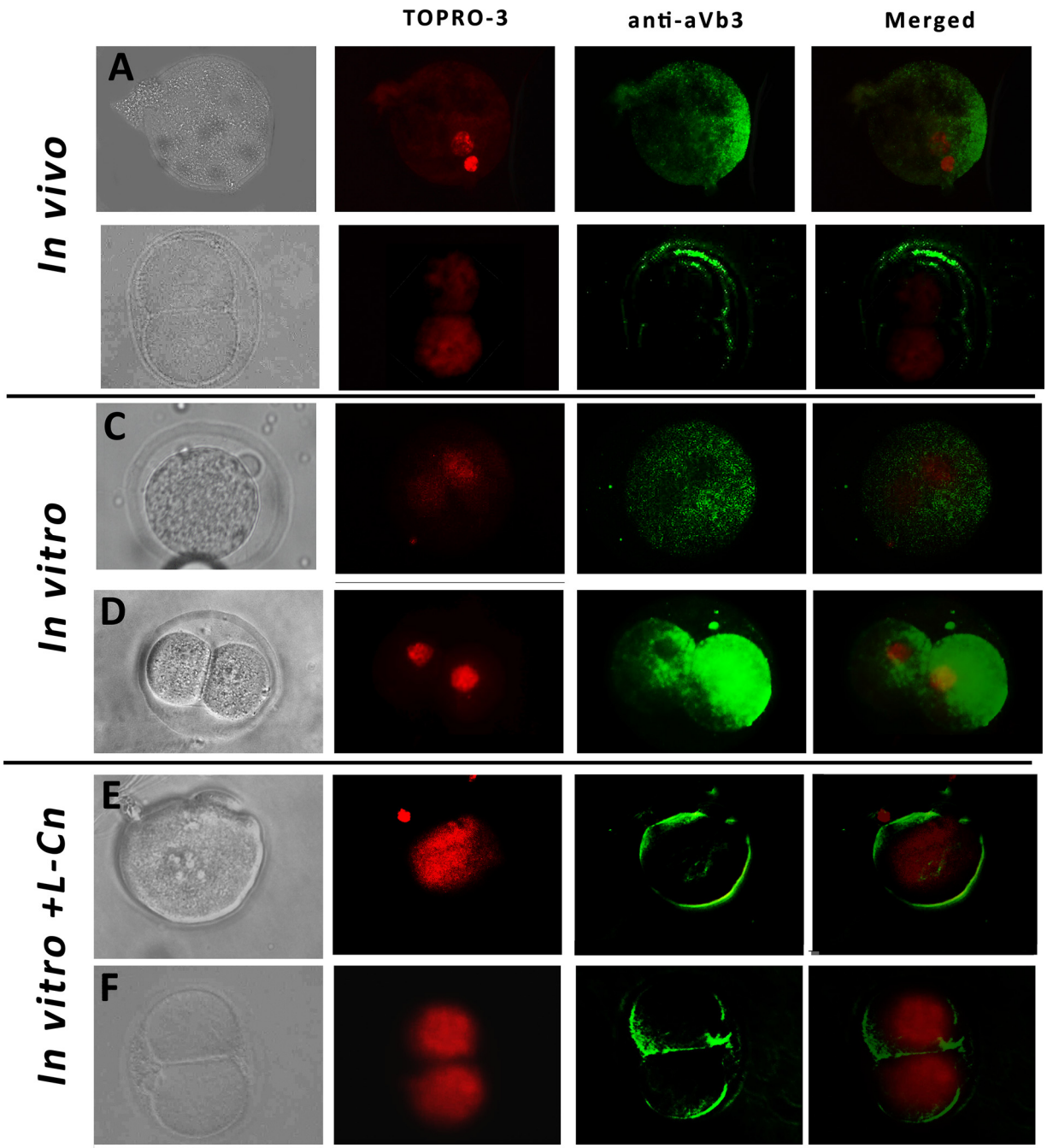


Fig. 1. Expression of aVb3 in *in vivo* (A, B) and *in vitro* (C, D) with (E, F) or without L-Cn growing embryos. The *in vivo* derived embryos were generated 18 and 44 h post-hCG administration from oviducts of plug-positive mice, while *the vitro* growing embryos were generated from IVF-derived zygotes and cultured in the presence or not of L-Cn. Embryos were immunostained as described in methods. Nuclei were also stained with TOPRO-3. At least 5 embryos were stained in each developmental stage. Only representative embryos are shown. Magnification X40.

expression of adhesion molecules, which would dictate embryo migration and attachment to the endometrial implantation sites. The observation that L-Cn drives the expression of adhesion molecules on pre-implantation embryos towards the phenotype of *in vivo* growing embryos, could be of great importance against implantation failure.

Compliance with ethical standards

The authors declare no commercial or financial conflict of interest. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution. The use of experimental animals was approved according to the national guidelines (EL91-BIObr-09).

Author contribution

AA performed all experiments concerning pre-implantation embryo isolation and cultures for immunostaining. CK performed all experiments concerning pre-implantation embryo isolation and cultures for THG imaging. MT performed THG imaging under the supervision of GF. MF and AZ proofread the manuscript. IA conceived the idea, was responsible for all experimental design, analyzed data and wrote the manuscript.

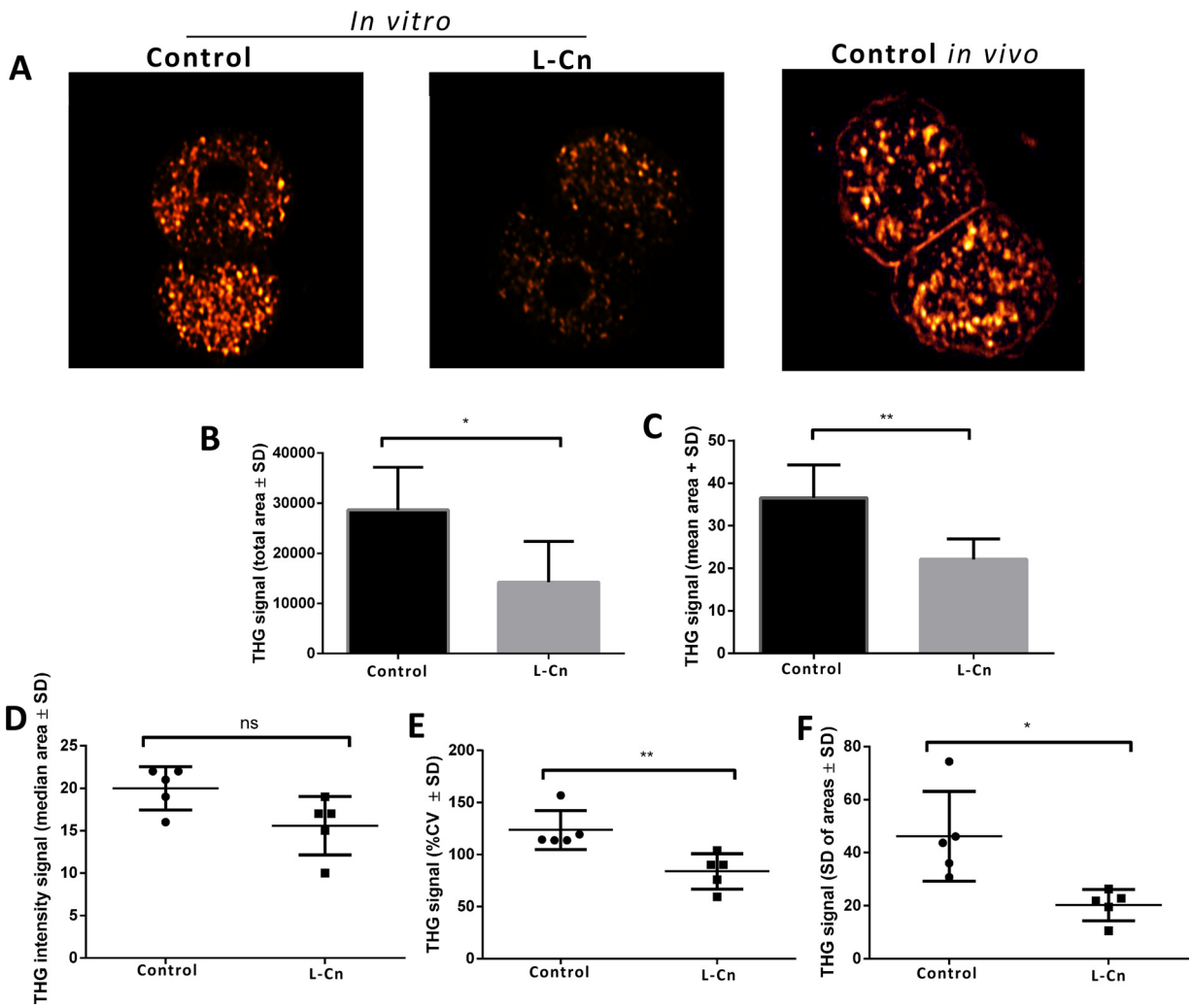


Fig. 2. *In vitro* effect of L-Cn on pre-implantation embryo development. Zygotes were incubated with 400 μM L-Cn for 24 h at 37 °C in a 6% CO_2 atmosphere and processed to THG imaging (A), followed by analysis of total signal area (B), mean area (C), intensity median values (D) and variation coefficient CV (E) and standard deviation of areas (SD), which were calculated as described in Methods. The results represent the mean of 5 experiments (± SD). Caption magnification 32 × . *: $p < 0.01$, **: $p < 0.005$.

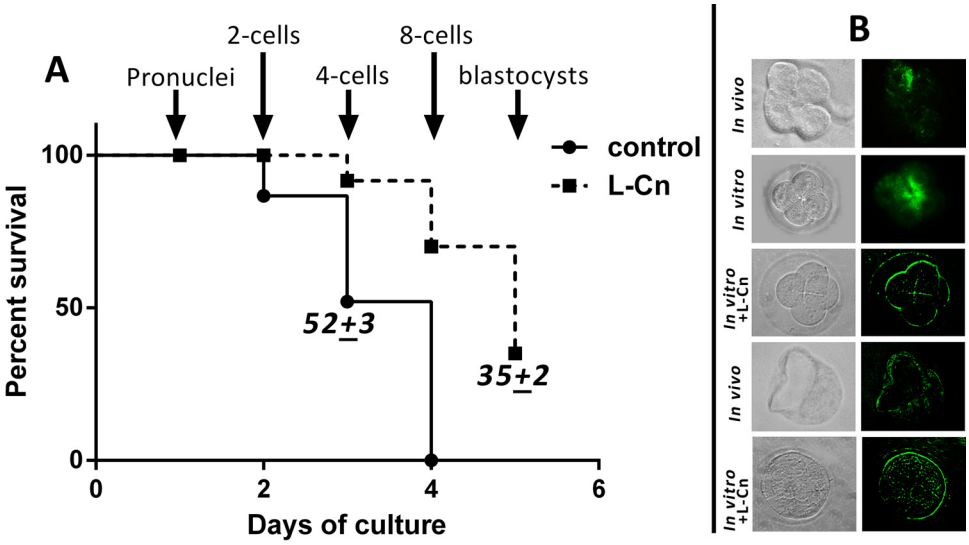


Fig. 3. Pre-implantation embryo development/survival in the presence or not of L-Cn, cultured in "COOK" media (A). Thirty embryos were studied in each case. Characteristic aVb3 staining of *in vivo* and *in vitro* growing 4-cell stage embryos in the presence or not of L-Cn, and blastocysts growing either *in vivo* or *in vitro* in the presence of L-Cn (B). Magnification X40.

Acknowledgements

This research was partially supported by the national funding of the Ministry of Education and the Special Account for Research Resources of the University of Crete through services to the private sector.

References

[1] Darribère T, Skalski M, Cousin HL, Gaultier A, Montmory C, Alfandari D. Integrins: regulators of embryogenesis. Biol Cell 2000;92:5–25.
[2] Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science 1999;285:1028–32.
[3] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 2002;110:673–87.
[4] Bokel C, Brown NH. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix developmental. Cell 2002;3:311–21.
[5] Brown KE, Yamada KM. The role of integrins during vertebrate development. Semin Dev Biol 1995;6:69–77.
[6] Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. Reproduction 2012;144:649–60. https://doi.org/10.1530/REP-12-0279.
[7] Besenfelder U, Havlicek V, Brem G. Role of the oviduct in early embryo development. Reprod Domest Anim 2012;47:156–63. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02070.x.
[8] Nance J. Getting to know your neighbor: cell polarization in early embryos. J Cell Biol 2014;206:823–32. https://doi.org/10.1083/jcb.201407064.
[9] Sulz L, Valenzuela JP, Salvatierra AM, Ortiz ME, Croxatto HB. The expression of αv and β3 integrin subunits in the normal human fallopian tube epithelium suggests the occurrence of a tubal implantation window. Hum Reprod 1998;13:2916–20.
[10] Kyvelidou C, Tserevelakis GJ, Filippidis G, Ranella A, Kleovoulou A, Fotakis C, et al. Following the course of pre-implantation embryo patterning by non-linear microscopy. J Struct Biol 2011;176:379–86.
[11] Barad Y, Eisenberg H, Horowitz M, Silberberg Y. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. Appl Phys Let 1997;70:922.
[12] Kyvelidou C, Sotiriou D, Antonopoulou T, Tsagkaraki M, Tserevelakis GJ, Filippidis G, et al. L-Carnitine affects preimplantation embryo development toward infertility in mice. Reproduction 2016;152:283–91.
[13] Michal G. Arachidonate metabolism and eicosanoids. In biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology. NY: John Wiley & Sons, Inc; 1999. pp288.
[14] Zare Z, Masteri Farahani R, Salehi M, Piryaei A, et al. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. J Assist Reprod Gen 2015;32:635–43.
[15] Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. Fertil Steril 2009;91:589–96.
[16] Horton MA. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". Int J Biochem Cell Biol 1997;29:721–5.
[17] Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. Development 1993;119:1175–86.
[18] Kito S, Hayao T, Noguchi-Kawasaki Y, Ohta Y, Hideki U, Tateno S. Improved in vitro fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. Comp Med 2004;54:564–70.