



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



*ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ*

ΦΩΤΕΙΝΗ Α. ΚΡΑΝΙΑ

Μοριακός Βιολόγος & Γενετίστρια, MSc

Υποψ. Διδάκτορας Π.Θ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής

Εισαγωγή

In vitro παραγωγή εμβρύων (IVP)

Περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ▶ Ωρίμανση των ωαρίων (*in vitro* maturation, IVM)
- ▶ Γονιμοποίηση ώριμων ωαρίων (*in vitro* fertilization, IVF) και
- ▶ Καλλιέργεια των εμβρύων (*in vitro* culture, IVC)

Εφαρμογές

Δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού εμβρύων με μειωμένο κόστος από επιλεγμένους γεννήτορες

Σημαντικό εργαλείο για τη βασική έρευνα

Βελτίωση των μεθόδων κρυοδιατήρησης εμβρύων

Κλωνοποίηση

Διαγονιδιακά ζώα

Χαμηλά αποτελέσματα IVP (~40% του αρχικού αριθμού των ωαρίων) ΓΙΑΤΙ?

Εισαγωγή

Παράγοντες που επηρεάζουν την IVP

- ▶ Η ηλικία και η κατάσταση του ζώου
- ▶ Το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων
- ▶ Η ποιότητα των ωαρίων, καθώς και
- ▶ Οι συνθήκες επώασης

(προσθήκη ή όχι ορμονών και ορού, φωτισμός, θερμοκρασία, σύσταση αερίων κλιβάνου κ.α.)

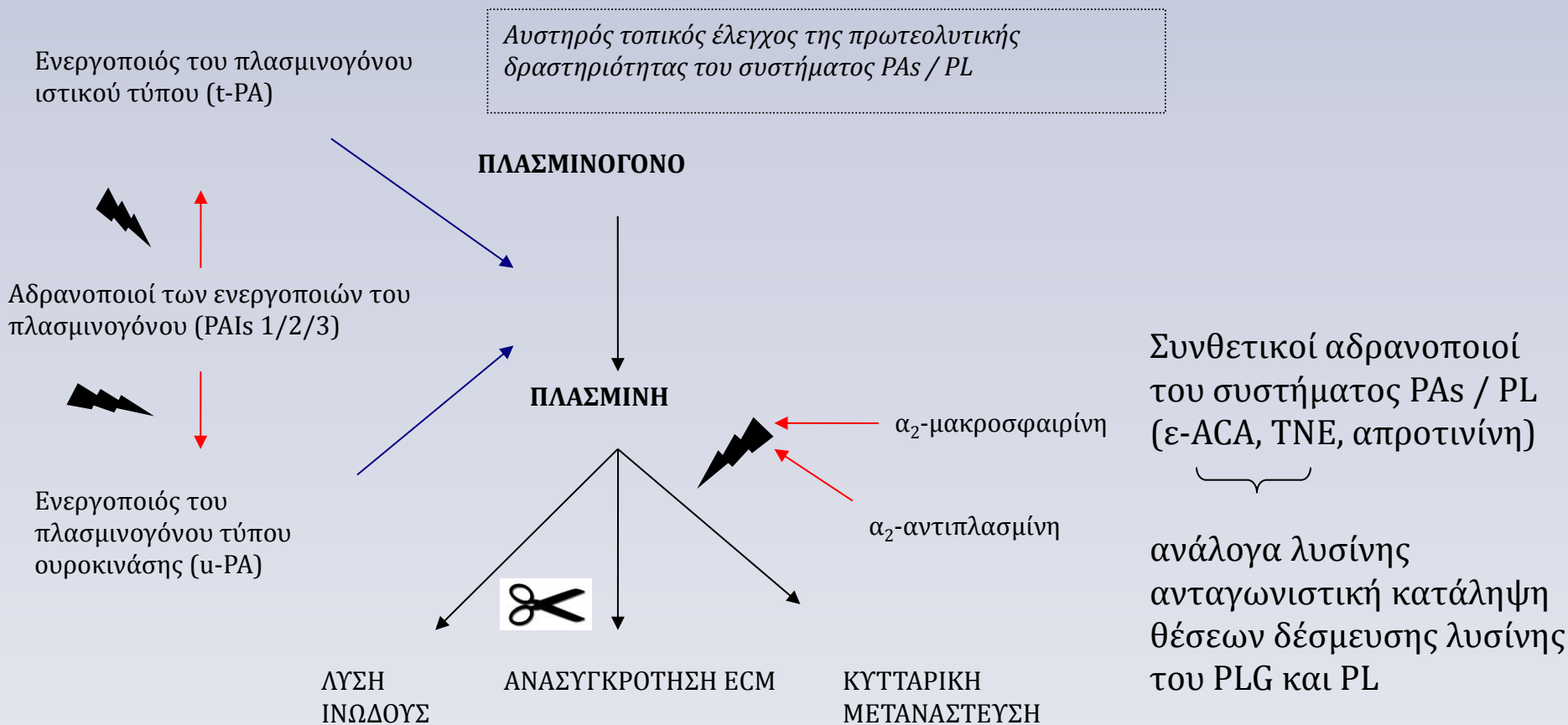
- ⊕ Πρώτη και πλέον αξιόπιστη επιλογή για τη μελέτη των μηχανισμών γονιμοποίησης και ανάπτυξης των πρώιμων εμβρύων



Εισαγωγή


Ενζυμικό σύστημα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου / πλασμίνης (σύστημα PAs / PL)

- ❖ Πρωτεολυτικό σύστημα
- ❖ Συμμετέχει σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες



Εισαγωγή

Ρόλος του συστήματος PAs / PL στην αναπαραγωγή

- ▶ Σπερματογένεση
- ▶ Ωρίμανση των ωαρίων
- ▶ Ανάπτυξη των ωοθυλακίων
- ▶ Ωοθυλακιορρηξία
- ▶ Γονιμοποίηση του ωαρίου 
- ▶ Εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο
- ▶ Πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη
- ▶ Παλινδρόμηση της μήτρας κατά τη λοχεία
- ▶ Λύση του ωχρού σωματίου
- ▶ Παλινδρόμηση του μαστικού αδένου

Πολυσύνθετη διαδικασία

- ✓ Μετακίνηση σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σύστημα του θήλεος
- ✓ Ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων
- ✓ Διείσδυση των σπερματοζωαρίων διαμέσου της πολυστιβάδας των κοκκωδών κυττάρων
- ✓ Σύνδεση και διάτρηση διαφανούς ζώνης


Συμμετοχή πρωτεολυτικών ενζύμων

όπως: ακροσίνη, υαλουρονιδάση, μεταλλοπρωτεϊνάσες και μέλη του **ενζυμικού συστήματος PAs - PL**

Σημαντικός ο ρόλος του t-PA

Εισαγωγή

Ρόλος του συστήματος PAs / PL στην αναπαραγωγή

- ▶ Σπερματογένεση
- ▶ Ωρίμανση των ωαρίων
- ▶ Ανάπτυξη των ωοθυλακίων
- ▶ Ωοθυλακιορρηξία
- ▶ Γονιμοποίηση του ωαρίου
- ▶ Εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδομήτριο
- ▶ **Πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη** 
- ▶ Παλινδρόμηση της μήτρας κατά τη λοχεία
- ▶ Λύση του ωχρού σωματίου
- ▶ Παλινδρόμηση του μαστικού αδένου

Συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου (αυλακώσεις)
Εμφάνιση κοιλότητας στη βλαστοκύστη
Ρήξη διαφανούς ζώνης (εκκόλαψη)
Εγκατάσταση στο ενδομήτριο

Σημαντικός ο ρόλος του u-PA

Ανίχνευση μεταγραφής του **u-PA** στα πρώιμα έμβρυα και δραστηριότητάς του στα υποστρώματα καλλιέργειας των εμβρύων

Σκοπός

Να διερευνηθεί:

- Η επίδραση της τροποποίησης του υποστρώματος γονιμοποίησης με προσθήκη t-PA (πείραμα 1^ο), και
- Η επίδραση της προσθήκης u-PA στο υπόστρωμα καλλιέργειας των εμβρύων (πείραμα 2^ο)
 - στο ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων
 - στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων
 - στη συνολική δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών τους είτε στα υποστρώματα της γονιμοποίησης είτε της καλλιέργειας των εμβρύων

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro παραγωγή εμβρύων (IVP)

Συλλογή Ωαρίων

Συλλογή ωοθηκών αγελάδων
αναρρόφηση ωοθυλακίων (2-8 mm)



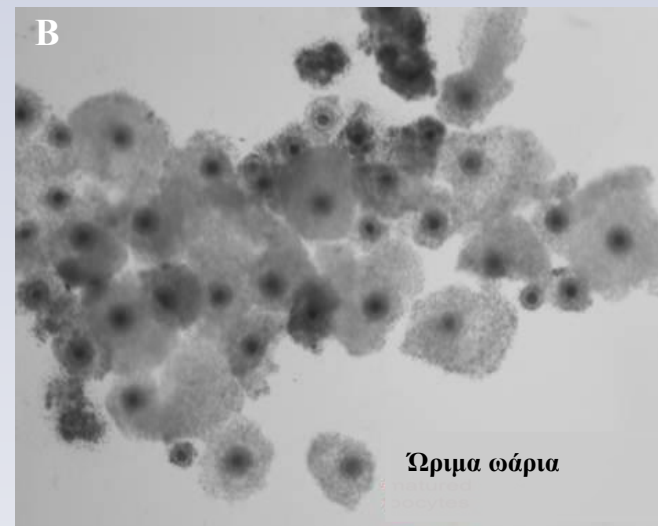
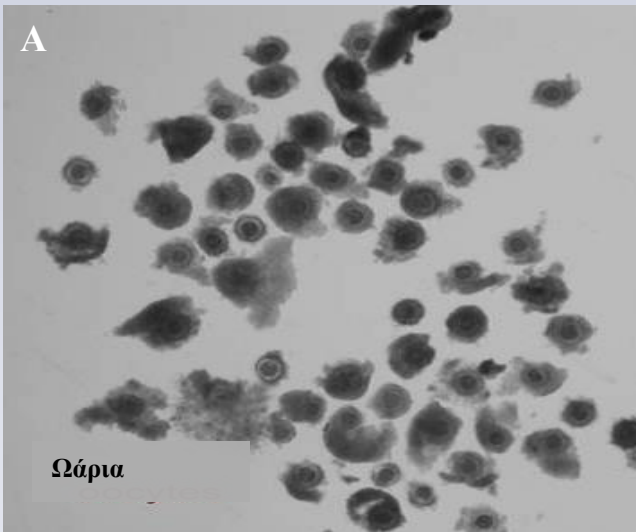
Επιλογή και συλλογή συμπλεγμάτων
ωαρίων- ωοφόρου δίσκου
(Cumulus-Oocytes Complexes, COCs)



Υλικά και Μέθοδοι

In vitro ωρίμανση (IVM) ωαρίων

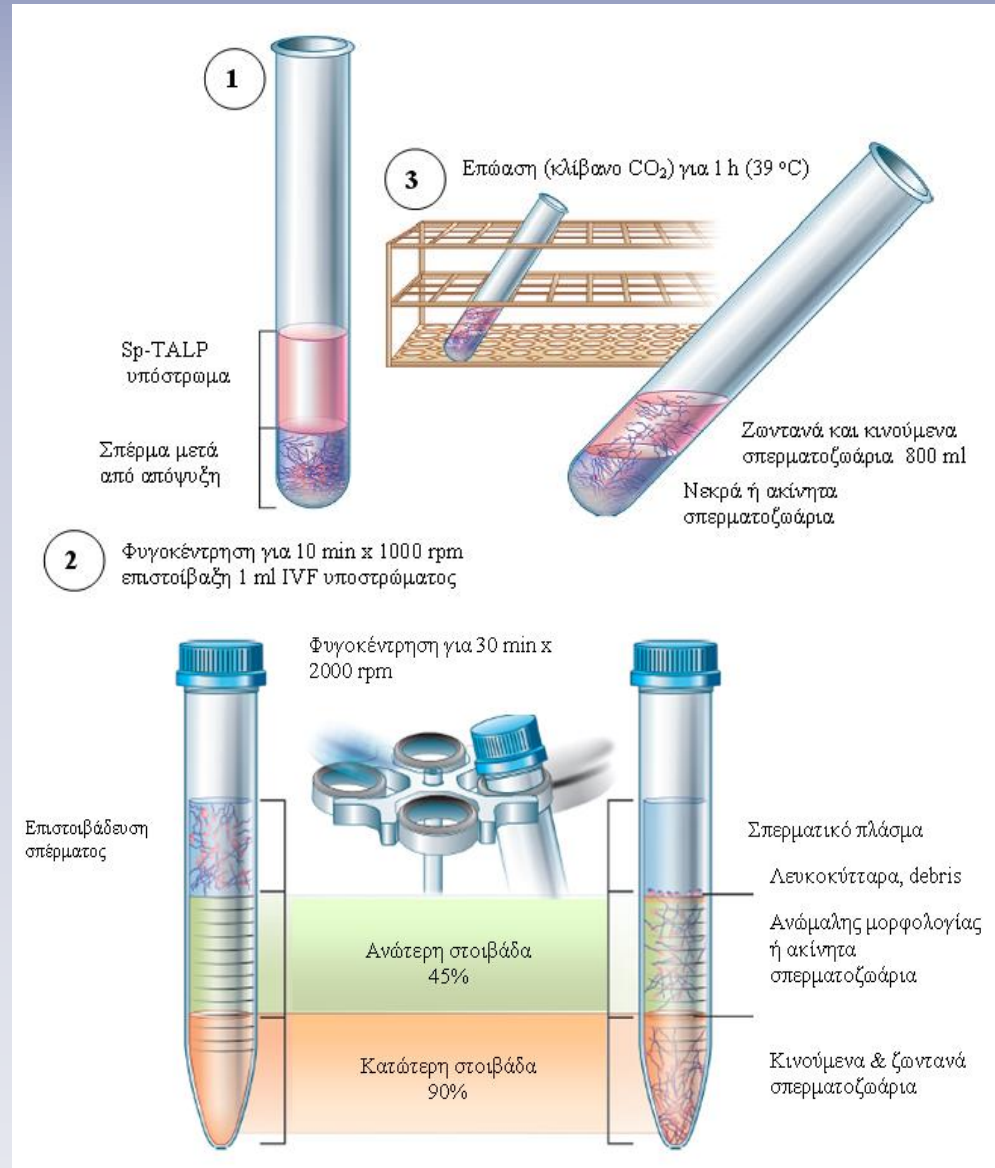
Ομάδες 50-55 COCs ωρίμασαν για 24 h σε TCM199 (+10 ng/ml EGF και 10% v/v FCS) στους 39 °C με συνθήκες επώασης 5% CO₂ και max υγρασία



Υλικά και Μέθοδοι

Επεξεργασία σπέρματος και ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων

- Swim-up



- **Φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας (Percoll)**

Υλικά και Μέθοδοι

In vitro γονιμοποίηση (IVF)

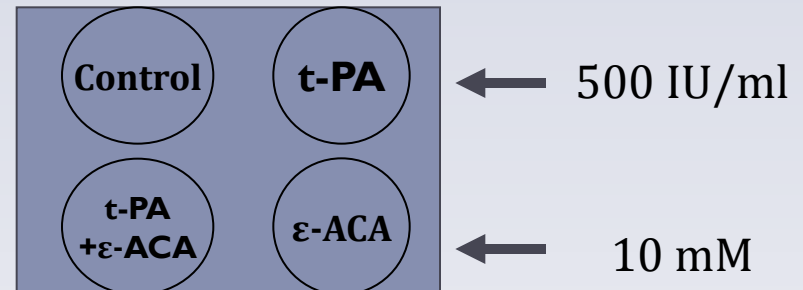
Προσδιορισμός συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων



Τα ώριμα ωάρια επωάζονταν με κατάλληλη ποσότητα από το τελικό διάλυμα του σπέρματος (1×10^6 σπερματοζωάρια/ml) για 22-24 h (39 °C, 5% CO₂ και μέγιστη υγρασία)



(Τροποποίηση με t-PA - Πείραμα 1^ο)



Υλικά και Μέθοδοι

In vitro καλλιέργεια (IVC) εμβρύων

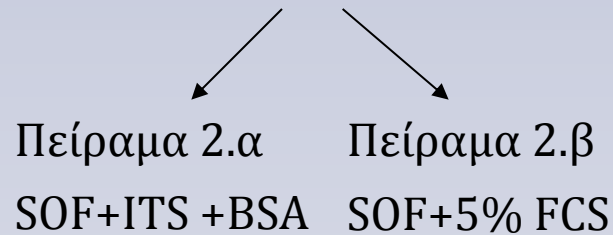
- ▶ **Πείραμα 1^ο:** Όλα τα πιθανά γονιμοποιημένα ωάρια απογυμνώθηκαν από τα κοκκώδη κύτταρα και μεταφέρθηκαν ανά ομάδες των 25 σε 25 μl μικροσταγόνες συνθετικό υγρό ωαγωγού [SOF+5% FCS] κάλυψη με παραφινέλαιο



Συνθήκες επώασης:

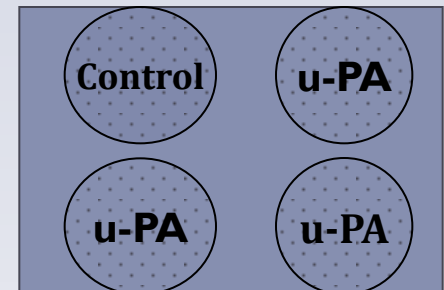
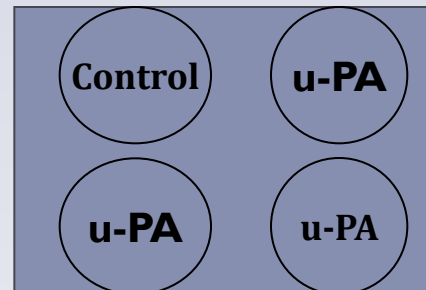
39 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂
και max υγρασία

- ▶ **Πείραμα 2^ο:** Μόνο τα εν δυνάμει γονιμοποιημένα ωάρια απογυμνώθηκαν από τα κοκκώδη κύτταρα και μεταφέρθηκαν ανά ομάδες των 25 σε 400 μl συνθετικό υγρό ωαγωγού (SOF)



Καλλιέργεια εμβρύων σε
στιβάδα **CC+**

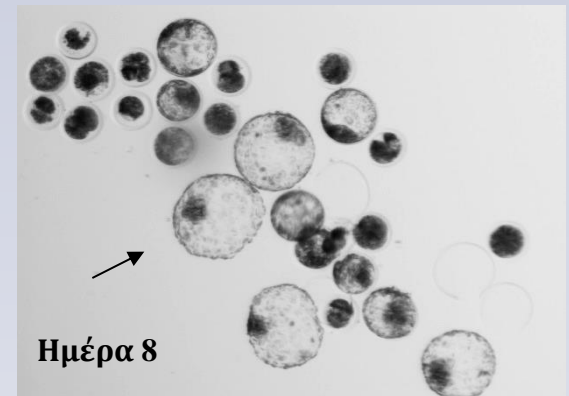
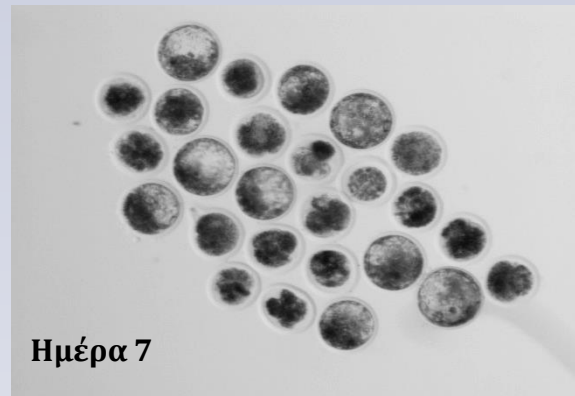
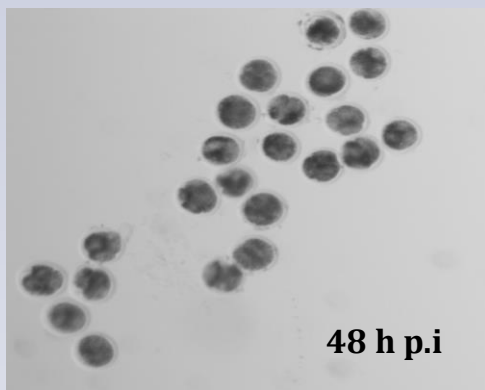
Τροποποίηση της IVC με 5 IU/ml u-PA



Υλικά και Μέθοδοι

Εκτίμηση ποσοστών αυλάκωσης και παραγωγής βλαστοκύστεων

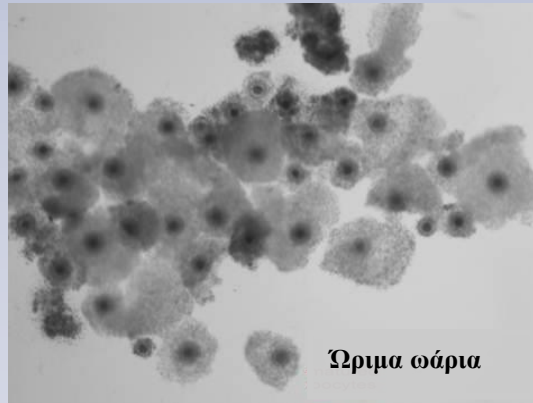
Ο έλεγχος του ποσοστού αυλάκωσης των εμβρύων εκτιμήθηκε 48 h από την ημέρα γονιμοποίησης (p.i) και το ποσοστό των παραγόμενων βλαστοκύστεων την ημέρα 7 και 8 (p.i)



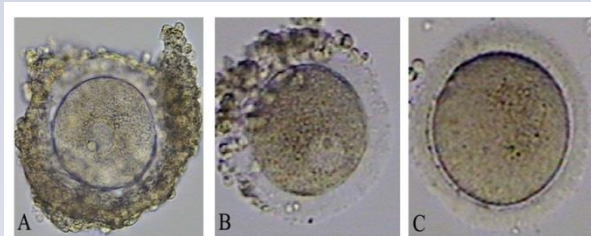
- ▶ Κατάψυξη μοριδίων ημέρας 3 και 4 για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Πείραμα 1^ο)
- ▶ Κατάψυξη βλαστοκύστεων ημέρας 7 για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (Πείραμα 1^ο και 2^ο)
- ▶ Διατήρηση υποστρωμάτων της IVC (ημέρα 7) για προσδιορισμό PAA/PAI (Πείραμα 2^ο)

Υλικά και Μέθοδοι

Προετοιμασία στιβάδας κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (cumulus cells monolayer)

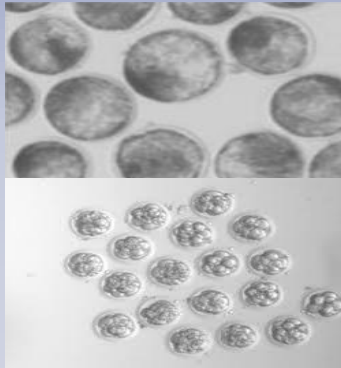


- ▶ Απογύμνωση κυττάρων με μηχανικό τρόπο
- ▶ Αφαίρεση ωαρίων και συλλογή κυττάρων σε κωνικό erpendorf
- ▶ Ήπια φυγοκέντρωση (750 x rpm, 10 min)
- ▶ Επανασύσταση κυττάρων (ίζημα) σε SOF+5% FCS
- ▶ Τοποθέτηση σε 4-well plates
- ▶ Επώαση σε κλίβανο 5% CO₂ για 24 h



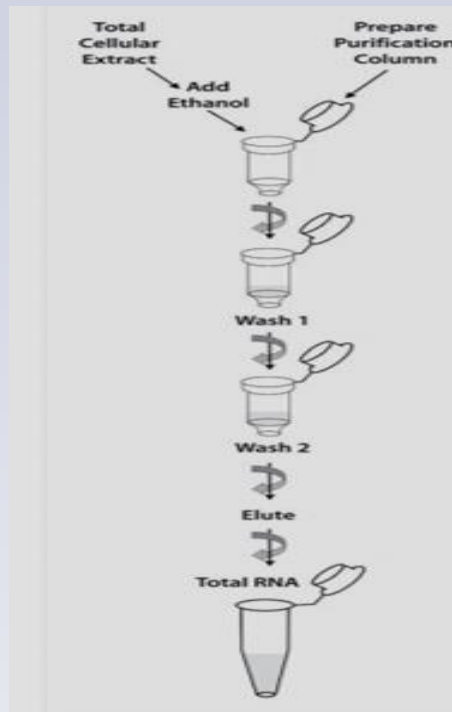
Εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων

Στάδιο 1^ο: Απομόνωση και έκλουση ολικού RNA εμβρύων



Βλαστοκύστες (N=5) ή μορίδια (N=6) σε PBS

1. Φυγοκέντρηση 3000 x g για 3 min
2. Αφαίρεση υπερκείμενου διαλύματος
3. Προσθήκη διαλύματος έκλουσης
4. Επώαση στους 42 °C για 30 min



DNase treatment

Εξάλειψη πιθανού gDNA με τη δράση της DNase I

Εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων

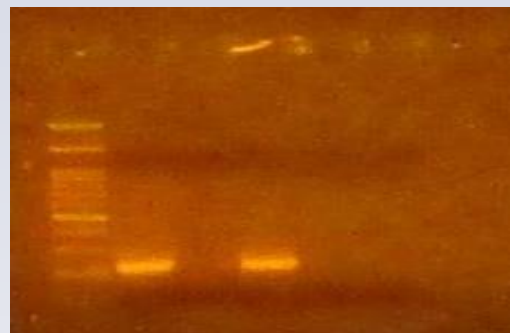
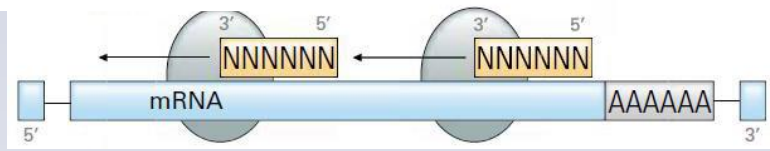
Στάδιο 2^ο: Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)



- Total RNA
- 1x RT διάλυμα
- 4 mM μίγμα dNTPs
- 1x RT τυχαίων εκκινητών
- 1 U αναστολέα των RNασών
- 1 U RTase για RT⁺ (όχι για RT⁻)

⇒ Επώαση σε κατάλληλες συνθήκες

Τυχαίοι εκκινητές

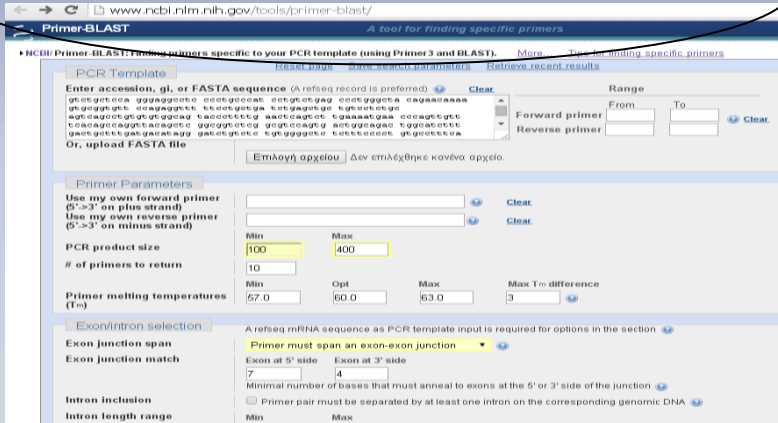


Ladder RT⁺ RT⁻ RT⁺ RT⁻ NTC

⇒ 2 αντιδράσεις RT (RT⁺ και RT⁻), με προσθήκη ή όχι του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.
Έλεγχος τυχόν επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων

1) Σχεδιασμός εκκινητών όλων των υπό μελέτη γονιδίων



2) Επιλογή των τριών σταθερότερων γονιδίων σε κάθε πείραμα (geNorm)

The image shows the geNorm software interface. It displays a table with columns for gene names (18rRNA, H2a.z, GAPDH, YWHAZ, SDHA) and a 'Normalisation Factor' column. The values are color-coded: red for high values, green for low values, and yellow for intermediate values.

Change Data	18rRNA	H2a.z	GAPDH	YWHAZ	SDHA	Normalisation Factor
modif a	1,00E+00	4,35E-01	6,74E-01	4,32E-01	9,73E-01	0,8511
modif b	5,07E-01	1,00E+00	7,68E-01	6,51E-01	8,89E-01	0,9602
modif c	8,18E-01	9,27E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,2238
M < 1,5	0,756	0,675	0,425	0,548	0,497	

3) Προετοιμασία των αντιδράσεων RT-PCR και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων

Πρώτα προστίθεται το ζεύγος των εκκινητών για κάθε υπό μελέτη γονίδιο



Master Mix

(εμβρυϊκό cDNA, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix-Universal, BSA και ddH₂O)



RT-PCR πρόγραμμα:

- ❖ ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών
- ❖ δημιουργία καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων

Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Ενδογενή γονίδια

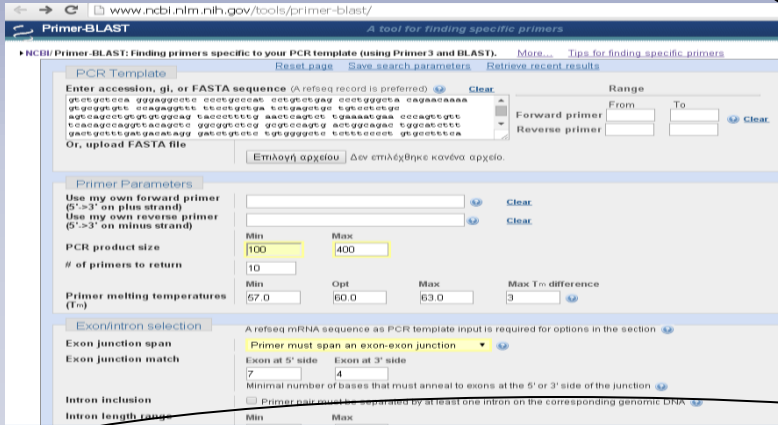
Βλαστοκύστεις

Μορίδια

<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HK)	NM_001034034	(F) 5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3' (R) 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	123
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex, subunitA flavoprotein (Fp) (HK)	NM_174178.2	(F) 5'-GCAGAACCTGATGCTTTGTG-3' (R) 5'-CGTAGGAGAGCGTGTGCTT-3'	185
<i>YWHAZ</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (HK)	NM_174814.2	(F) 5'-GCATCCACAGACTATTTC-3' (R) 5'-GCAAAGACAATGACAGACCA-3'	120
<i>18srRNA</i>	18s ribosomal RNA (HK)	NR_036642	(F) 5'-CCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGT-3' (R) 5'-CGCCGATCCAAGAATTCACCTCT-3'	222
<i>H2a.z</i>	H2A histone family, member Z (HK)	NM_174809	(F) 5'-AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG-3' (R) 5'-CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG-3'	208
<i>PLAC8</i>	placenta-specific 8	NM_001076987	(F) 5'-AATGAATGCTGTCTGTGCGGAAC-3' (R) 5'-AGTGCATTGGCTCTCCTTCTG-3'	167
<i>AKR1B1</i>	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	NM_001012519	(F) 5'-AGGAGAAAAGTGGTGAAGCGTGAG-3' (R) 5'-ATGAGGTAGAGGTCCAGGTAGTCC-3'	138
<i>BIRC5</i> ή <i>Survivin</i>	baculoviral IAP repeat containing 5	NM_001001855	(F) 5'-GCCGTCAACCGCTGGATTTG-3' (R) 5'-CGTTCTCAGTGGACAGTGGATG-3'	198
<i>BBC3</i> ή <i>PUMA</i>	BCL2 binding component 3	XM_002695182.2	(F) 5'-CATGAAGAGCAAATGAGCCAAACG-3' (R) 5'-GCAGAGCACAGGATTCACAGTC-3'	193
<i>PTGS-2</i> ή <i>COX-2</i>	Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase 2	NM_174445	(F) 5'-TCTGGTGCTGGTCTGATGATG-3' (R) 5'-GGATTAGCCTGTTGTCTGGAAC-3'	127
<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	NM_001077486	(F) 5'-TGACTGTGGCTGGTGTGGTTC-3' (R) 5'-CAATGGTGGCTGGACGGAGAG-3'	123
<i>SLC2A5</i> ή <i>GLUT-5</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	NM_001101042	(F) 5'-ATAGCTGCCTTTGGGTCGTC-3' (R) 5'-CAGCAAGGTTCTTTCTGCC-3'	243
<i>SOD2</i> ή <i>MnSOD</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_201527	(F) 5'-GCACCACAGCAAGCACAC-3' (R) 5'-GGGCTCAGATTTGTCCAGAAGATG-3'	156
<i>PLAUR</i>	Plasminogen activator, urokinase receptor	NM_174423.3	(F) 5'-GTCCTGAGTGTGTGGGAAGG-3' (R) 5'-CAGTAGCATCTCGACCAGGG-3'	177
<i>PLG</i>	plasminogen	NM_173951	(F) 5'-GGCGGTGGTGTTCCTACTTCTC-3' (R) 5'-GTCTGTCTCCTCCTCACACTTGG-3'	163
<i>Bax</i>	BCL2-associated X protein	NM_173894.1	(F) 5'-ACATGGAGCTGCAGAGGATG-3' (R) 5'-CTGATCAACTCGGGCACCTT-3'	184
<i>PIPOX</i>	pipecolic acid oxidase or peroxisomal sarcosine oxidase	NM_001014878.2	(F) 5'-TGACGCCATTGTGATCGGG-3' (R) 5'-GTCCAGTCTGCCTGTATAATTGG-3'	251
<i>G6PD</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_001244135.1	(F) 5'-CTCCTACAAGCGCCTCAACA-3' (R) 5'-ACGGCTTCTCCACGATGATG-3'	170
<i>KAT2B</i> ή <i>PCAF</i>	K (lysine) acetyltransferase 2B	XM_002684716.3	(F) 5'-TCTACCCGGGACTTTCTGT-3' (R) 5'-GCGCTTTGATGGCTCTTAC-3'	184

Εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων

1) Σχεδιασμός εκκινητών όλων των υπό μελέτη γονιδίων



2) Επιλογή των τριών σταθερότερων HK σε κάθε πείραμα (geNorm)

Change Data	18rRNA	H2a.z	GAPDH	YWHAZ	SDHA	Normalisation Factor
modif a	1,00E+00	4,35E-01	6,74E-01	4,32E-01	9,73E-01	0,8511
modif b	5,07E-01	1,00E+00	7,68E-01	6,51E-01	8,89E-01	0,9602
modif c	8,18E-01	9,27E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,2238
M < 1,5	0,756	0,675	0,425	0,548	0,497	

3) Προετοιμασία των αντιδράσεων RT-PCR και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων

Πρώτα προστίθεται το ζεύγος των εκκινητών για κάθε υπό μελέτη γονίδιο



Master Mix

(εμβρυϊκό cDNA, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix-Universal, BSA και ddH₂O)



RT-PCR πρόγραμμα:

- ❖ ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών
- ❖ δημιουργία καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων

→ Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Υλικά και Μέθοδοι

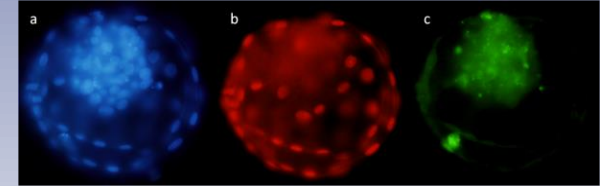
Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAA) και των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI)

- ▶ Η PAA και PAI προσδιορίσθηκε στα υποστρώματα IVF και IVC με φασματοφωτομετρική μέθοδο, με τη βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251
- ▶ Μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm
- ▶ Χρήση πρότυπων καμπυλών: IU t-PA ή IU u-PA / 0,1 ml δείγματος

Υλικά και Μέθοδοι

Διαφορική χρώση των κυττάρων του εμβρύου (differential cell staining)

Σύμφωνα με τη μέθοδο των Wydooghe και συν., 2011



Μονιμοποίηση βλαστοκύστεων (N=10)

Αύξηση διαπερατότητας στη χρώση

Αποδιάταξη DNA βλαστομεριδίων και πρόσδεση φθορίζουσών ουσιών

1^ο αντίσωμα: CDX-2 (μεταγραφικός παράγοντας για διαφοροποίηση TE)

1^ο αντίσωμα: anti-caspase-3 (βασικός παράγοντας της απόπτωσης)

2^ο αντίσωμα (για CDX-2): goat-anti mouse TexRed -φθορίζουσα κόκκινη χρωστική-

2^ο αντίσωμα (για anti-caspase-3): goat anti-Rabbit FITC -φθορίζουσα πράσινη χρωστική-

Χρώση με Hoechst 33,342 (πυρήνας όλων των κυττάρων, ICM + TE)

Εκτίμηση χρώσης των εμβρύων σε μικροσκόπιο φθορισμού (τριπλό φίλτρο φθορισμού για DAPI, FITC και Texas Red)

Υλικά και Μέθοδοι

Στατιστική ανάλυση

- ▶ Μέθοδος ανάλυσης διασποράς με ένα παράγοντα (one-way ANOVA)

Τεχνικές πολλαπλών συγκρίσεων κατά Dunkan και κατά Tukey (post hoc tests)

- ▶ Δοκιμασία του χ^2 (chi square test)
- ▶ t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα
- ▶ Ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης (Linear regression analysis) → έλεγχος πιθανότητας γραμμικής συσχέτισης των δύο μεταβλητών

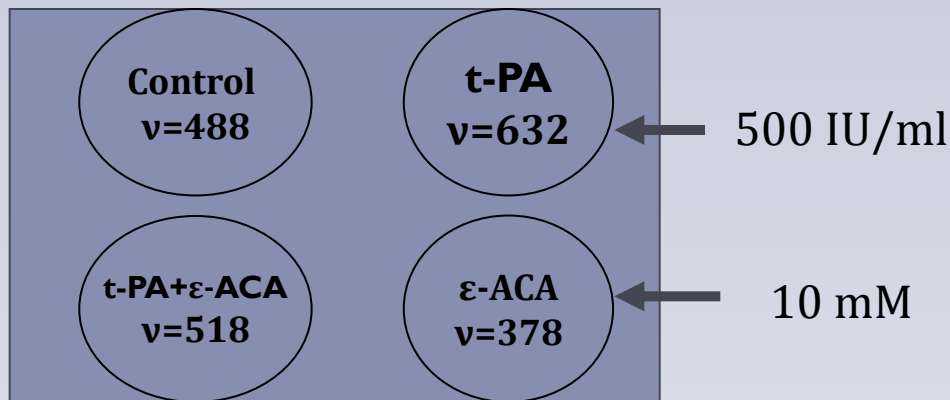
Σε κάθε περίπτωση:

Όταν $P < 0,05$ θεωρείται σημαντικό

Πείραμα 1^ο – Πειραματικός Σχεδιασμός

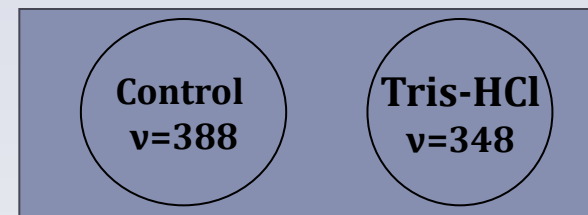
Τροποποίηση του υποστρώματος γονιμοποίησης με προσθήκη 500 IU/ml t-PA

- Συνολικά έγιναν 10 πειραματικές επαναλήψεις
- Χρησιμοποιήθηκαν 2016 ώρια

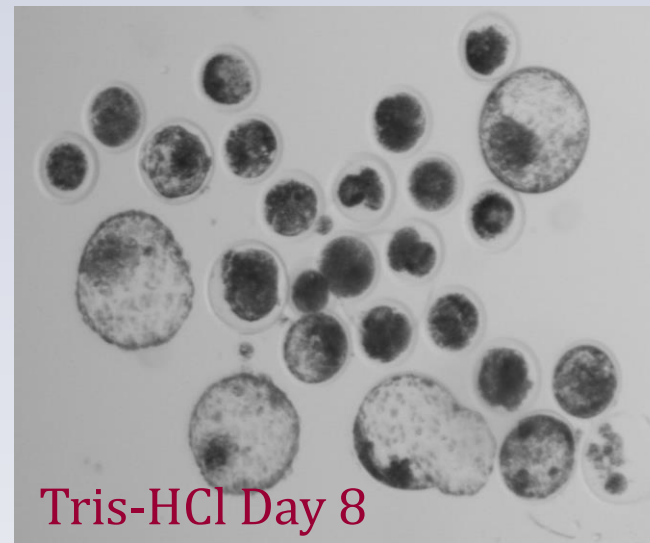
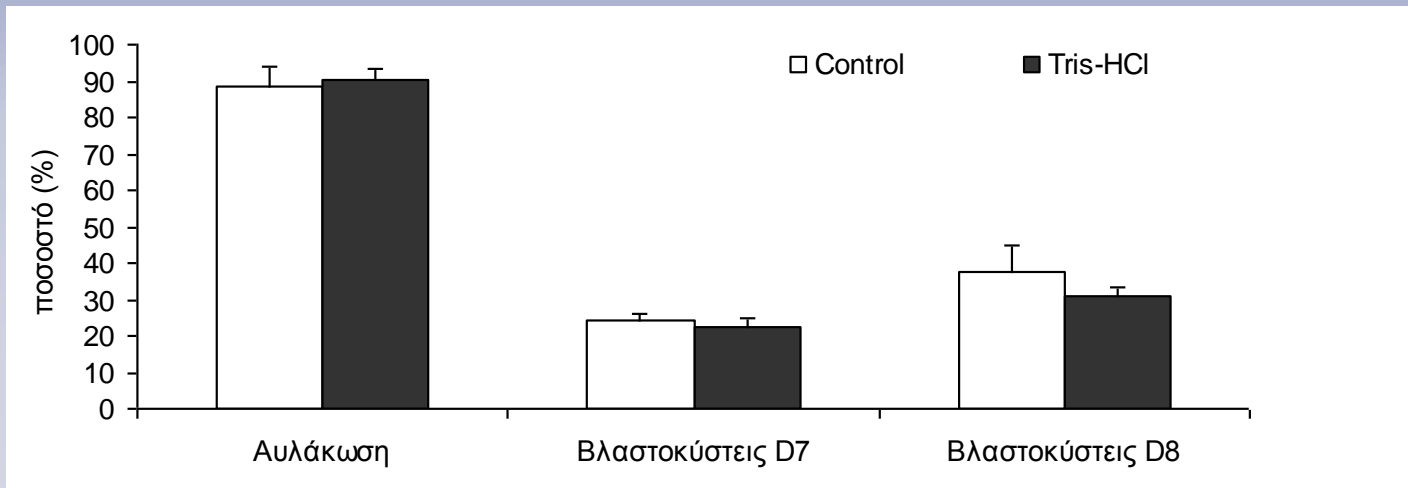


Διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης Tris-HCl (0,002 M, p.H 7,4) στην IVF (διαλύτης του t-PA)

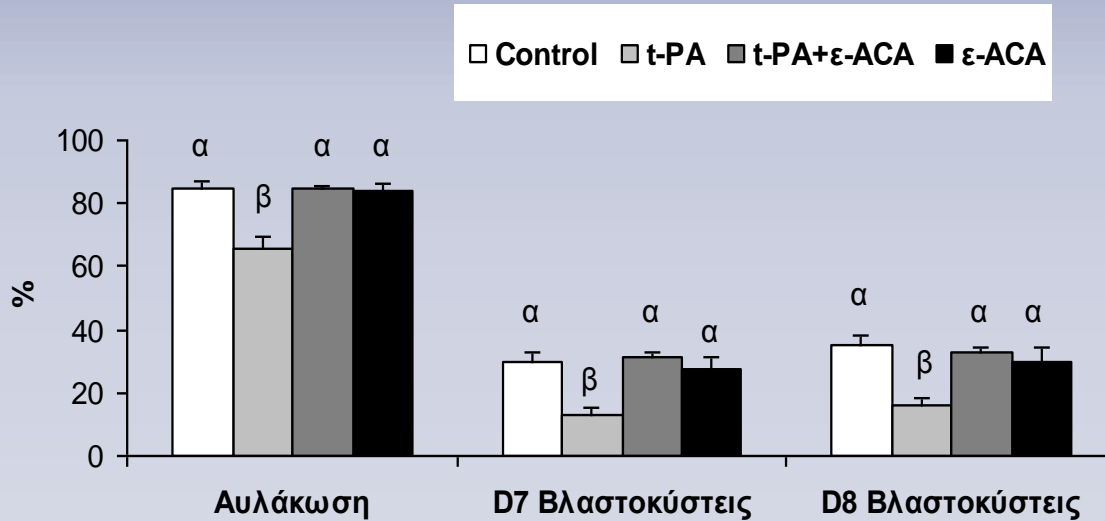
- Συνολικά 4 επαναλήψεις
- Χρησιμοποιήθηκαν 736 ώρια



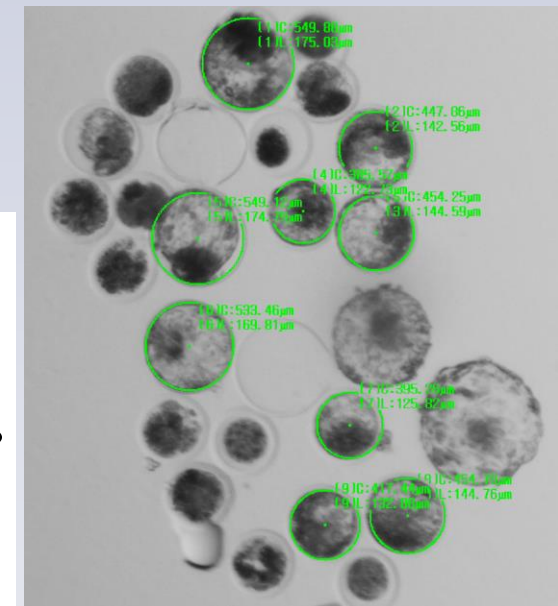
Επίδραση της προσθήκης Tris-HCl στο υπόστρωμα της IVF στα αποτελέσματα της IVP



Τροποποίηση του υποστρώματος της IVF με προσθήκη t-PA, ε-ACA και t-PA+ε-ACA



Ομάδα	Αριθμός βλαστοκύστεων	Διάμετρος (μm)
Control	26	186,1 ± 5,8
t-PA	19	194,5 ± 8,6
t-PA+ε-ACA	38	194,7 ± 4,5
ε-ACA	18	191,5 ± 7,9

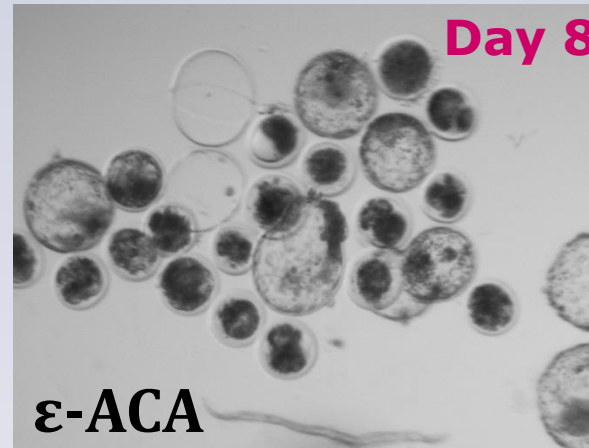
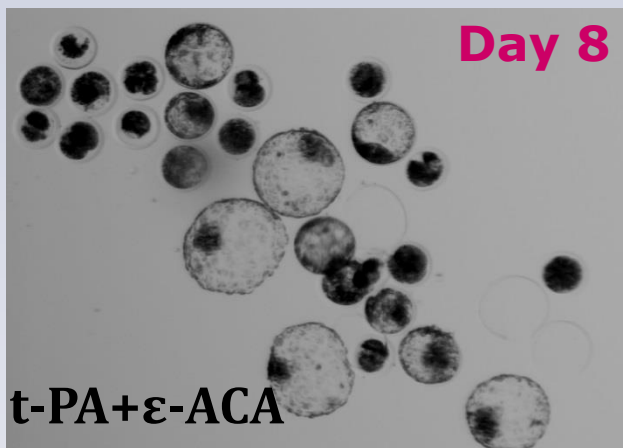
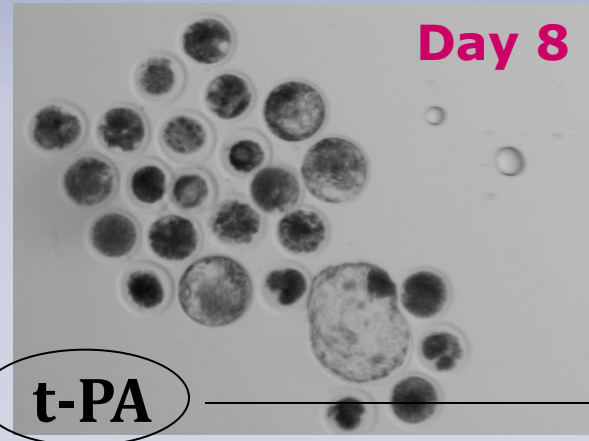
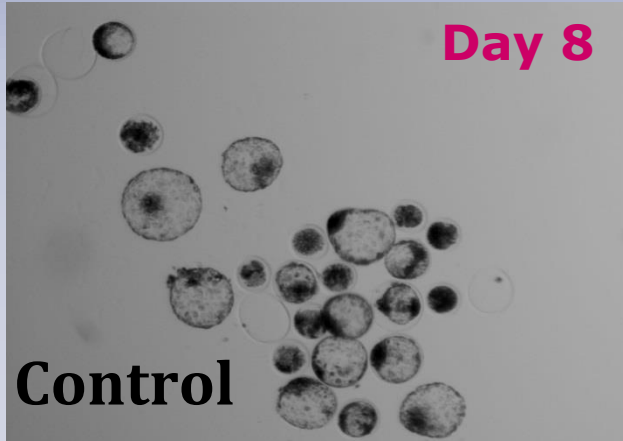


Ομάδα	Αριθ. Ζυγωτών	Αυλάκωση (%)	D7 Βλαστοκύστες (%)	D8 Βλαστοκύστες (%)
Control	488	84.8 ± 2.5 ^α	30.1 ± 2.9 ^α	35 ± 2.9 ^α
t-PA	632	65.8 ± 3.8 ^β	13.3 ± 2.2 ^β	15.8 ± 2.4 ^β
t-PA + ε-ACA	518	84.7 ± 1.1 ^α	31.3 ± 1.7 ^α	32.7 ± 1.4 ^α
ε-ACA	378	84.3 ± 2 ^α	27.4 ± 4.2 ^α	29.5 ± 4.7 ^α

Αποτελέσματα 1^{ου} πειράματος

t-PA

Τροποποίηση του υποστρώματος της IVF με προσθήκη t-PA, ε-ACA και t-PA+ε-ACA

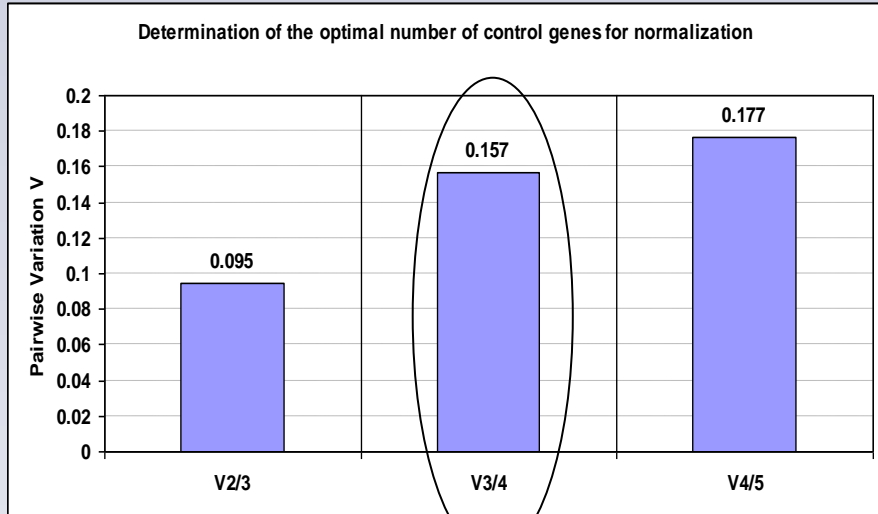
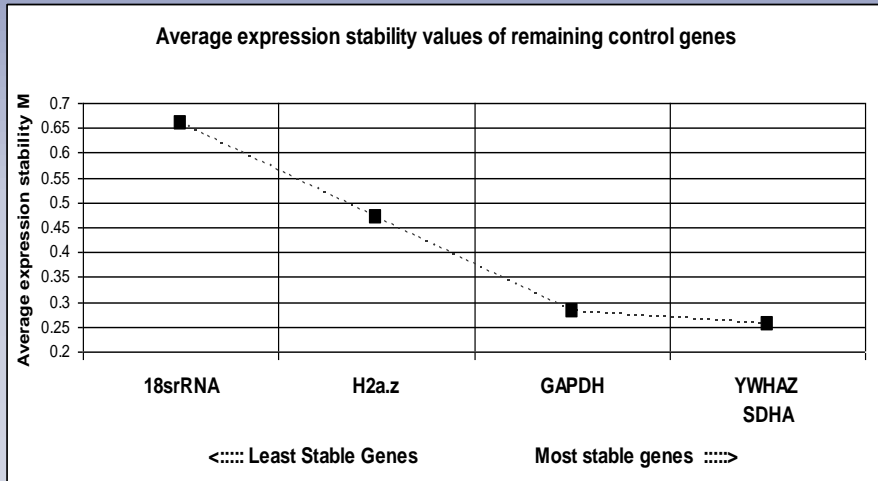


Αποτυχία εμβρύων για περαιτέρω ανάπτυξη.

Γιατί?

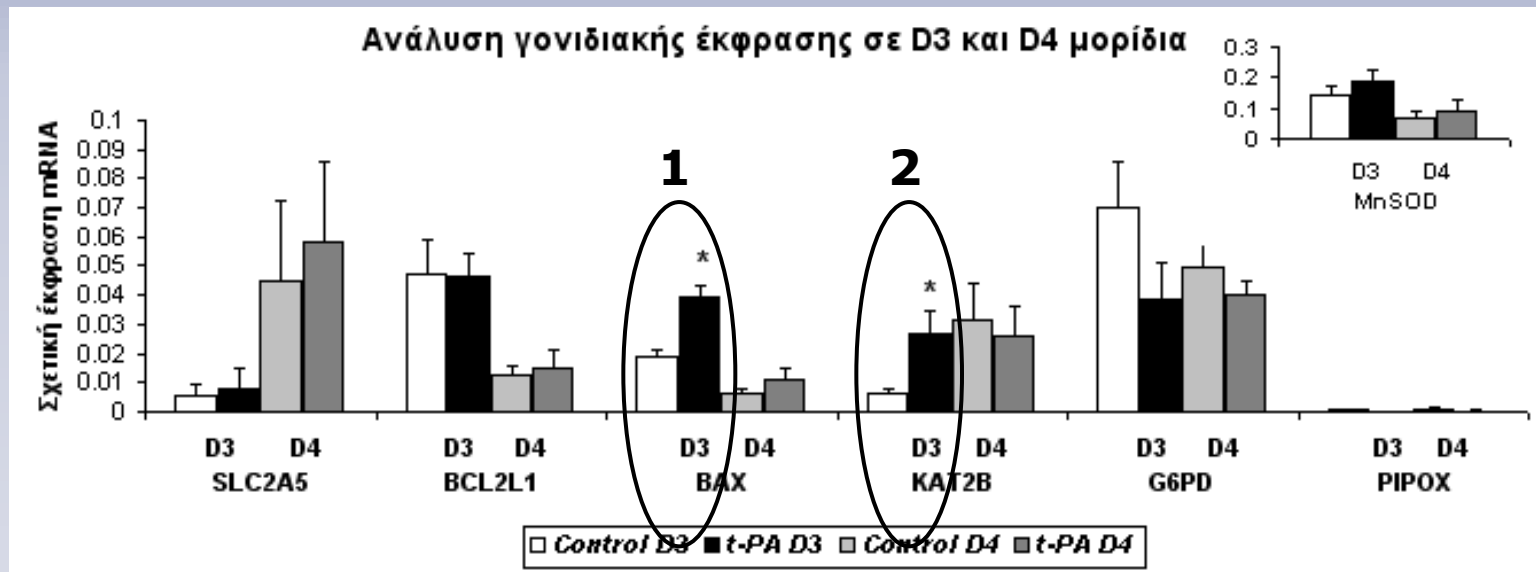
Έλεγχος μεταγραφικής δραστηριότητας στο στάδιο ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος (στάδιο της μείζονος ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος 8-16 κύτταρα)

Έλεγχος σταθερότητας γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes)



- ▶ Η κάθε τροποποίηση είναι δυνατόν να μεταβάλλει τη σταθερότητα των housekeeping genes
- ▶ Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα geNorm-γεωμετρικός μέσος όρος των housekeeping genes

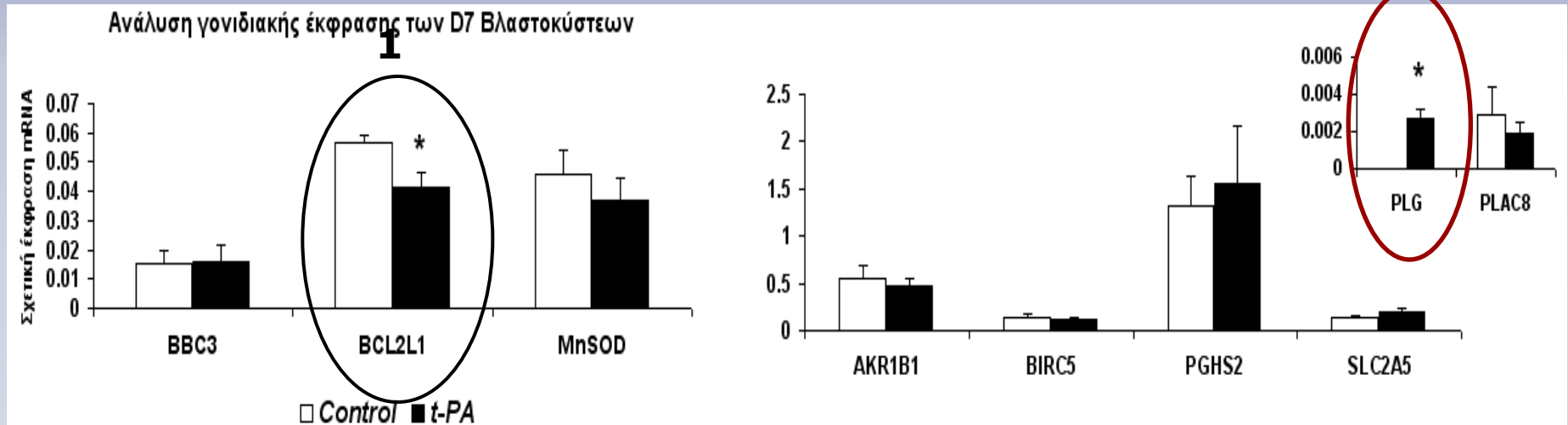
Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των εμβρύων πρώιμου σταδίου [μορίδια ημέρας 3 και 4 (D3 και D4)]



1. Αυξημένη έκφραση του προ-αποπτωτικού γονιδίου **BAX** μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο στο θάνατο μέσω της συμμετοχής του στη διαδικασία της απόπτωσης.

2. Επαγωγή της έκφρασης του **KAT2B** στα τροποποιημένα έμβρυα → αυξημένη δραστηριότητα ακετυλίωσης των ιστονών, η οποία έχει βρεθεί πως συσχετίζεται με διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση.

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7)



1. Υπόεκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου **BCL2L1** ($P = 0,01$)

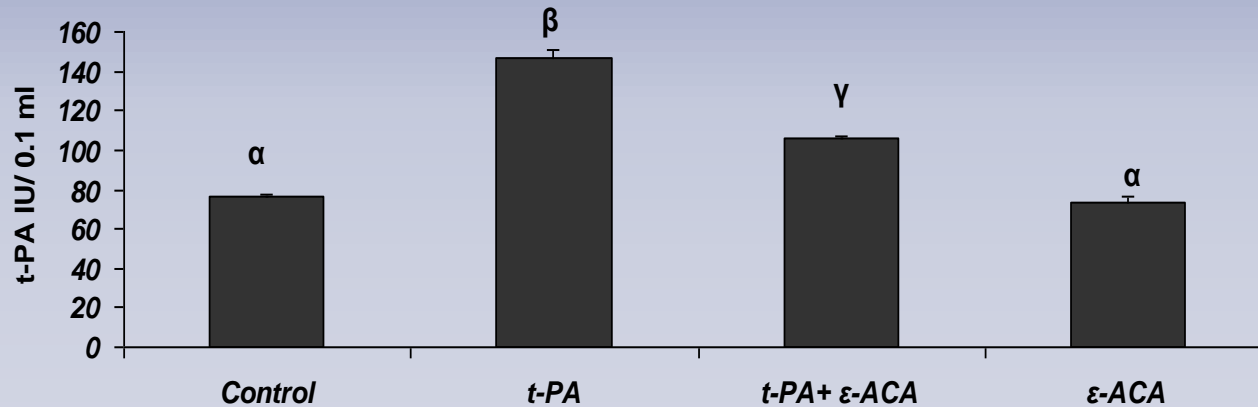
■ Μειωμένη αντίσταση του εμβρύου στην απόπτωση?

2. **Απουσία μεταγραφής** του γονιδίου **PLG** στα έμβρυα-μάρτυρες και **υπερέκφρασή** του στην τροποποιημένη ομάδα των εμβρύων ($P = 0,032$)

■ Πιθανή αλλαγή στην έκφραση και άλλων μελών του συστήματος·

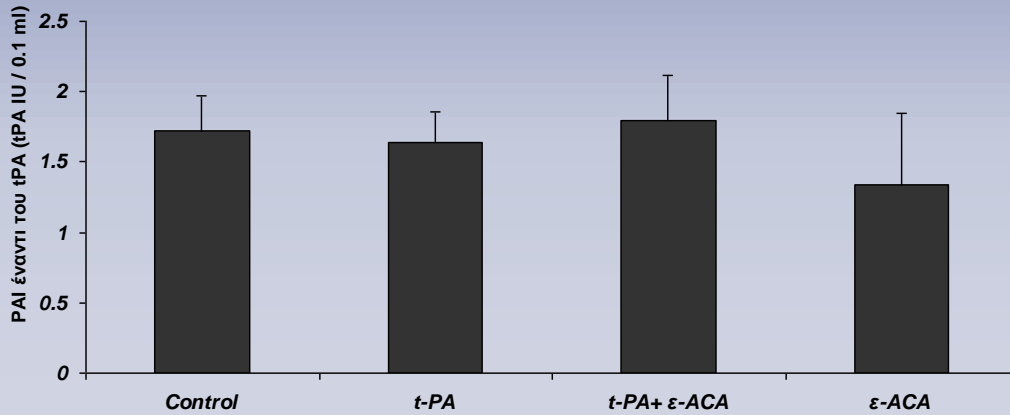
σημαντικός ο ρόλος τους στην επιβίωση, στην εκκόλαψη και εγκατάσταση των εμβρύων

Προσδιορισμός της PAA στα υποστρώματα της IVF

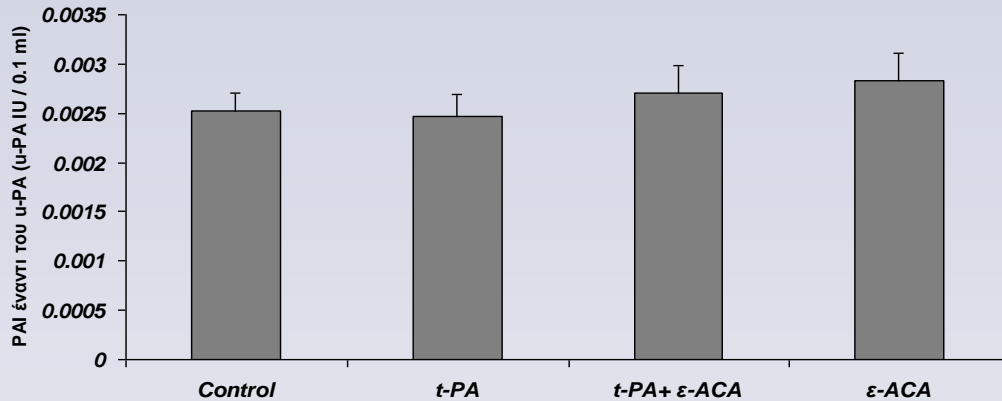


- ✚ Η προσθήκη του ε-ACA (+t-PA) δεν εξουδετέρωσε πλήρως τη δραστηριότητα του t-PA που προστέθηκε
 - Μήπως υπάρχει ένα κατώφλι στη δραστηριότητα του ενζύμου, πάνω από το οποίο να εμφανίζεται/ασκείται η επίδραση του t-PA στα ποσοστά αυλάκωσης ή σχηματισμού βλαστοκύστεων?
- ✚ Ο σχηματισμός της πλασμίνης δεν εξουδετερώθηκε πλήρως από την προσθήκη του ε-ACA

Προσδιορισμός της PAI στα υποστρώματα της IVF



Καμία διαφορά στην PAI ($P > 0,05$)



Δημοσίευση αποτελεσμάτων 1^{ου} πειράματος

Reproduction in Domestic Animals

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/rda.12456

ISSN 0936-6768

Effects of Addition of Tissue-Type Plasminogen Activator in *In Vitro* Fertilization Medium on Bovine Embryo Development and Quality

F Krania¹, E Dovolou¹, CA Rekkas², EK Theodosiadou³, I Pappas⁴ and GS Amiridis¹

¹*Clinic of Obstetrics and Reproduction, Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece;* ²*Veterinary Research Institute, HAO – ‘DEMETER’ (former NAGREF), Themi-Thessaloniki, Greece;* ³*Department of Physiology, Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece;* ⁴*Department of Pharmacology, Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece*

Ανακοίνωση σε Εθνικό Συνέδριο



Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ - ΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ (t-PA) ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΗΣ ΙΝ ΝΙΤΡΟ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ (IVF): ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ

Φ.Κρανιά¹, Ε. Ντόβολου¹, Α. Θεοδοσιάδου², Ι.Σ Παππάς³, Κ.Α Ρέκκας⁴ και Γ.Σ Αμοιριδής¹

¹Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, ²Εργαστήριο Φυσιολογίας των ζώων,

³Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα

⁴Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛΓΟ -Δήμητρα, Θέρμη- Θεσσαλονίκη



Πείραμα 2^ο – Πειραματικός Σχεδιασμός

Τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με 5 IU/ml u-PA

Μελέτη της δράσης του u-PA σε 2 ανεξάρτητα πειράματα:

Πείραμα 2.α:

Σε απογυμνωμένα έμβρυα
(καλλιέργεια σε ημι-
καθορισμένες συνθήκες,
SOF+ITS)

8 επαναλήψεις (1631 πιθανά ζυγωτά)

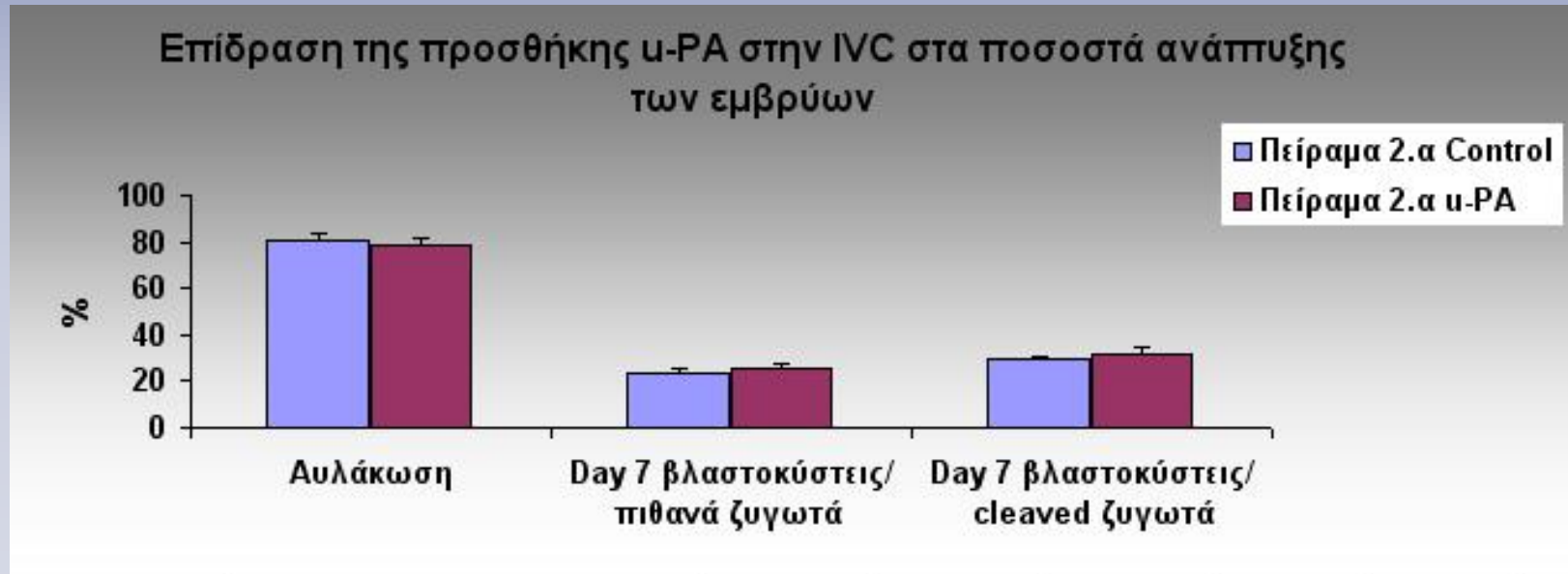
Πείραμα 2.β:

Σε έμβρυα, τα οποία
καλλιεργήθηκαν πάνω σε μια
στιβάδα κυττάρων του
ωοφόρου δίσκου (μη
προσδιορισμένες συνθήκες
καλλιέργειας, SOF+FCS)

6 επαναλήψεις (629 πιθανά ζυγωτά)

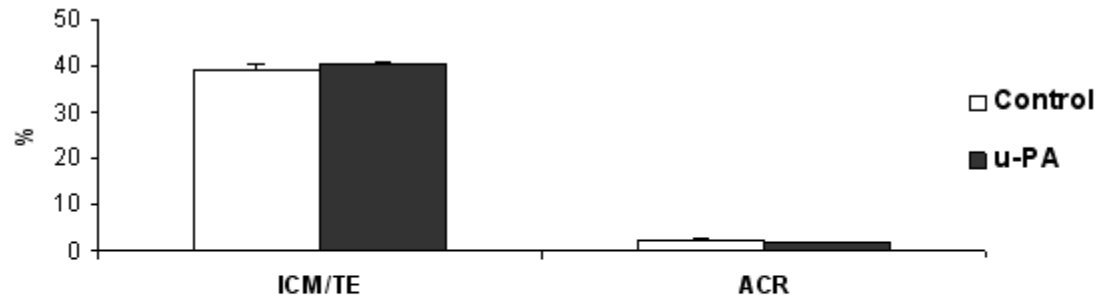
Αποτελέσματα IVP

Πείραμα 2.α ημι-καθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας



Πείραμα	Ομάδα	Αρ. πιθανών ζυγωτών	Αυλάκωση (%)	Day 7 βλαστοκύστεις/πιθανά ζυγωτά (%)	Day 7 βλαστοκύστεις/cleaved ζυγωτά (%)
2.α	Control	775	80.1 ± 3.4	23.5 ± 1.8	29.2 ± 1.6
	u-PA	856	78.7 ± 2.8	25.1 ± 2.7	32.0 ± 2.9

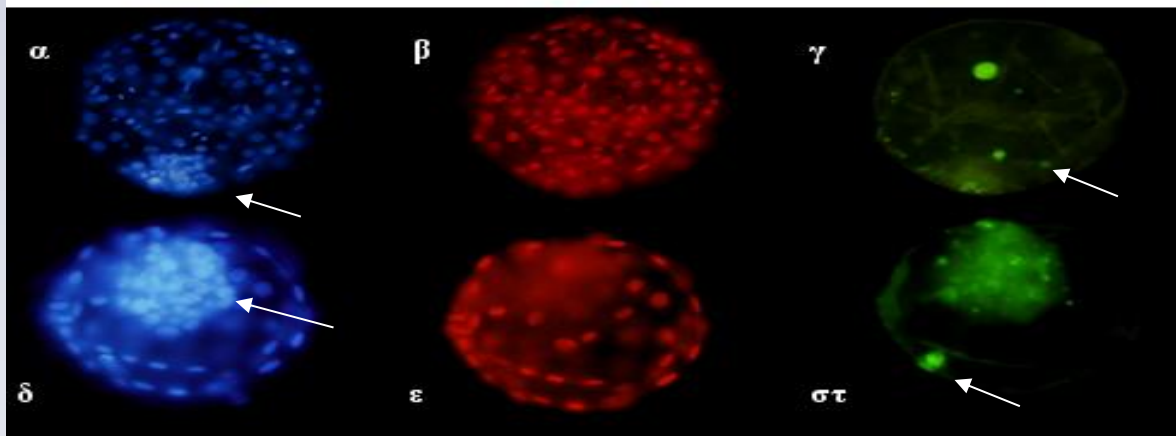
Διαφορική χρώση των κυττάρων των βλαστοκύστεων (D7)



Ομάδα	Αρ. Βλαστοκύστεων	TCN	ICM/TE (%)	ACR (%)
Control	40	117 ± 9	38,9 ± 1,4	2,9 ± 0,6
u-PA	40	105 ± 5	40.1 ± 0.5	1.8 ± 0.3

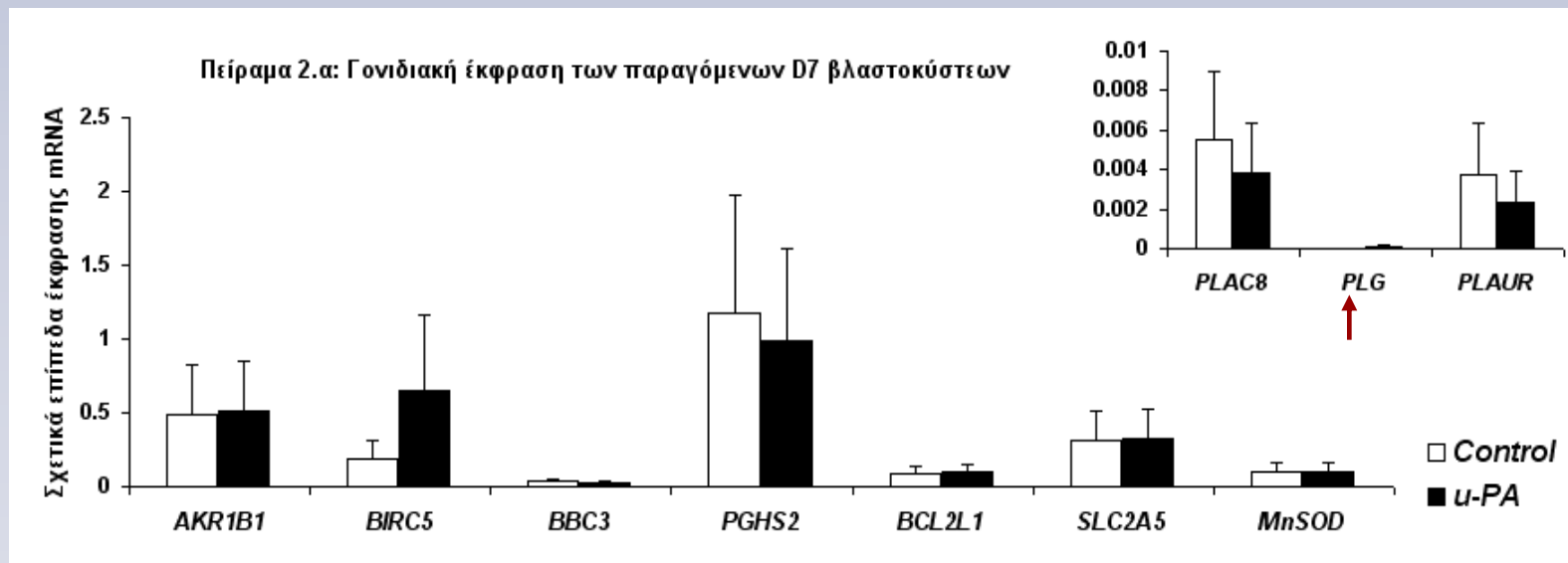
TCN: Total Cell Number
ACR: Apoptotic Cell Ratio

Καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των control και u-PA βλαστοκύστεων



α, β, και γ → control
δ, ε και στ → u-PA

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7)



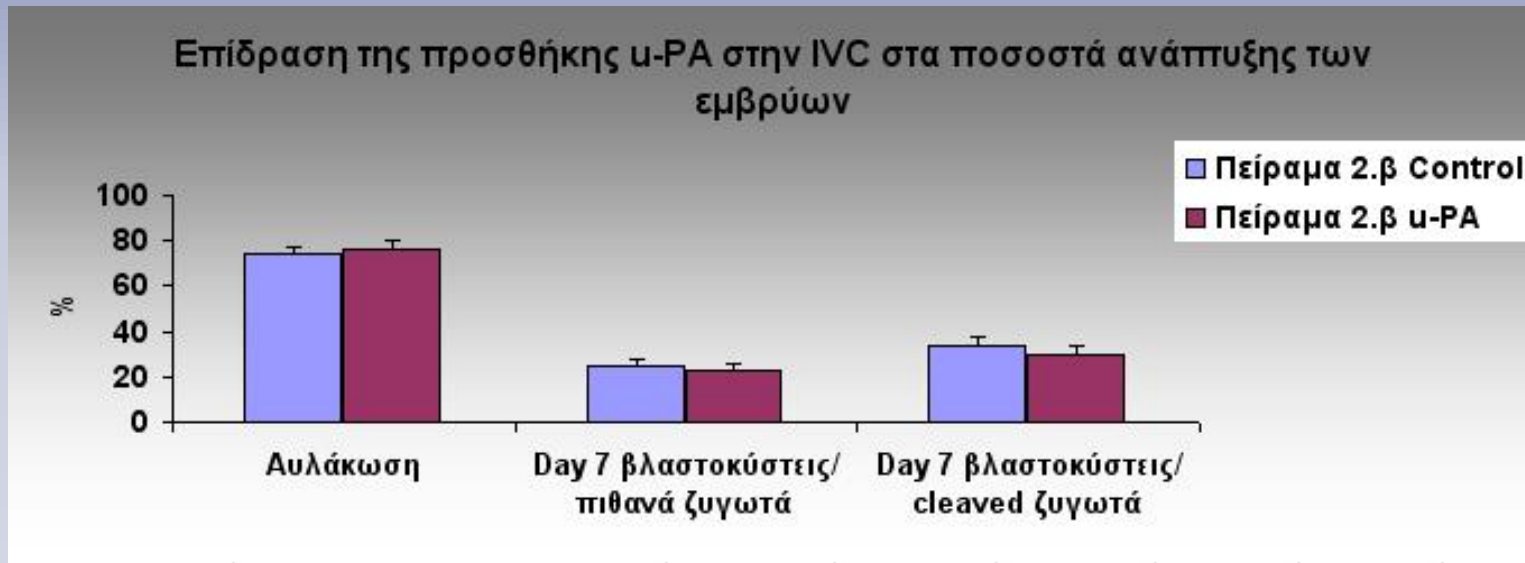
* Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της διαφορικής χρώσης των βλαστοκύστεων

Προσδιορισμός της PAA και PAI στα υποστρώματα της IVC

Πείραμα	Ομάδα	PAA	PAI	PAI
		(u-PA IU/0,1 ml)	(t-PA IU/0,1 ml)	(u-PA IU/0,1 ml)
2.α	Control	1.5 ± 0.1 ^α	22.3 ± 1.7 ^α	0.24 ± 0.02
	u-PA (D7)	7.1 ± 0.5 ^β	30.1 ± 1.5 ^β	0.28 ± 0.04
	u-PA (D0)	8.2 ± 0.3 ^β	32.2 ± 0.9 ^β	0.36 ± 0.04

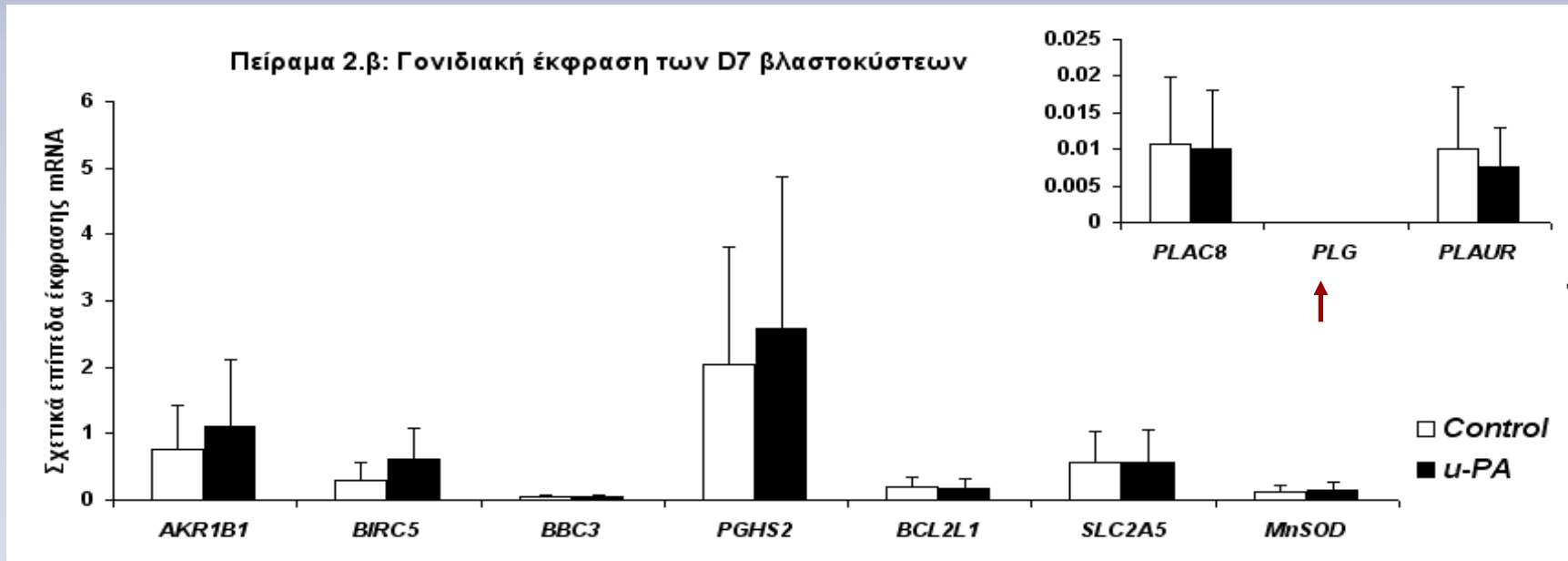
- ▶ Αύξηση της PAA και PAI έναντι του t-PA (Θετική σχέση, $P < 0.0001$)
- ▶ Αύξηση t-PAI → Υποδηλώνει την πιθανή απελευθέρωση ενός συγκεκριμένου αδρανοποιού των ενεργοποιών του πλασμινογόνου
- ▶ Ρόλος των ουσιών που εμπεριέχονται στο υπόστρωμα της IVC (ινσουλίνη και σελήνιο) στη σύνθεση u-PA και PAI-1

Αποτελέσματα IVP



Πείραμα	Ομάδα	Αρ. πιθανών ζυγωτών	Αυλάκωση (%)	Day 7 βλαστοκύστεις/πιθανά ζυγωτά (%)	Day 7 βλαστοκύστεις/cleaved ζυγωτά (%)
2.β	Control	310	74.2 ± 2.7	25.1 ± 2.9	33.9 ± 3.7
	u-PA	319	76.2 ± 4.0	22.8 ± 3.1	30.0 ± 3.9

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των βλαστοκύστεων ημέρας 7 (D7)



Προσδιορισμός της PAA και PAI στα υποστρώματα της IVC

Πείραμα	Ομάδα	PAA	PAI	PAI
		(u-PA IU/0,1 ml)	(t-PA IU/0,1 ml)	(u-PA IU/0,1 ml)
2.β	Control	0.9 ± 0.1	16.6 ± 0.7	0.17 ± 0.02
	u-PA (D7)	$0.8 \pm 0.1^{\alpha}$	15.2 ± 0.7	0.15 ± 0.01
	u-PA (D0)	$1.4 \pm 0.1^{\beta}$	17.4 ± 0.9	0.16 ± 0.01

- ▶ Καμία διαφορά στα επίπεδα των PAA και PAI
- ▶ Αυξημένη PAA στα D0 υποστρώματα → αποτελεσματική τροποποίηση του υποστρώματος κατά την έναρξη της καλλιέργειας
- ▶ Υπόθεση: Παρουσία κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ορού στο υπόστρωμα της IVC ενδεχομένως επηρεάζει την PAA

Δημοσίευση αποτελεσμάτων 2^{ου} πειράματος



Krania F, Dovolou E, Rekkas CA, Heras S, Pappas I, Van Soom A, Amiridis GS (2015): Urokinase-type plasminogen activator did not affect *in vitro* bovine embryo development and quality. **Acta Vet. Hung.** 63 (accepted for publication)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ▶ Η προσθήκη του t-PA (500 IU/ml), στο υπόστρωμα της IVF επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς μειώνει τα ποσοστά αυλάκωσης και σχηματισμού των βλαστοκύστεων.
- ▶ Αρνητική επίδραση και στην ποιότητα των παραγόμενων πρώιμων εμβρύων, καθώς σε αυτά επάγονται φαινόμενα, όπως η απόπτωση ή διακοπής του κυτταρικού κύκλου.
- ▶ Σημαντική αύξηση της PAA - χωρίς να μεταβάλλεται η PAI- η οποία μειώνεται όταν στο υπόστρωμα της IVF προστίθεται και ο αναστολέας ε-ACA παραμένοντας ωστόσο σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της ομάδας των μαρτύρων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ▶ Σε ημι-καθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με u-PA (5 IU/ml), δεν επηρεάζει τα ποσοστά παραγωγής ή/ και την ποιότητα των εμβρύων βοοειδών.
- ▶ Η τροποποίηση του υποστρώματος της IVC με u-PA δεν μεταβάλλει τα ποσοστά της IVP και την ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων, όταν στο υπόστρωμα της IVC συμπεριλαμβάνεται στιβάδα κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ορός εμβρύου μόσχου.
- ▶ Τα αποτελέσματα της PAA/PAI ανάλυσης επιβεβαιώνουν τη σημαντικότητα του καλλιεργητικού περιβάλλοντος των εμβρύων να διατηρήσουν την ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας των ενεργοποιών του πλασμινογόνου και των αδρανοποιών τους, καθώς η αύξηση της συνολικής PAA μετά την προσθήκη του u-PA προκαλεί την αύξηση της PAI στο υπόστρωμα καλλιέργειας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αποκωδικοποίηση του ρόλου του συστήματος PAs / PL στη γονιμοποίηση – ανάπτυξη του πρώιμου εμβρύου απαιτεί περαιτέρω στοχευμένους πειραματισμούς με σκοπό τη διαλεύκανση του επακριβούς ρόλου των μελών του συστήματος και των μηχανισμών δράσης τους σε κάθε στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευχαριστίες

1. Professor A. Van Soom
2. Mrs. S. Heras
3. Dr E. Wydooghe
4. Mrs. P. Van Damme
5. Επικ. Καθ. Α. Θεοδοσιάδου
6. Επικ. Καθ. Σ. Μπουκουβάλα
7. Επικ. Καθ. Γ. Φακής
8. Dr E. Ντόβολου
9. Κος Θ. Χουζούρης
10. Κος Α. Κουκούλης
11. Κος Κ. Παπαθεοχάρης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Γεώργιος Σ. Αμοιρίδης (Επιβλέπων)

Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Παππάς

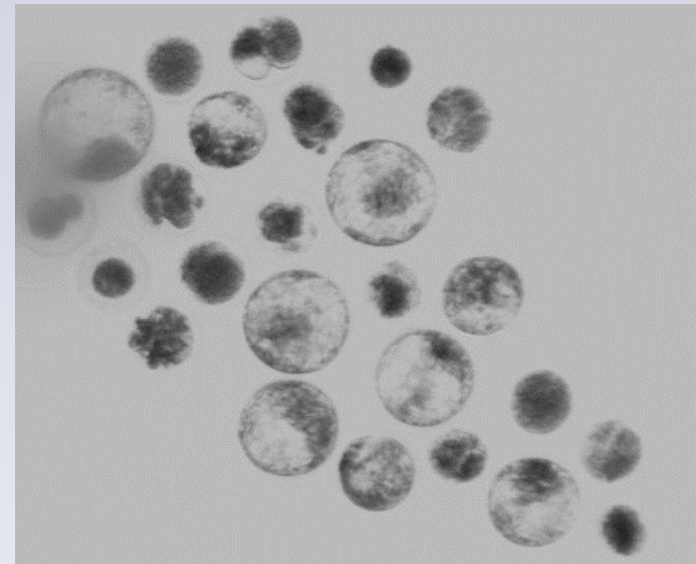
Εργαστήριο Φαρμακολογίας και Τοξικολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Αναπληρωτής Ερευνητής Κωνσταντίνος Α. Ρέκκας

Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ Θεσσαλονίκης



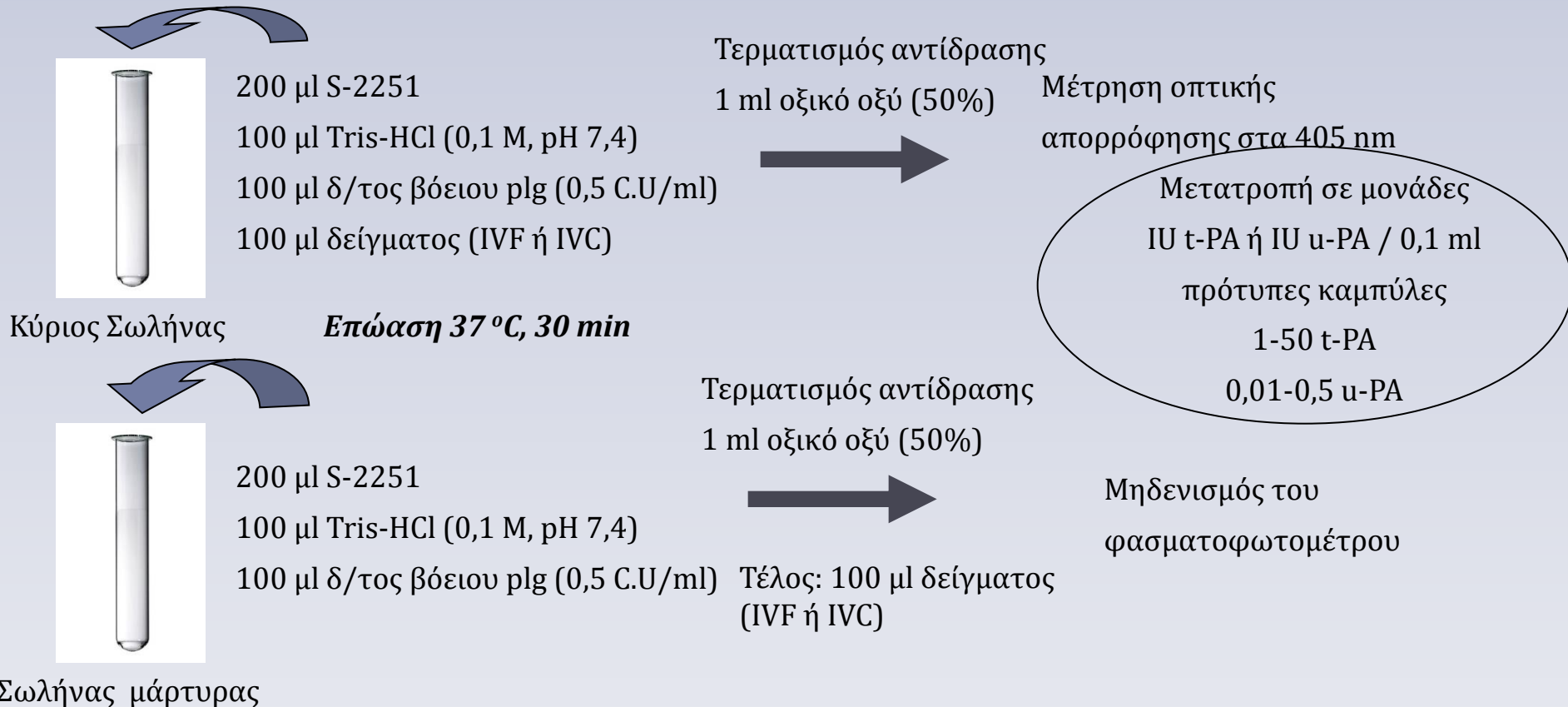
Ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας!



Υλικά και Μέθοδοι

Δραστηριότητα των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (ΡΑΑ)

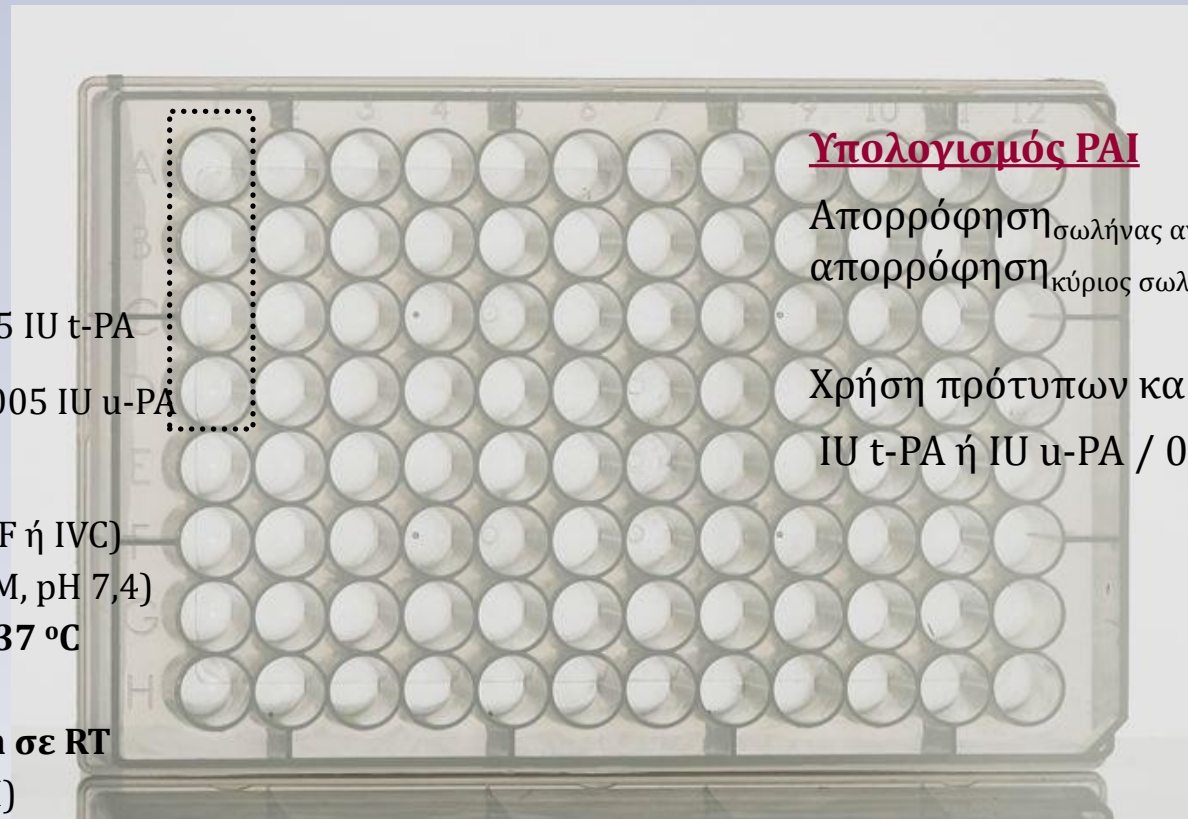
- ▶ Η ΡΑΑ προσδιορίσθηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο, με τη βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251.



Υλικά και Μέθοδοι

Δραστηριότητα των αδρανοποιών των ενεργοποιών του πλασμινογόνου (PAI)

- ▶ Η PAI προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο, με τη βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος S-2251.
- ▶ Ο όγκος των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων μειώθηκε στο 1/10



Σωλήνας μάρτυρας

Σωλήνας αναφοράς

Κύριος Σωλήνας με 0,5 IU t-PA

Κύριος Σωλήνας με 0,005 IU u-PA



10 μl δείγματος (IVF ή IVC)

10 μl Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4)

→ Επώαση 5 min 37 °C

10 μl HCl (0,16 M)

→ Επώαση 10 min σε RT

10 μl NaOH (0,16 M)

10 μl δ/τος βόειου plg (0,5 C.U/ml)

20 μl S-2251

Υπολογισμός PAI

Απορρόφηση σωλήνας αναφοράς⁻
απορρόφηση κύριος σωλήνας

Χρήση πρότυπων καμπυλών:

IU t-PA ή IU u-PA / 0,1 ml δείγματος

→ Επώαση 37 °C για 30 min → Τερματισμός αντίδρασης με 100 μl
οξικού οξέος (50%) **Μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm**