

**Der Einfluss des Alters der Mutter auf die Fortpflanzungsorgane und
den Embryo während der Präimplantationsphase: Untersuchungen
am Reproduktionsmodell des Kaninchens**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Juliane Friederike Trohl (geb. Thoma)

Betreuerin: apl. Prof. Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos

Gutachter*innen:

1. Prof. Dr. Jennifer Schön, Berlin

2. apl. Prof. Dr. Gregor Seliger, Halle (Saale)

Datum der Verteidigung: 13.03.2025

Referat

Die Fertilität der Frau nimmt mit zunehmendem Alter ab. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des mütterlichen Alters auf den Reproduktionserfolg und Veränderungen in der embryo-maternalen Interaktion während der Präimplantationsphase in der Frühschwangerschaft zu untersuchen. Um molekulare Veränderungen insbesondere im Insulin-IGF-Rezeptor-Systems (IIRS), Lipidmetabolismus und Stresssystems sowohl auf maternaler Seite als auch auf embryonaler Seite bestimmen zu können, wurden die Untersuchungen am Versuchstier Kaninchen durchgeführt. Dabei wurden gravide, junge (unter 22 Wochen) und reproduktionsalte (über 108 Wochen) Kaninchen verglichen. Ergänzend wurden ApoE-Knockout-Kaninchen untersucht, um den Einfluss einer ApoE-Defizienz auf das reproduktive Altern in der Präimplantationsphase zu analysieren.

Reproduktionsalte Kaninchen weisen einen höheren Embryonenverlust am Tag 6 der Trächtigkeit auf als junge Tiere, was mit Veränderungen in der embryo-maternalen Signaltransduktion bei älteren Tieren korreliert. So sind bei reproduktionsalten Kaninchen die Insulin- und IGF1-Konzentrationen im Serum erniedrigt, was zu Anpassungen des IIRS im Endometrium, im Ovar und in den Blastozysten führt. Die altersabhängigen Veränderungen im Lipidmetabolismus zeigen sich in einem erhöhten Fettsäureabbau und gleichzeitig vermehrter Cholesterinsynthese im Endometrium und Blastozysten. Die altersbedingten, hormonellen und metabolischen Umstellungen resultieren in einer komplexen zellulären Stressantwort. Einerseits bleibt das antioxidative Stresssystem relativ stabil und unverändert, andererseits weisen sowohl Endometrium und als auch Embryonen eine verringerte Protektion gegenüber toxischen Glukosemetaboliten auf.

Auch bei ApoE-Knockout-Kaninchen kommt es aufgrund der genetisch bedingten Hyperlipidämie zu einer verminderten Fertilität und Modifikationen im maternalen IIRS, Lipidmetabolismus und in der zellulären Stressabwehr. Da reproduktionsalte Kaninchen physiologisch keine Hyperlipidämie entwickeln, ist im Vergleich beider Versuchstiermodelle abzuleiten, dass sowohl Alter und als auch ein gestörter Lipid-Metabolismus die Ursachen für eine weibliche Subfertilität sein können. Beide Faktoren wirken über zelluläre Regulationsmechanismen dysbalancierend auf die embryo-maternalen Interaktion, wobei insbesondere mütterliche Hormonveränderungen und Metaboliten den Präimplantationsembryo beeinflussen. Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der Gesundheitsfürsorge und der Altersforschung für die Fertilität der Frau.

Trohl, Juliane: Der Einfluss des mütterlichen Alterns auf Embryonen und Reproduktionsorgane in der Präimplantationsphase anhand des Kaninchenmodells, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Dissertation, 67 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das mütterliche Alter und Fertilität	1
1.1.1	Ursachen für eine herabgesetzte Fertilität im Alter	2
1.1.2	Reproduktionsmedizinische Betrachtung zur Schwangerschaft in der späten reproduktiven Phase der Frau.....	2
1.2	Die Präimplantationsentwicklung des Kaninchens	3
1.3	Das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS)	4
1.3.1	Liganden des Insulin-IGF-Rezeptorsystems.....	5
1.3.2	Rezeptoren des Insulin-IGF-Rezeptorsystems	6
1.3.3	Signalwege des IIRS in der Embryonalentwicklung.....	8
1.4	Der embryonale und maternale Stoffwechsel in der Präimplantationsphase	9
1.5	Altern ist mit intrazellulärem Stress assoziiert	11
1.6	Das ApoE-Knockout-Kaninchen – ein Modell für metabolische Störungen im Alter..	13
1.7	Zielsetzung	15
2	Diskussion.....	17
2.1	Der Embryonenverlust in der Präimplantationsphase nimmt mit dem mütterlichen Alter zu	17
2.2	Das Reproduktionsalter der Häsinnen bewirkt Adaptationen des IIRS bei Mutter und Embryo in der Frühschwangerschaft	20
2.2.1	Mit zunehmendem Alter der Mutter nehmen Insulin- und IGF1- Serumspiegel ab, im Endometrium nimmt die Menge an IGF1 kompensatorisch zu	20
2.2.2	In Blastozysten adaptiert das IIRS und nachgeschaltete Signalmoleküle als Reaktion auf die veränderte para- und endokrine Versorgung der alternden Mutter	23
2.3	Der maternale und embryonale Lipidmetabolismus in der Präimplantationsphase verändert sich mit steigendem mütterlichen Alter	25
2.3.1	Die Umstellung des Fettsäuremetabolismus mit Hochregulation der CPT1 gewährleistet die Versorgung der Embryonen	26
2.3.2	Mit zunehmendem Alter der Mutter kommt es zu einer vermehrten Cholesterinsynthese und -aufnahme in Reproduktionsorganen und Blastozysten	28
2.4	Das reproduktive Alter der Mutter wirkt sich differentiell auf das antioxidative und glykative, zelluläre Stresssystem des Reproduktionstrakts aus.....	31
2.4.1	In Endometrium und Embryoblasten reproduktionsalter Häsinnen ist der Schutz gegen die Akkumulation von AGEs und Dicarboxylen reduziert	32
2.4.2	Die Enzyme des antioxidativen Systems in Reproduktionsorganen und Embryonen weisen kaum Veränderungen in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter auf...	33
2.5	In ApoE-defizienten Häsinnen ist die Fertilität aufgrund von metabolischen Veränderungen und der chronischen Dyslipidämie deutlich verringert	34

2.5.1	Eine ApoE-Defizienz hat deutlichere systemische Veränderungen des Metabolismus und des Stresssystems zur Folge als das fortgeschrittene maternale Alter	36
2.5.2	ApoE ist ein lokaler Faktor für den Cholesterinmetabolismus im Endometrium	36
2.5.3	Ovarielle Veränderungen im Lipidmetabolismus und der Stressantwort in ApoE-Knockout-Kaninchen	37
2.6	Zusammenfassung und Ausblick	39
3	Literaturverzeichnis.....	41
4	Thesen	65

Publikationen

Erklärungen

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Das mütterliche Alter und Fertilität

Seit 50 Jahren steigt das durchschnittliche Alter von Frauen bei der Geburt ihres ersten Kindes kontinuierlich an (siehe Abbildung 1). Es betrug 2022 durchschnittlich ca. 30,4 Jahre (destatis 2022). Der Trend, die reproduktive Phase mit 30 Jahren zu beginnen, steht im Gegensatz zur physiologischen Fertilitätskurve der Frauen, die ab dem 30. Lebensjahr kontinuierlich abnimmt.

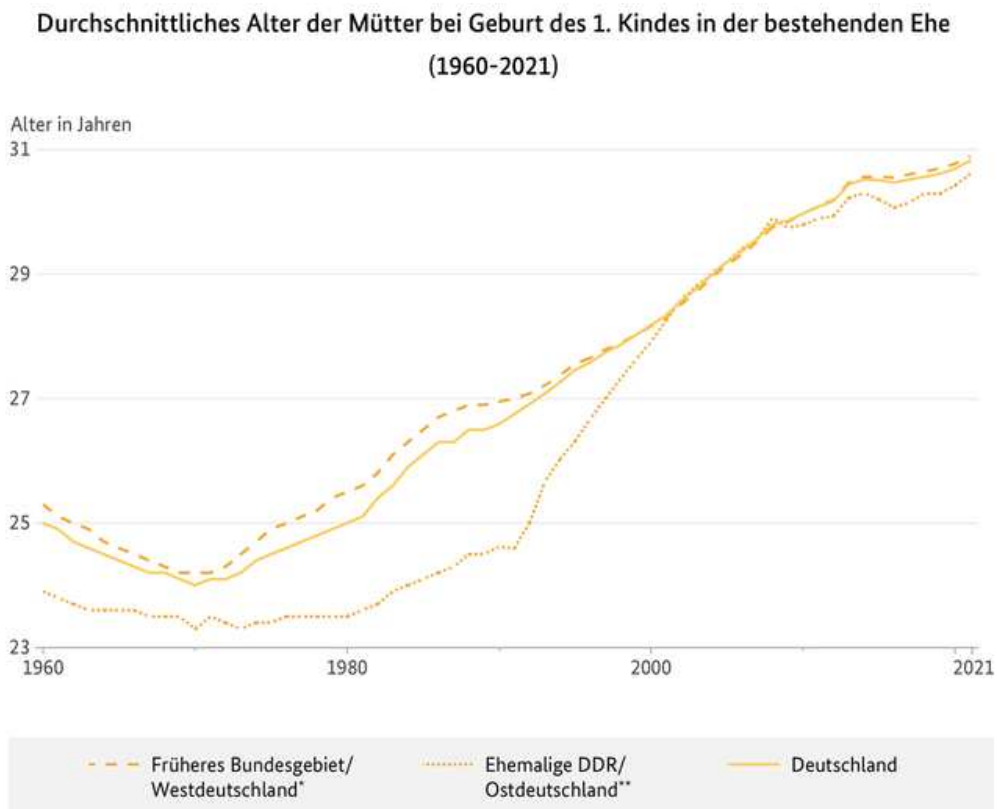


Abbildung 1: **Durchschnittliches Alter der Mutter bei Geburt des 1. Kindes von 1960 bis 2021 in Deutschland**

(Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung (BiB), https://www.bib.bund.de/Permalink.html?cms_permaid=1217922)

* bis 2000 früheres Bundesgebiet, ab 2001 Westdeutschland ohne Berlin;

** bis 2000 Gebiet der ehemaligen DDR, ab 2001 Ostdeutschland einschließlich Berlin

Bereits mit 31 Jahren sind ca. 50 Prozent der Frauen subfertil und haben eine geringere Chance auf eine erfolgreiche Schwangerschaft (siehe Abbildung 2) (van Noord-Zaadstra et al. 1991; Übersichtsartikel: te Velde und Pearson 2002). Statistisch betrachtet endet die weibliche Fertilität mit durchschnittlich 40-41 Jahren. 2020 waren 2,9 % der Gebärenden in Deutschland über 40 Jahre alt (destatis 2022). Die individuelle Variabilität ist dabei groß, wobei die Stadien des reproduktiven Alterns in einem engen zeitlichen Zusammenhang stehen (Treloar 1981; Richardson et al. 1987; Faddy et al. 1992; Übersichtsartikel: te Velde und Pearson 2002).

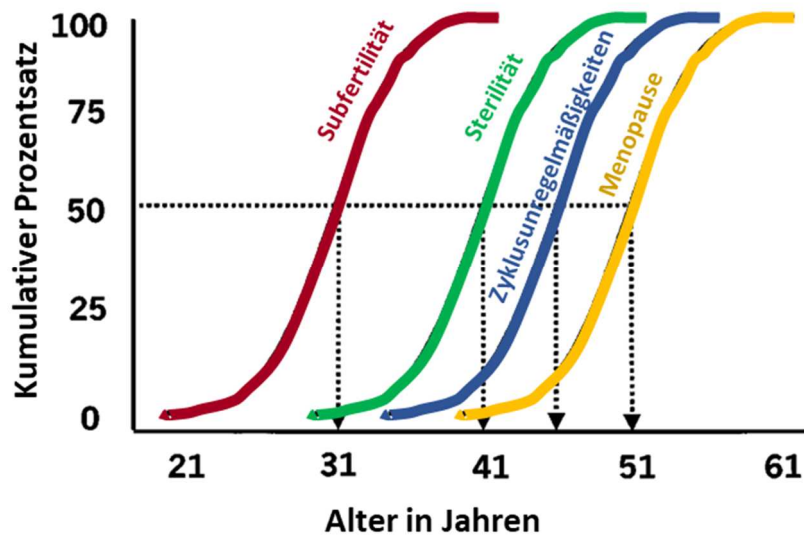


Abbildung 2: Altersvariabilität in verschiedenen Stadien des reproduktiven Alterns in einer kumulativen Form dargestellt (modifiziert nach te Velde und Pearson 2002)

1.1.1 Ursachen für eine herabgesetzte Fertilität im Alter

Als Hauptursachen für die abnehmende Fertilität der Frau ab dem 30. Lebensjahr werden die Abnahme der Follikelanzahl, der Oozytenqualität und des Entwicklungspotentials der Oozyten und Embryonen beschrieben (Bergh et al. 1999; Übersichtsartikel: Cimadomo et al. 2018). Die Abnahme der Oozytenqualität umfasst unter anderem höhere Aneuploidieraten, Chromosomensegregationen und Mitochondriendysfunktionen (Übersichtsartikel: Qiao et al. 2014; Cimadomo et al. 2018). Mit dem Altern der Frau kommt es zu Veränderungen des Stoffwechsels und des Endokriniums. Dies geht mit einer Zunahme metabolischer Erkrankungen wie Hypertonie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus einher (Barzilai et al. 2012). Das Entwicklungspotential der Embryonen wird durch mütterliche Hormone und Erkrankungen beeinflusst. Reproduktionsalte Frauen weisen bereits beginnende metabolische Veränderungen auf, welche sich auf die weiblichen Reproduktionsorgane und den sich entwickelnden Embryo auswirken. In Embryonen älterer Mütter sind die Transkription (Kawai et al. 2018; McCallie et al. 2019) und die Mitochondrienaktivität herabgesetzt (Bentov et al. 2011; May-Panloup et al. 2019), was eine mögliche Ursachen für ein eingeschränkte embryonale Entwicklungskompetenz darstellen könnte.

1.1.2 Reproduktionsmedizinische Betrachtung zur Schwangerschaft in der späten reproduktiven Phase der Frau

Der Schwangerschaftserfolg ist altersabhängig. Ab einem Alter von 35 Jahren gilt im deutschen Gesundheitssystem eine Schwangerschaft als Risikoschwangerschaft. Ab diesem Alter steigt unter anderem das Risiko für spontane Aborte, Fehl- und Frühgeburten, sowie makrosome oder

zu kleine Kinder (*small/large for gestational age*) (Kenny et al. 2013; Khalil et al. 2013; Laopaiboon et al. 2014; Fall et al. 2015). Epidemiologische Studien belegen außerdem langfristige Konsequenzen des mütterlichen Alters auf die Gesundheit der Nachkommen. Kinder älterer Mütter haben ein höheres Risiko an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken (Cardwell et al. 2010) und Nachkommen im Erwachsenenalter erkranken früher an einem Diabetes mellitus Typ 2 (Lammi et al. 2007). Insgesamt weisen Kinder und junge Erwachsene von älteren Müttern vermehrt Risikoprofile für Erkrankungen des fortgeschrittenen Alters auf, wie erhöhte Nüchtern-Blutzuckerwerte oder einen hohen Blutdruck (Whincup et al. 1989; Lawlor et al. 2004; Fall et al. 2015), was annehmen lässt, dass deren Lebenserwartung und Reproduktionskapazität geringer sein könnten (Tarín et al. 2001; Smits et al. 2002; Wilding et al. 2014).

Die steigende Anzahl reproduktionsalter Mütter und die potentiellen Auswirkungen, die eine Schwangerschaft in der späten reproduktiven Phase der Frau auf die Gesundheit der Kinder hat, begründen die Dringlichkeit von Untersuchungen der molekularen Mechanismen des reproduktiven Alterns. Die ovarielle Alterung, die zur Reduktion der Follikelzahl und Oozytenqualität führt, wurde bereits mehrfach beschrieben (Hansen et al. 2005; Übersichtsartikel: Tatone et al. 2008). Weniger untersucht ist die frühe Schwangerschaft von der Befruchtung bis zur Implantation. In der Präimplantationsphase ist der Embryo für Umwelteinflüsse, sowie metabolische oder hormonelle Schwankungen besonders sensibel, da er noch nicht von einer schützenden Plazenta umgeben ist und ausschließlich über das Eileiter- bzw. Uterussekret versorgt wird. Zwischen Embryo (Trophoblast) und Uterusepithel findet eine kontinuierliche embryo-maternale Interaktion statt, wobei beide das umgebende Uterusmilieu beeinflussen, um dem Embryo eine bestmögliche Entwicklung zu gewährleisten (Bauersachs und Almiñana 2020).

Aus ethischen Gründen werden experimentelle Untersuchungen zur embryo-maternalen Kommunikation und mögliche Adaptationsprozesse während der Präimplantationsphase nicht am Menschen durchgeführt. Stattdessen werden Mensch und Säugetier vergleichend untersucht, was eine Analyse der molekularen Mechanismen ermöglicht. Ein geeignetes Modell für die Präimplantationsphase ist die embryonale Entwicklung von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*).

1.2 Die Präimplantationsentwicklung des Kaninchens

Das Kaninchen ist ein etabliertes embryologisches Modell für die Frühentwicklung von Säugetieren und ist phylogenetisch näher verwandt mit dem Menschen als andere gängige Tierversuchsmodelle, wie die Maus oder Ratte (Graur et al. 1996; Springer und Murphy 2007).

Es weist Gemeinsamkeiten mit dem Menschen in der Morphologie der Keimscheibe während der Gastrulation und in der Art der Plazentation auf (Übersichtsartikel: Fischer et al. 2012). Des Weiteren ist der Lipidmetabolismus des Kaninchens dem des Menschen ähnlich (Fan et al. 2014). Als Versuchstier bietet die Verwendung des Kaninchens weitere entscheidende Vorteile. Durch die induzierte Ovulation während der Verpaarung kann eine exakte Bestimmung des Embryonalalters erfolgen. So befindet sich der Embryo nach 14 Stunden *post conceptionem* (p.c.) im Zwei-Zell-Stadium. Nach 2,5 Tagen ist eine Morula aus 32-64 gleichen Blastomeren entstanden und nach 3,5 Tagen wandert die kompaktierte Morula in den Uterus. Diese entwickelt sich zur frühen Blastozyste mit Embryoblast (EB), der sich später in der Embryogenese zum Embryo entwickelt, und Trophoblast (TB), der den späteren fetalen Anteil der Plazenta bildet. Die Blastozyste ist von der *Zona pellucida* umgeben und wird über das Uterussekret mit Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren versorgt. Am sechsten Tag beginnt die Gastrulation mit der Entwicklung der dreiblättrigen Keimscheibe (Endo-, Meso-, Ektoderm) (Übersichtsartikel: Fischer et al. 2012). Nach Viebahn *et al.* können anhand der Morphologie der Keimscheibe lichtmikroskopisch Entwicklungsstadien von 0-4 eingeteilt werden (Viebahn et al. 1995). Sechs Tage alte Kaninchenblastozysten können mit Mikroscheren mechanisch in EB und TB getrennt werden (Denker 1977; Übersichtsartikel: Fischer et al. 2012). Die Implantation erfolgt nach 6 Tagen und 18 Stunden (Denker 1977). Die Blastozysten sind am 6. Tag p.c. mit etwa 3-5 mm relativ groß, was eine morphologische Untersuchung und Analyse einzelner Blastozysten, sowie EBs und TBs ermöglicht (Denker 1977; Übersichtsartikel: Fischer et al. 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Reproduktionsmodell des Kaninchens herangezogen, um den Einfluss des mütterlichen Alters auf die Frühschwangerschaft beim Säuger zu untersuchen. Dafür wurden junge (16 – 20 Wochen) und reproduktionsalte (über 108-172 Wochen) Kaninchen an Tag 6 der Schwangerschaft verglichen. Das Alter der untersuchten Kaninchen ist begrenzt auf das humane Altern übertragbar, es besteht ein nicht linearer Zusammenhang. Überträgt man die reproduktive Präseneszenz der Frau mit einem Alter von etwa 35-39 Jahren auf das Kaninchen, entspricht diese etwa einem Alter der Kaninchen von 1-3 Jahre (52-156 Wochen). Junge Kaninchen sind als äquivalent zu etwa zwanzigjährigen Frauen zu sehen, reproduktionsalte zu etwa vierzigjährigen (Sengupta und Dutta 2020).

1.3 Das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS)

In der Zeit vor der Implantation ist es für Mutter und Embryo möglich, über Hormone und Wachstumsfaktoren miteinander zu kommunizieren. Sowohl die Mutter, als auch der Embryo selbst können diese produzieren und sich somit gegenseitig beeinflussen. Eine wesentliche Rolle in der Präimplantationsentwicklung spielt dabei das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS). Es

umfasst Insulin, die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren 1 und 2 (IGF1 und IGF2) und ihre Rezeptoren, den Insulin Rezeptor (InsR), den IGF1-Rezeptor (IGF1R) und den IGF2-Rezeptor (IGF2R). Sie regulieren neben Stoffwechselprozessen, auch Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Präimplantationsembryonen von Säugetieren (Übersichtsartikel: Kaye et al. 1992; Hardy und Spanos 2002; Navarrete Santos et al. 2004; Navarrete Santos et al. 2008). In der Präimplantationsphase dienen Insulin und IGFs als Mediatoren zwischen der Mutter und dem Embryo und koordinieren den zellulären Metabolismus, sowie zellproliferative Prozesse.

1.3.1 Liganden des Insulin-IGF-Rezeptorsystems

Insulin ist ein anaboles Peptidhormon, welches als einziges blutzuckersenkend wirkt und somit zur Energieversorgung der Zelle beiträgt. Es induziert die Glykolyse, sowie die Triglyceridsynthese und Speicherung von Aminosäuren. Gleichzeitig hemmt es die Gluconeogenese, Proteolyse und Glykogenolyse. Darüber hinaus reguliert es Wachstum und Proliferation der Zellen. Synthetisiert wird es ausschließlich von den β -Zellen des Pankreas. Versuche an Maus (Pantaleon und Kaye 1998), Rind (Schultz et al. 1992) und Kaninchen (Ramin et al. 2010) zeigen, dass die Präimplantationsembryonen noch kein Insulin produzieren können, sondern endokrin über das Uterussektret versorgt werden (Schultz et al. 1992). Humane Feten beginnen ab der 11. Entwicklungswoche, Insulin zu produzieren (Reiher et al. 1983).

IGF1 und 2 sind Wachstumshormone, die das Zellwachstum und -überleben regulieren und somit in der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung sind. Sie werden in der Leber synthetisiert und können ihre Wirkung endokrin entfalten. Aber auch andere Gewebe wie der Uterus, das Ovar, die Plazenta und der Embryo produzieren IGF1 und IGF2 und stellen somit zusätzlich eine para- und autokrine Versorgung sicher (Murphy et al. 1987; Lighten et al. 1998; Thieme et al. 2012b). In Blastozysten werden IGF1 und IGF2 in der Präimplantationsphase exprimiert (Maus (Rappolee et al. 1992; Doherty et al. 1994; Pantaleon und Kaye 1998), Rind (Watson et al. 1992), Kaninchen (Navarrete Santos et al. 2008; Ramin et al. 2010; Thieme et al. 2012a; Thieme et al. 2012b)).

Die essentielle Bedeutung der IGFs für die Embryogenese beweisen verschiedene transgene Tiermodelle. IGF1-nullmutante Mäuse sind stark wachstumsretardiert und versterben zu 95% perinatal (Baker et al. 1993; Liu et al. 1993). Der IGF2-Knockout in Mäusen führt ebenfalls zu einer fetalen Wachstumsretardierung, nach der Geburt entwickeln sich die Mäuse jedoch normal und sind phänotypisch unauffällig (DeChiara et al. 1990; DeChiara et al. 1991; AGROGIANNIS et al. 2014). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass sowohl IGF1, als auch IGF2 eine wesentliche Rolle für die embryonale Entwicklung einnehmen, wobei IGF2 im Gegensatz zu IGF1 nicht essentiell für die Entwicklung und das postnatale Wachstum ist.

1.3.2 Rezeptoren des Insulin-IGF-Rezeptorsystems

Die Wirkungen des Insulins und der IGFs werden über deren Rezeptoren vermittelt. Aufgrund der strukturellen Homologie der Peptidstruktur ist es möglich, dass die Liganden, Insulin, IGF1 und IGF2, nicht nur an ihren jeweiligen Rezeptor binden, sondern auch mit geringerer Affinität an die anderen Rezeptoren des IIRS (siehe Abbildung 3) (Übersichtsartikel: Chao und D'Amore 2008). Während der InsR und der IGF1R eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, nimmt der IGF2R eine Sonderstellung ein (Ullrich et al. 1986). Der IGF2-R ist ein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und bewirkt die Internalisierung und den lysosomalen Abbau seiner Liganden (Oka et al. 1985).

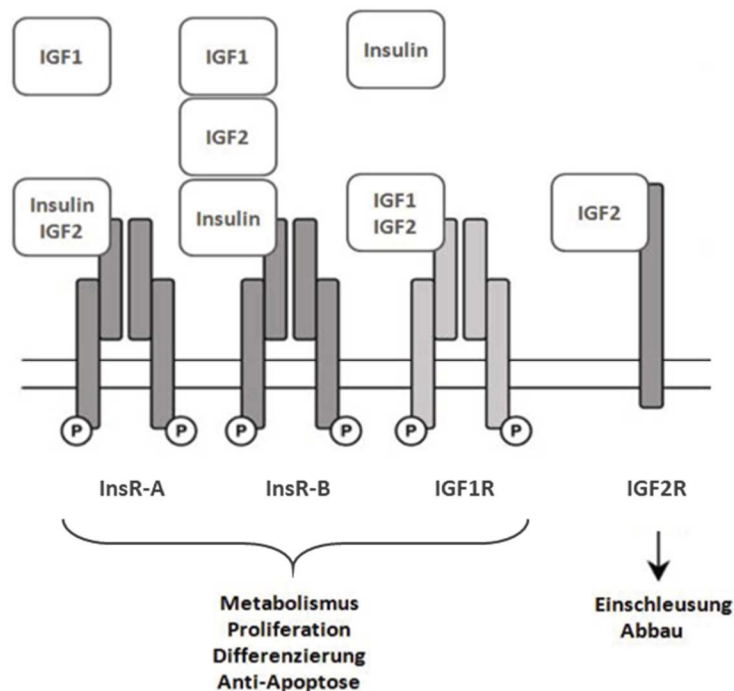


Abbildung 3: Übersicht über das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS) mit der schematischen Darstellung der Bindungsaffinitäten von Liganden und Rezeptoren

Der Insulinrezeptor (InsR) existiert in zwei Isoformen: InsR-A und InsR-B. InsR-B ist für die klassische metabolische Insulinantwort verantwortlich. IGF1 und IGF2 binden an ihn nur mit geringer oder mittlerer Affinität. InsR-A hat eine hohe Affinität zu Insulin und IGF2, und nur eine schwache zu IGF1. IGF1-Rezeptor (IGF1R) bindet beide IGFs und aktiviert die anabolische Aktivität; von Insulin wird er nur in sehr hohen Konzentrationen aktiviert. Der IGF2-Rezeptor (IGF2R) bindet exklusiv IGF2 und ermöglicht dessen Einschleusung und Abbau (modifiziert nach Chao und D'Amore, 2008).

InsR und IGF1R führen zu einer Aktivierung der intrazellulären Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) und induzieren intrinsische Signalkaskaden. Der InsR kommt in zwei Isoformen vor, InsR-A und InsR-B. InsR-A bindet mit hoher Affinität Insulin und auch IGF2 (Louvi et al. 1997) und vermittelt vor allem proliferative und mitogene Prozesse im EB. Die Metabolische Aktivität des Insulins wird vor allem über InsR-B vermittelt. IGF1R hingegen bindet IGF1 und IGF2 sehr gut, Insulin hingegen wird nur bei hohen Konzentrationen gebunden (Baudry et al. 2001). Neben dem

InsR-A, vermittelt der IGF1R ebenfalls die Proliferation und Mitogenese in EBs (Übersichtsartikel: Denley et al. 2005; AGROGIANNIS et al. 2014).

Dies ist vor allem von Bedeutung, da die Verteilung der Rezeptoren des IIRS in embryonalen Kaninchen zelllinienabhängig ist (wie in Abbildung 4 dargestellt). Während der EB besonders InsR-A und IGF1R exprimiert, synthetisiert der TB vor allem beide InsR. Die InsR-B-Expression macht im Gesamten nur 20% der Insulinrezeptorexpression aus, was die metabolische gegenüber der proliferativen Wirkung in den Hintergrund rücken lässt (Navarrete Santos et al. 2008).

Im Endometrium und Ovar haben hauptsächlich IGF1R und synergistisch InsR Einfluss auf die Fertilität. Im Uterus werden durch den IGF1R und InsR die optimale, hormonabhängige uterine Proliferation und folgende Implantation reguliert (Sekulovski et al. 2021). Im Ovar wurde eine zentrale Rolle von IGF1R und InsR für die Steroidgenese und den Progesteronrezeptorstoffwechsel nachgewiesen, sodass eine Störung in diesem System eine beeinträchtigte Oozytenentwicklung und Ovulation zur Folge hat (Baumgarten et al. 2017; Sekulovski et al. 2019).

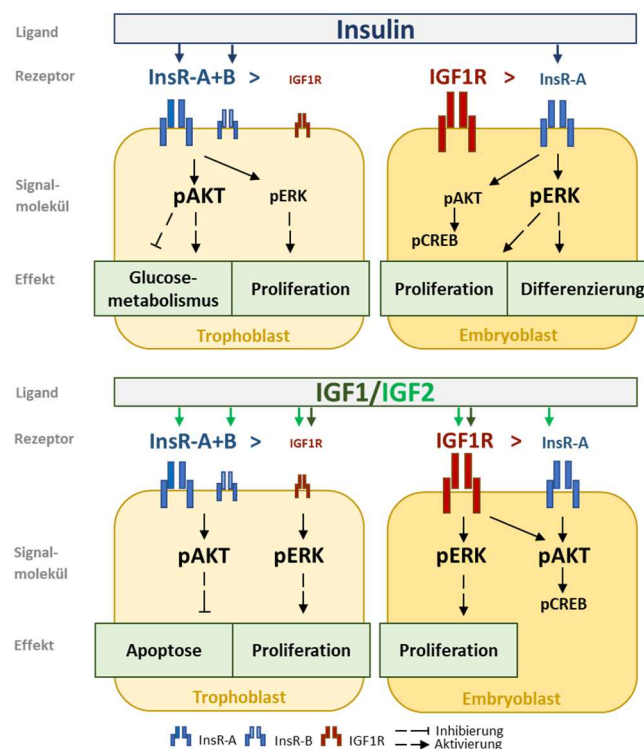


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der Insulin- und IGF-abhängigen Signalwege in Embryoblast- und Trophoblastzellen der 6 Tage alten Kaninchenblastozyste (modifiziert nach Navarrete Santos 2012)**

Die Darstellung zeigt eine Übersicht der experimentell bestätigten Moleküle im PI3K/AKT- und RAS/MAPK/ERK-Signalweg in 6 Tage alten Blastozysten mit Daten aus der in vitro Kultivierung mit Insulin, IGF1 oder IGF2.

Insulin-like-growth-factor (IGF), Proteinkinase B (pAKT), extracellular signal-regulated kinase (pERK), cyclic AMP responsive element-binding protein (pCREB)

1.3.3 Signalwege des IIRS in der Embryonalentwicklung

Über das IIRS werden intrazellulär hauptsächlich zwei große Signalwege angesprochen, der PI3K-AKT-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (AKT)) und der MAPK/ERK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)) (White 2006).

AKT – aktivierte Signaltransduktion

Der PI3K-AKT-Signalweg reguliert vor allem metabolische und antiapoptotische Prozesse (Saltiel und Kahn 2001). Durch Bindung von Insulin oder IGFs wird über IRS die zentrale Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert, was zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt. So wird die Glukoseaufnahme und die zelluläre Glykogensynthese gefördert, die Proteinsynthese stimuliert und der Zellzyklus forciert, während die Apoptose inhibiert wird (Übersichtsartikel: Sale und Sale 2008). Wichtige Mediatoren sind hierbei unter anderem *cyclic AMP responsive element-binding protein* (CREB) und *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) (Saltiel und Kahn 2001; Übersichtsartikel: Sale und Sale 2008). Im humanen Endometrium ist die Phosphorylierung von AKT und damit Aktivierung des PI3K-Signalweges ausschlaggebend für eine erfolgreiche Implantation (Toyofuku et al. 2006; Prast et al. 2008).

ERK – aktivierte Signaltransduktion

Der MAPK/ERK-Signalweg vermittelt seine mitogene und zelldifferenzierende Wirkung vor allem über ERK1 und ERK2 (Übersichtsartikel: Krishna und Narang 2008). Ligandenbindung an IGF1R oder InsR-A führt zur Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 über MAPK. Die Proteinkinasen ERK1 und ERK2 wiederum aktivieren eine Vielzahl an nachgeschalteten Enzymen und Transkriptionsfaktoren. Dazu zählt ebenfalls der Transkriptionsfaktor CREB. Forschungen an ERK-defizienten Mäusen haben die Relevanz von ERK in der Embryonalentwicklung gezeigt. So versterben ERK2-Knockout-Mäuse während der Embryonalentwicklung aufgrund einer gestörten Trophoblastenreifung und Vaskularisierung der Plazenta (Hatano et al. 2003; Saba-El-Leil et al. 2003).

AMPK – aktivierte Signaltransduktion

Die *5'-AMP-activated protein kinase* (AMPK) ist ein zentrales Enzym der intrazellulären Energiehomöostase und stimuliert Schlüsselenzyme (z.B. der Fettsäureoxidation und Glycolyse), die zur ATP-Generierung beitragen. Gleichzeitig werden anabole Signalwege, wie Lipid-, Protein- und Glykogensynthese, gehemmt. Zudem dient AMPK als Sensor für mitochondrialen Stress (Herzig und Shaw 2018). AMPK beeinflusst die Implantation, besonders durch Regulation der Rezeptivität, Epithelzellproliferation und Dezidualisierung des Endometriums. Auch die Regeneration des Endometrium ist AMPK-abhängig (McCallum et al. 2018; Griffiths et al. 2020).

Die Überaktivierung von AMPK in der Präimplantationsphase ist schädlich für den Embryo, da dadurch die Blastozystenentwicklung, Trophektodermdifferentenzierung und *Tight junction*-Ausbildung gehemmt wird (Calder et al. 2017).

CREB – als ein zentraler Vermittler der Embryonalentwicklung

CREB ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren und Regulator der frühen embryonalen Entwicklung. Es sind über 300 verschiedene Stimuli wie z.B. Stress, Wachstumsfaktoren oder Hormone bekannt, die zu einer Erhöhung des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) führen und damit CREB aktivieren können (Übersichtsartikel: Mayr und Montminy 2001). IGF1 stimuliert beispielsweise über den MAPK/ERK-Signalweg die Phosphorylierung am Serin133 und aktiviert damit CREB (Monnier et al. 1994; Zheng und Quirion 2006). Das phosphorylierte CREB (pCREB) transloziert in den Nucleus und bindet an das *cAMP responsive element* (CRE). Etwa ein Viertel des Säugetiergenoms kann auf diese Weise von CREB moduliert werden (Impey et al. 2004; Zhang et al. 2005). Durch die hohe Anzahl der Gene, die durch CREB reguliert werden können, ergibt sich eine funktionelle Vielfalt der zellulären Reaktionen.

Während der Embryonalentwicklung ist CREB vor allem für proliferative Prozesse von Bedeutung (Bleckmann et al. 2002; Jin und O'Neill 2007, 2014). Eine Hemmung von CREB hat im Blastozystenstadium oder frühen Gastrulationsstadium nachteilige Effekte für den Embryo und ruft neuronale Fehlbildungen wie Mikrozephalie und Spina bifida hervor (Lutz et al. 1999). CREB-Knockout-Mäuse weisen ein geringes Geburtsgewicht auf und versterben nach der Geburt (Bleckmann et al. 2002). Im Endometrium von Mäusen ist CREB ein Regulator der durch cAMP ausgelösten Dezidualisierung (Ruan et al. 2012).

1.4 Der embryonale und maternale Stoffwechsel in der Präimplantationsphase

Die Signalwege des IIRS und davon regulierte Transkriptionsfaktoren wie CREB nehmen direkten Einfluss auf den Metabolismus des Embryos. CRE-Sequenzen sind Bestandteil der Gene von Enzymen des Glucose- und Lipidstoffwechsels, wie z.B. bei der Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT1), einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der β -Oxidation und der Phosphofructokinase 1 (PFK1), einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Glykolyse (Zhang et al. 2005; Übersichtsartikel: Altarejos und Montminy 2011).

Während der Präimplantationsphase nutzen alle Säugetierembryonen Pyruvat, Fettsäuren und Aminosäuren als Energieressource (Übersichtsartikel: Bradley und Swann 2019). Der Metabolismus des Embryos ändert sich mit dem Entwicklungsstadium und folgt dabei einem intrinsischen genetischen Programm. Bis zur Kompaktierung im Morulastadium ist der Embryo

auf Pyruvat und Laktat angewiesen, Glucose dient hier nur der intrazellulären Signaltransduktion (Kane 1979; Leese 2012; Leese et al. 2016). Erst ab dem Blastozystenstadium kann mit der Aktivierung der Glykolyse Glucose in embryonalen Zellen verstoffwechselt werden (Barbehenn et al. 1974, 1978). Ab dem Blastozystenstadium steigt der Sauerstoff- und ATP-Verbrauch des Embryos. Der Metabolismus wird forciert und der Embryo produziert Proteine. Er wächst und nimmt an Masse zu (Leese 2012; Leese et al. 2016). Leese und Koautoren beschreiben für Präimplantationsembryonen das Goldilocks-Prinzip (als Fortführung der *Quiet-Embryo-Hypothese*), was beinhaltet, dass der Embryo sein maximales Entwicklungspotential erreicht, wenn er ein optimales Level seiner metabolischen Aktivität hält (Leese et al. 2016; Leese et al. 2019; Leese et al. 2022). Das Prinzip ist so zu verstehen, dass Embryonen im Morulastadium mit einem geringen Energieverbrauch physiologisch einen inaktiven Stoffwechsel aufweisen sollten, aber mit dem Blastozystenstadium und der Massezunahme eine gesteigerte Energiegewinnung benötigen. Tatsächlich nutzen Blastozysten zur Energiegewinnung nicht nur Glucose, sondern zu einem großen Teil auch Fettsäuren in der β -Oxidation (Krischer und Prather 2012). Neben dem metabolischen „Switch“ wird in den embryonalen Zellen mit dem gesteigerten Stoffumsatz auch die Zellentgiftung forciert. Eine Störung des embryonalen Stoffwechsels kann dazu führen, dass Embryonen vermehrtem intrazellulären Stress ausgesetzt sind. Es kann aber auch bedeuten, dass Embryonen, die eine höhere metabolische Aktivität aufweisen, vermehrt intrazellulärem Stress ausgesetzt sind.

Der Embryo selbst kann Fettsäuren und komplexere Lipide synthetisieren und in Lipidvesikeln speichern (Tsujii et al. 2001). Lipide funktionieren unter anderem als Bestandteil von Biomembranen und sind grundlegender Baustein zur Synthese von Steroidhormonen wie Östrogen (Stubbs und Smith 1984). Die Anzahl und Größe an Lipidvesikeln ist abhängig von der Säugetierspezies. So enthalten Schweineembryonen eher hohe, Embryonen von Kaninchen, Mäusen und Menschen eher geringe Anteile an Lipiden (Yahia Khandoker et al. 1998; Sturme et al. 2009; Bradley und Swann 2019). Gleichzeitig ist der Lipidgehalt auch ein Marker für die Vitalität der Embryonen (Abe et al. 1999; Kikuchi et al. 2002). Eine überhöhte intrazelluläre Akkumulation von Lipiden scheint einen negativen Einfluss auf die Embryonenqualität zu haben. Ein hoher Lipidgehalt ist mit einer geringen Kryotoleranz verbunden (Abe et al. 2002; Sudano et al. 2011; Andrade Melo-Sterza und Poehland 2021).

Mit steigendem reproduktiven Alter verändert sich der Stoffwechsel der Frau. Gesamtcholesterin, *very low density lipoprotein* (VLDL) und *low density lipoprotein* (LDL) nehmen im Serum zu (Heiss et al. 1980; Wahl et al. 1981; Abbott et al. 1983). Bei Schwangeren ab 35 Jahren werden deutlich häufiger Erkrankungen wie Gestationsdiabetes oder Präeklampsie

festgestellt (Lamminpää et al. 2012; Kahveci et al. 2018; Bouzaglou et al. 2020; Li et al. 2020). Begleitet werden die metabolischen Veränderungen von einer gesteigerten Akkumulation reaktiver Stoffwechselendprodukte, welche zelluläre Abläufe langfristig verändern können und den mütterlichen und embryonalen Stoffwechsel belasten (Rabbani und Thornalley 2015). Der Embryo passt sich in einem bestimmten Maße an das „gealterte Mikromileu“ an. Eine altersabhängige Expression wurde unter anderem bereits für die schwangerschaftsrelevanten Hormone Östrogen, Progesteron und Androgen, sowie deren Rezeptoren bewiesen (Segal und Casper 1990; Huang et al. 2008; Woods et al. 2017). Zudem beeinträchtigt der Verlust der Rezeptivität des Endometriums die Implantation des Embryos (Woods et al. 2017). Für die Alterung des Endometriums kann zudem auch die Zunahme seneszenten Zellen im Uterusgewebe von Bedeutung sein (Laser et al. 2010). Vermutet wird, dass durch zelluläre Seneszenz die Dezidualisierung beeinträchtigt und die embryo-maternale Kommunikation behindert wird (Liao et al. 2015). In Mäusen und Kaninchen wurde zudem eine geringere Embryonensterblichkeit beim Transfer von Blastozysten alter Mütter in Uteri junger Empfänger nachgewiesen, was die Bedeutung des „jüngeren“ Reproduktionstraktes bei der Etablierung einer erfolgreichen Schwangerschaft belegt (Maurer und Foote 1971; Woods et al. 2017).

1.5 Altern ist mit intrazellulärem Stress assoziiert

Veränderungen des Metabolismus, wie ein Überschuss an Fettsäuren oder Zucker können zu einer Überproduktion von *reactive oxygen species* (ROS) oder Glykierung von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden (*advanced glycation end products* (AGEs)) führen. Eine Akkumulation von ROS und AGEs bedeuten intrazellulären Stress, welcher potentiell DNA, Proteine und Membranen schädigt und die Genexpression verändert (Übersichtsartikel: Harman 2006; Tatone et al. 2014). Das zelluläre Altern ist mit einer Akkumulation von ROS und AGEs assoziiert, was unter anderem auf einer höheren Produktion und einem reduzierten Schutz beruht (Übersichtsartikel: Harman 2006; Jinno et al. 2011; Rabbani und Thornalley 2015).

Vor zu hohem intrazellulären Stress schützen antioxidative Enzyme, wie die Superoxid Dismutase 2 (SOD2) und *catalase* (CAT) (Übersichtsartikel: Scandalios 2005). SOD2 setzt die hochreaktiven Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid um, CAT transformiert dieses in Wasser und Sauerstoff (Fita und Rossmann 1985; Fridovich 1995). Beide Enzyme werden über Transkriptionsfaktoren, wie *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2* (Nrf2) (Xue et al. 2012; Übersichtsartikel: Schmidlin et al. 2019) und Sirtuin-1 (SIRT1) (Aquilano et al. 2010; Olmos et al. 2013) reguliert. Ein zweiter Mechanismus umfasst die Glyoxalase 1 (GLO1) und Glyoxalase 2 (GLO2). Diese verstoffwechseln vor allem hochreaktive Dicarbonyle wie Methylglyoxal (MG), die in alltäglichen metabolischen Prozessen wie der Glykolyse entstehen und zelltoxisch sind. MG

kann unter anderem Proteine glykieren und somit zu posttranslationalen Modifikationen und weitreichenden Veränderungen des Zellprogrammes führen (Nass et al. 2007). Die stabilen Endprodukte sind die AGEs (Übersichtsartikel: Rabbani und Thornalley 2015). Bestimmte MG-Verbindungen, wie MG-H1 werden mit Insulinresistenz (Nigro et al. 2014; Xue et al. 2016) und dem Altern (Morcos et al. 2008) in Verbindung gebracht. Überhöhte AGE-Serum-Konzentrationen sind mit einer herabgesetzten Fertilität assoziiert. Außerdem besteht eine positive Korrelation zu einer Vielzahl systemischer Erkrankungen wie Adipositas, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Polyzystisches Ovarial Syndrom (PCO), aber auch dem Alter (Übersichtsartikel: Jinno et al. 2011).

Über das IIRS und angeschlossene Signalwege und Transkriptionsfaktoren werden Proliferation und Apoptose, aber auch der zelluläre Metabolismus und die Stressantwort reguliert. Wenn Veränderungen insbesondere im IIRS-System auftreten, könnte es zu Adaptationen in nachfolgenden Signalwegen kommen. Ein Schema der für die Arbeit relevanten Moleküle und Signalwege ist in Abbildung 5 dargestellt.

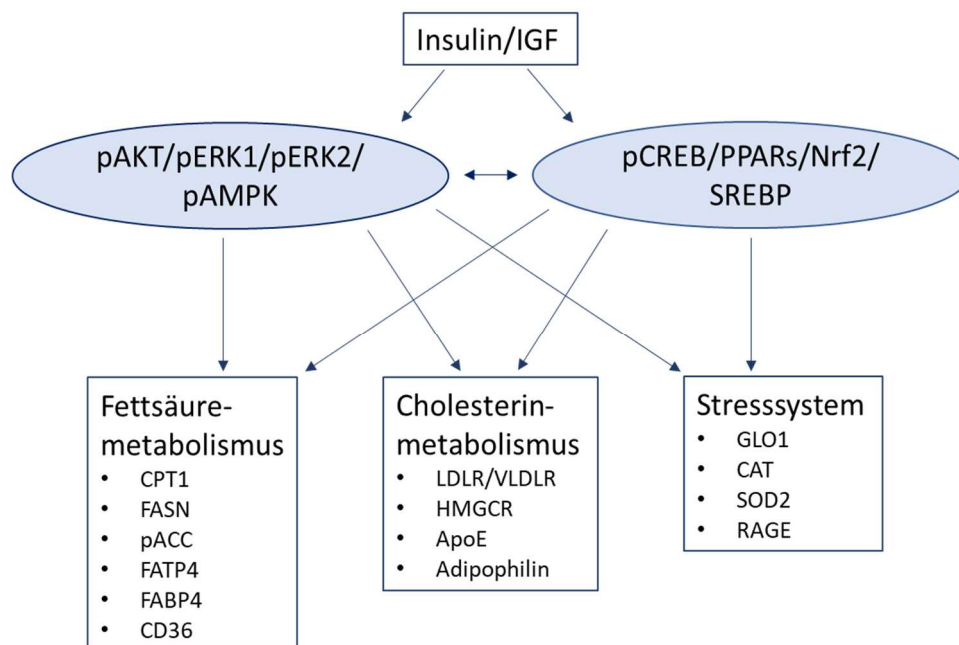


Abbildung 5: **Übersicht zu ausgewählten Signal- und Zielmolekülen von Insulin und IGF1 im Zellstoffwechsel**

Insulin und IGF aktivieren durch Phosphorylierung nachgeschaltete Signalwege und Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren u.a. Enzyme des Fettsäure- und Cholesterinstoffwechsels, sowie des Stresssystems. Die hier dargestellten Ziel- und Signalmoleküle stellen eine Auswahl der für diese Arbeit relevanten Moleküle dar.

Insulin (Ins), Insulin-like-growth-factor (IGF), Proteinkinase B (pAKT), *extracellular signal-regulated kinase* (pERK), *5'-AMP-activated protein kinase* (pAMPK), *cyclic AMP responsive element-binding protein* (pCREB), *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2* (Nrf2), *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs), Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT1), *fatty acid synthase* (FASN), *phospho-acetyl-CoA carboxylase* (pACC), Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4), *Fettsäurebindungsprotein 4* (FABP4), *cluster of differentiation 36* (CD36), *low density lipoprotein receptor* (LDLR), *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR), Apolipoprotein E (ApoE), Glyoxalase 1 (GLO1), *catalase* (CAT), Superoxid Dismutase (SOD2)

1.6 Das ApoE-Knockout-Kaninchen – ein Modell für metabolische Störungen im Alter

Apolipoproteine sind die Strukturproteine in der Membran von Lipoproteinen und zentrale Regulatoren des exogenen und endogenen Lipidmetabolismus. Sie ermöglichen durch ihre Amphiphilie den Transport der Lipide im Blut und steuern gleichzeitig deren Aufnahme am Zielort. Apolipoprotein E (ApoE) ist Bestandteil in Chylomikronen, *very low density lipoproteinen* (VLDL) und *high density lipoproteinen* (HDL). Chylomikronen transportieren intestinal synthetisierte, exogene Lipide vom Darm zur Leber, während endogene Lipide (u.a. Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide) in der Leber synthetisiert werden und in Form von VLDL in die Peripherie gelangen. HDL hingegen dienen der Umverteilung des Cholesterins und dem Rücktransport zur Leber. Über ApoE können die Lipoproteine am Zielort an den LDL-Rezeptor (LDLR) oder den ApoE-Rezeptor (ApoER) binden, die transportierten Lipide können von der Zielzelle aufgenommen, degradiert und dem intrazellulären Lipidmetabolismus zugeführt werden. Hauptsyntheseort des ApoEs ist die Leber, aber auch andere Organe, wie Gehirn, Niere und Milz sind in der Lage, es zu produzieren (Übersichtsartikel: Mahley 1988; Eichner et al. 2002). Insgesamt gibt es beim Menschen drei Isoformen von ApoE, die von drei Allelen codiert werden, sodass sechs verschiedene Genotypen in der Bevölkerung vertreten sind (Phillips 2014). Je nach Polymorphismen können diese entweder Risikofaktor oder Schutzfaktor für bestimmte Erkrankungen darstellen. So stellt das ApoE4-Allel einen Risikofaktor für Hypercholesterinämie, kardiovaskuläre Erkrankungen (Utermann et al. 1984), Diabetes mellitus (Koren-Itton et al. 2020) und Alzheimer (Liu et al. 2013) dar. Das ApoE2-Allel wirkt bei Alzheimererkrankungen eher schützend und ist gleichzeitig mit Hyperlipidämie assoziiert (Utermann et al. 1984; Liu et al. 2013). ApoE gilt als ein Schlüsselfaktor für das Altern (Ang et al. 2008; Sebastiani et al. 2019). ApoE-Knockout-Mäuse sind in den 1990er Jahren als Alternsmodell und Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen etabliert worden. Diese Mäuse erkrankten gehäuft an Hyperlipidämie und Atherosklerose (Piedrahita et al. 1992; Zhang et al. 1992) und zeigen weitere Merkmale des Alterns, wie ein verändertes Haarwachstum (Moghadasian et al. 1999). Außerdem ist die Glukose- und Insulintoleranz, sowie die Insulinsekretion beeinträchtigt (Koren-Itton et al. 2020). Auch das Stresssystem scheint dadurch beeinflusst. Bonomini und Koautoren zeigten in ApoE-defizienten Mäusen, dass CAT und SOD2 und somit die antioxidative Antwort in zentralen Organen, wie Leber, Niere und Herz reduziert sind (Bonomini et al. 2010). Die Lebensspanne der ApoE-defizienten Mäusen ist insgesamt verkürzt (Moghadasian et al. 2001). Die Funktion von ApoE-Mutationen für die Reproduktion ist noch wenig untersucht. ApoE ist in Ovarien vermehrt exprimiert. Da es für die Steroidgenese essentiell ist, bestimmt es den Reproduktionserfolg mit (Polacek et al. 1992). In männlichen ApoE-Knockout-Mäusen konnte

ein Arrest der Spermatogenese und eine Atrophie der Tubuli seminiferi beobachtet werden (Moghadasian et al. 1999). Auch die Allele selbst scheinen entscheidend: das ApoE2-Allel ist mit dem geringsten reproduktiven Erfolg assoziiert, das ApoE3-Allel mit dem höchsten (Corbo et al. 2004).

Das ApoE-Knockout-Modell wurde auch für Kaninchen entwickelt, um den Einfluss einer ApoE-Defizienz auf den Lipidmetabolismus und Stoffwechsel-assoziierte Erkrankungen in diesem Tiermodell simulieren zu können (Ji et al. 2015; Niimi et al. 2016). Das Modell ist besonders aussagekräftig, da der Lipidmetabolismus des Menschen dem des Kaninchens ähnlicher ist, als dem der Maus. So ist beim Kaninchen unter anderem LDL das dominierende Plasmaprotein, nicht HDL wie in Mäusen. Die LDLR-Aktivität in der Leber ist herunterreguliert und das Apolipoprotein B-48 (ApoB48) ist in Kaninchen und Menschen nur in Chylomikronen, nicht in VLDL und LDL vorhanden, wie es in Mäusen der Fall ist (Fan et al. 2014). In dieser Arbeit wird das ApoE-Knockout-Modell des Kaninchens untersucht, um die Einflüsse einer ApoE-Defizienz auf das reproduktive Altern und die embryo-maternale Kommunikation in der Präimplantationsphase zu untersuchen. Das Ziel war es, über ausgewählte Marker des IIRS, des Lipidmetabolismus und des Stresssystems systemische Veränderungen und lokale Adaptationen in den Reproduktionsorganen in ApoE-Knockout-Kaninchen aufzuzeigen.

1.7 Zielsetzung

Die Fertilität der Frau nimmt mit zunehmendem Alter ab. Die Gründe dafür sind vielfältig, beitragen können Veränderungen des Hormonspiegels und der Stoffwechsellage der Mutter, die sich in einem veränderten intrauterinen Milieu widerspiegeln und somit die Entwicklungsbedingungen des Embryos beeinflussen. Der Präimplantationsembryo reagiert adaptativ auf Veränderungen seiner Umgebung. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, altersbedingte Veränderungen in weiblichen Reproduktionsorganen zu beschreiben und die molekularen Signalwege der embryonalen Anpassung bei sechs Tage alten Kaninchenembryonen zu charakterisieren. Dafür wurden reproduktionsalte (älter als 108 Wochen) und junge (16-20 Wochen) Kaninchen in der Präimplantationsphase verglichen. Auf maternaler Seite wurden Serum, Leber, Ovar und Endometrium, auf embryonaler Ebene EB und TB bezogen auf das Insulin-Rezeptor-System, den Lipidmetabolismus und das Stresssystem analysiert. Diese Systeme sind sowohl in der Literatur, als auch in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe als besonders vulnerabel und essentiell für die embryonale Entwicklung beschrieben worden. Bisher konnten zwei Veröffentlichungen publiziert werden, eine weitere ist zum aktuellen Zeitpunkt in Vorbereitung. Alle drei werden in dieser Arbeit eine Kumulation finden.

Die Fragestellung der ersten Publikation (Trohl et al. 2023) befasst sich mit folgenden Punkten:

- Hat das fortgeschrittene mütterliche Alter einen Einfluss auf die Ovulationen und die Anzahl der Blastozysten im Kaninchen?
- Wie wirkt sich das mütterliche Alter auf die Insulin- und IGF1-Konzentrationen im Serum in Kaninchen aus?
- Welche Auswirkungen hat das systemische Insulin- und IGF1-Defizit auf die Liganden und Rezeptoren des IIRS in den mütterlichen Reproduktionsorganen?
- Welche Auswirkungen sind in EB und TB infolge der Veränderungen des mütterlichen IIRS-Systems zu bestimmen?
- Sind Veränderungen in zentralen Signalwegen auf embryonaler und maternaler Seite messbar, die vom Insulin-IGF-System aktiviert werden?

Über das IIRS werden u.a. zentrale Prozesse des Metabolismus reguliert, sodass ein weiteres Ziel der Arbeit war, den Lipidstoffwechsel genauer zu untersuchen. Dabei stellten sich folgende Fragen:

- Sind reproduktionsalte Kaninchen bereits an einer Dyslipidämie erkrankt?

- Welche zentralen Gene des Lipidmetabolismus werden durch das erhöhte mütterliche Alter in Blastozysten und Reproduktionsorganen verändert?

Altern wird auch als Summe des Schadens durch freie Radikale beschrieben (Hayflick 1965). Gerade ein veränderter Stoffwechsel führt vermehrt zu freien Radikalen und intrazellulärem Stress. Daher war ein weiterer Ansatz der ersten, aber auch der zweiten Publikation (Nivelle et al. 2020), die Folgen für das Stressabwehrsystem zu analysieren. Folgende Fragen wurden bearbeitet:

- Welche Auswirkungen hat das Alter auf zentrale Gene des antioxidativen und antiglykativen Stresssystems in Blastozysten und Reproduktionsorganen?

Im letzten Teil der Arbeit wurde das ApoE-Knockout-Modell als Alternsmodell in der Reproduktion eingeführt (Buske et al. *in preparation*). Vordergründig war der Vergleich zum alten Kaninchen. Hierbei stellten sich grundlegende Fragen:

- Welchen Einfluss hat der ApoE-Knockout auf die Ovulationen und Anzahl an Blastozysten?
- Hat der ApoE-Knockout in Kaninchen ähnliche Auswirkungen auf Liganden und Rezeptoren des IIRS, den Lipidmetabolismus und die Stressantwort in Reproduktionsorganen wie das fortgeschrittene mütterliche Alter?
- Ist das ApoE-Knockout-Kaninchen als Alternsmodell in der Reproduktion geeignet?

2 Diskussion

Für die Etablierung und den Erhalt einer Schwangerschaft ist eine abgestimmte Kommunikation zwischen Mutter und Kind notwendig. Auf maternaler Seite wird ein intrauterines Milieu aufgebaut, welches der möglichst optimalen Versorgung des Embryos dient. Da der Embryo von der mütterlichen Versorgung mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Hormonen abhängig ist, muss er sich in bestimmten Umfängen an den Stoffwechsel und die Hormonlage der Mutter adaptieren können. Embryonen weisen eine hohe metabolische Plastizität auf, die es ihnen ermöglicht sich kurzfristig an veränderte Wachstumsbedingungen anzupassen. Eine Maladaptation könnte die Lebensfähigkeit und Implantationswahrscheinlichkeit der Embryonen herabsetzen und eine nachhaltige Prägung des Organismus bewirken (Übersichtsartikel: Lane und Gardner 2007; Krisher et al. 2015). Mit fortschreitendem Alter der Frau nimmt ihre Fertilität ab und das Risiko für Früh- und Fehlgeburten, fetale Anomalien oder Geburtskomplikationen nimmt zu (Übersichtsartikel: Sauer 2015). Die drei Hauptgründe sind in der Abnahme der ovariellen Reserve, der Oozytenqualität und des Entwicklungspotentials des Embryos zu sehen (Bergh et al. 1999; Übersichtsartikel: Cimadomo et al. 2018).

Im Folgenden soll die komplexe Interaktion zwischen Mutter und Embryo unter Einbeziehung der im Reproduktionsmodell des Kaninchens gewonnenen Ergebnissen diskutiert werden. Die Diskussion fokussiert dabei auf den Einfluss mütterlichen Alters auf das IIRS, den Lipidmetabolismus und das Stresssystem in der Frühschwangerschaft. Es wird sowohl die mütterliche, als auch die embryonale Seite betrachtet und anschließend mit dem ApoE-Knockout-Modell verglichen.

2.1 Der Embryonenverlust in der Präimplantationsphase nimmt mit dem mütterlichen Alter zu

In der Veröffentlichung (Trohl et al. 2023) wurde gezeigt, dass reproduktionsalte Kaninchen im gleichen Umfang ovulieren wie junge Häsinnen, sich jedoch weniger Blastozysten an Tag 6 entwickeln, was schlussfolgern lässt, dass die Follikulogenese unbeeinträchtigt ist. Für den Embryonenverlust während der Präimplantationsphase kommen zum einen ein Qualitätsverlust „alter“ Oozyten (Übersichtsartikel: te Velde und Pearson 2002; Qiao et al. 2014; Cimadomo et al. 2018), zum anderen die veränderten Entwicklungsbedingungen, die zu einer Adaptation der Embryonen führen, in Frage (Übersichtsartikel: Lane und Gardner 2007; Krisher et al. 2015).

Eine schlechtere Oozytenqualität als potentielle Ursache für die geringere Embryonenanzahl bei reproduktionsalten Kaninchen könnte erklären, warum reproduktionsalte Häsinnen am Tag 6 *p.c.* weniger Embryonen aufweisen als die junge Vergleichsgruppe, denn auch die

Blastozystenformation ist abhängig von der Oozytenqualität (Velazquez et al. 2011b). Aus *in-vitro*-Fertilisationsstudien (IVF) ist bekannt, dass mit höherem Spenderinnen-Alter die Aneuploidierate bei Oozyten und Embryonen ansteigt und damit deren Qualität abnimmt (Hassold und Chiu 1985; Fragouli et al. 2013; Capalbo et al. 2017). Aneuploide Oozyten können zum Teil nicht befruchtet werden. Außerdem findet eine Selektion der Embryonen bis in die frühe Implantationsphase statt, sodass weniger Embryonen das Blastozystenstadium erreichen. Studien auf Grundlage von IVFs und intrazytoplasmatischen Spermieninjektionen (ICSI) zeigen, dass Embryonen und Oozyten älterer Mütter vermehrt morphologisch auffällig sind. Die Frauen weisen häufiger degenerative Oozyten, Zygoten mit drei Pronuclei und 4-Zell-Embryonen auf, die tendenziell öfter fragmentieren (Lim und Tsakok 1997; Grøndahl et al. 2017). Zudem verbleiben Embryonen mit herabgesetzter Entwicklungskompetenz in früheren Entwicklungsstadien oder entwickeln sich langsamer (Liu et al. 2016; van der Weijden et al. 2021). Dies könnte sich in einem Embryonenverlust widerspiegeln. Warshaviak und Koautoren beschreiben, dass gerade Embryonen von Frauen älter als 42 Jahre anfälliger für einen Arrest im 5-8 Zellstadium sind (Warshaviak et al. 2019). Die Untersuchungen am Kaninchen beschränkten sich auf den Tag 6 *p.c.*, frühere Zeitpunkte wurden nicht erfasst, was für den beobachteten Embryonenverlust eine reduzierte Entwicklungskompetenz bzw. vermehrte Selektion veränderter Embryonen als Ursache vermuten lässt.

Die Oozytenqualität kann außerdem aufgrund von dysfunktionellen Mitochondrien herabgesetzt sein, welche mit höherem Alter assoziiert sind (Wilding et al. 2001; Übersichtsartikel: van Blerkom 2011; Eichenlaub-Ritter 2012; Cimadomo et al. 2018). Mitochondrien sind neben der Energieproduktion relevant für die Calcium-Homöostase, das intrazelluläre Redoxpotential und Signalwege (Übersichtsartikel: Dumollard et al. 2007). Sie werden auch als Kontrollsystem für Entwicklung und Apoptose in der frühen Embryonalentwicklung beschrieben (Übersichtsartikel: Dumollard et al. 2007). Mitochondrien werden mütterlich vererbt und sind mit Zellzyklusstörungen, Chromosomensegregation und einer gestörten Embryonalentwicklung assoziiert. Die mitochondriale DNA-Transkription wird direkt von dem ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor *mitochondrial transcription factor-A* (mtTFA) reguliert und die mtDNA-Kopienanzahl bestimmt (Ekstrand et al. 2004). Im Gegensatz zu *in vitro* gereiften Oozyten des alten Pferdes (Zhao et al. 2021) waren die Embryonen von reproduktionsalten Häsinnen in der Expression von mtTFA nicht verändert (Trohl et al. 2023), was annehmen lässt, dass die mitochondriale Alterung nicht maßgeblich für eine verringerte Embryonenanzahl an Tag 6 *p.c.* beim Kaninchen ist.

Ein zweiter potentieller Grund für den Embryonenverlust wären die veränderten Entwicklungsbedingungen *in utero* bei reproduktionsalten Müttern, die dazu führen, dass Embryonen unzureichend adaptieren und absterben (Übersichtsartikel: Lane und Gardner 2007; Krisher et al. 2015). Aus *in-vitro*-Studien ist bekannt, dass Säugetierembryonen eine bestimmte metabolische Plastizität besitzen, die es ihnen ermöglicht, sich an veränderte Kulturbedingungen anzupassen (Übersichtsartikel: Massimiani et al. 2019). Das könnte bedeuten, dass Embryonen mit einer höheren metabolischen Plastizität anpassungsfähiger sind, indem sie z.B. über einen forcierten Lipidmetabolismus mehr Energie generieren (Guerif et al. 2013; Lima et al. 2020). Eine unzureichende Adaptation an suboptimale Bedingungen kann eine verminderte Lebensfähigkeit und Implantationsrate zur Folge haben (Übersichtsartikel: Lane und Gardner 2007; Krisher et al. 2015).

Bei reproduktionsalten Häsinnen an Tag 6 *p.c.* kommt es zu einem veränderten Stoffwechsel. Im Serum lagen vermehrt freie Fettsäuren und LDL vor, die Wachstumsfaktoren Insulin und IGF1 waren vermindert (Trohl et al. 2023). Diese Veränderungen können die unmittelbaren Entwicklungsbedingungen der Embryonen beeinflussen. Folglich könnte der Embryonenverlust nicht nur in einer verminderten Oozytenqualität, sondern auch in einer unzureichenden Adaptation an eine veränderte Stoffwechsellage begründet sein.

2.2 Das Reproduktionsalter der Häsinnen bewirkt Adaptationen des IIRS bei Mutter und Embryo in der Frühschwangerschaft

Das IIRS spielt eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung und der embryo-maternalen Kommunikation (Harvey and Kaye, 1992; Kaye, 1997; Navarrete Santos et al., 2008; Pantaleon et al., 1997). Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 6 dargestellt.

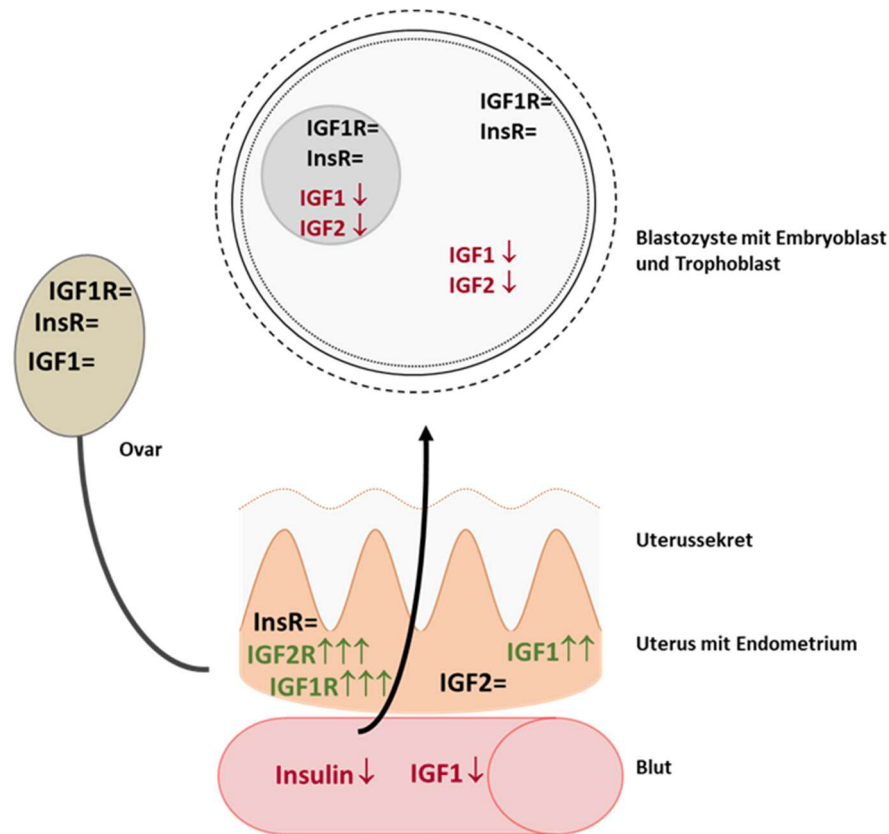


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Expression des Insulin-IGF-Rezeptor-Systems in Blastozysten und Reproduktionsorganen reproduktionsalter Kaninchen an Tag 6 p.c.

Es werden die relativen RNA-Mengen der Liganden und Rezeptoren in EBs, TBs, Endometrium und Ovar, sowie die Protein-Mengen von Insulin und IGF1 im Serum reproduktionsalter (>108 Wochen) in Bezug auf junge (<22 Wochen) Kaninchen an Tag 6 der Schwangerschaft dargestellt. Die Pfeile zeigen die relativen Veränderungen mit dem Alter der Mutter, wobei die Anzahl der Pfeile ein Ausdruck der Signifikanz des Ergebnisses ist (↑ $p \leq 0,05$; ↑↑ $p \leq 0,01$; ↑↑↑ $p \leq 0,001$; = kein Unterschied).

Insulin-like-growth-factor 1/2 (IGF1/2), IGF1-Rezeptor (IGF1R), IGF2-Rezeptor (IGF2R), Insulin-Rezeptor (InsR)

2.2.1 Mit zunehmendem Alter der Mutter nehmen Insulin- und IGF1- Serumspiegel ab, im Endometrium nimmt die Menge an IGF1 kompensatorisch zu

In reproduktionsalten Kaninchen konnte eine altersbedingte Abnahme an Insulin und IGF1 im Serum festgestellt werden (Trohl et al. 2023). Auch bei Frauen ab 35 Jahren können verminderte Konzentrationen von IGF1 nachgewiesen werden (Gleicher et al. 2020; Yovich et al. 2020; Mazurkiewicz und Bronkowska 2021; Gleicher et al. 2022). Tatsächlich wird mit dem Alter eine zentrale Herunterregulation der somatotropen Achse beobachtet, welche eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Alterns und der Lebensspanne inne hat (Übersichtsartikel: Barzilai et

al. 2012; Gubbi et al. 2018). Abweichende IGF1-Konzentrationen können das IVF-Outcome negativ beeinflussen (Gleicher et al. 2022). IGF1 wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, stimuliert von Östrogen (Richards et al. 1991). Ab dem Alter von 37.9 Jahren sinkt mit abnehmender Follikelanzahl die ovarielle Östrogenproduktion der Frau (MacNaughton et al. 1992). Eine Abnahme der Östrogenkonzentration könnte eine Ursache für die geringeren IGF1-Konzentrationen im Plasma sein, wurde bei Kaninchen allerdings nicht quantifiziert.

Bezugnehmend auf das gehäufte Auftreten eines Gestationsdiabetes (GDM) bei Frauen ab 35 Jahren hat die Insulinsekretion eine essentielle Bedeutung (Kahveci et al. 2018; Li et al. 2020). Physiologisch setzt in der zweiten Schwangerschaftshälfte eine Insulinresistenz ein. Bei einem GDM liegt zusätzlich ein Sekretionsdefekt vor, der zur Hyperglykämie führt (Ryan et al. 1995; Kautzky-Willer et al. 1997) und mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburt, Infektionen, Hypertension und diabetischer Fetopathie (S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM) 2018) assoziiert ist. Das von uns beobachtete Insulindefizit im Serum alter Kaninchen könnte ein erstes Anzeichen für einen Insulinsekretionsdefekt bei reproduktionsalten Müttern sein.

Anders als im Serum war im Endometrium reproduktionsalter Häsinnen die Transkription von IGF1, sowie dem IGF1R und IGF2R gesteigert, was eine kompensatorische Reaktion auf den systemischen Insulin- und IGF1-Mangel vermuten lässt (Trohl et al. 2023). Im Endometrium diabetischer Kaninchen sind IGF1 und IGF2 als Kompensationsmechanismus auf den systemischen IGF1- und Insulinmangel ebenfalls erhöht (Thieme et al. 2012b). Auch in Rindern konnte gezeigt werden, dass die Plasmakonzentrationen an IGF1, nicht zwangsläufig mit den Konzentrationen im uterinen Lumen korrelieren (Bilby et al. 2004; Bilby et al. 2006). Vielmehr ist das Endometrium selbst in der Lage IGFs zu produzieren (Han et al. 1996; Nayak und Giudice 2003). Zudem ist in der Dezidua alter Mäuse eine erhöhte IGF1-Transkription nachweisbar, was mit einer Entwicklungsverzögerung am Tag 11,5 einhergeht (Woods et al. 2017). Die Proliferation der endometrialen Epithelzellen wird über IGF1/IGF1R vermittelt (Klotz et al. 2002; Zhu und Pollard 2007; Hewitt et al. 2019; Zhou et al. 2021). In InsR-IGF1R-Knockout-Mäusen ist das Endometrium deutlich dünner, da die Epithel- und Stromazellen weniger proliferieren. Eine Implantation ist nicht möglich (Sekulovski et al. 2021; Zhou et al. 2021). Ein hochregulierter IGF1R stellt eine Adaptation an einen systemischen Mangel an IGF1 und Insulin dar, um eine höhere Sensitivität der uterinen Zellen gegenüber IGFs zu gewährleisten und die regulierte Zellproliferation und Implantation ins Endometrium zu ermöglichen. Im diesem Zusammenhang kann die lokal erhöhte endometriale IGF-Expression bei reproduktionsalten Häsinnen als möglicher Adaptationsmechanismus sowie als *feedback* Regulation auf die verminderte IGF1-

und Insulinkonzentration im Serum interpretiert werden, die es ermöglichen, ein suffizientes Mikromilieu aufrecht zu erhalten.

Über die Anpassung des parakrinen IIRS im Endometrium alter Kaninchen verändert sich die Signaltransduktion und Zielgenaktivierung. Zum Beispiel wurden geringere Proteinmenge für AKT, ERK1/2 und CREB im Endometrium reproduktionsalter Kaninchenmütter gemessen. Die Untersuchungen beschränkten sich bisher auf die Molekülmenge, da die Enzymaktivität mangels funktionierender Antikörper im Endometrium nicht bestimmt werden konnte. Hier besteht ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Analysen. Über den AKT-, CREB- und ERK/MAPK-Signalweg wird die Proliferation der Epithel- und Stromazellen in Vorbereitung zur Implantation stimuliert und es findet eine enge embryo-maternale Interaktion statt (Übersichtsartikel: Gellersen und Brosens 2003; Vallejo et al. 2014; Massimiani et al. 2019). Beispielsweise vermittelt das embryonale IGF2 über den endometrialen IGF1R und über ERK1/2 die Anheftung der Blastozyste an das Endometrium (Zhou et al. 2021).

In Zusammenschau der Ergebnisse ist festzuhalten, dass in der Frühschwangerschaft das Endometrium den Mangel an IGF1 und Insulin im Serum durch parakrine Sekretion von IGF1 kompensiert, was eine Regulation der nachgeschalteten Signalwege nach sich zieht. Diese sind essentiell für die embryo-maternale Interaktion und die Entwicklung einer erfolgreichen Schwangerschaft.

Im Ovar reproduktionsalter Häsinnen war innerhalb des IIRS ausschließlich die IGF2 Transkription vermindert (Trohl et al. 2023). In den meisten Säugetieren stimulieren IGFs im Ovar die Proliferation von Granulosazellen und das Oozytenwachstum über den Akt-Signalweg. (Louhio et al. 2000; Silva et al. 2009). Zusätzlich zur endokrinen Versorgung mit Insulin und IGFs scheint es ein „intraovarielles IIRS“ zu geben, wobei die Versorgung und Regulation auto- und parakrin zwischen den Zellen stattfindet (Dri et al. 2021). Dieses könnte die Versorgung des Ovars aufrechterhalten. IGF2 wirkt im Ovar über den IGF1R und ist essentiell für die Follikulogenese, besonders für die Differenzierung der Granulosazellen und für die Steroidgenese (Baumgarten et al. 2015; 2017). Die Frage inwieweit die verminderte IGF2-Transkription in reproduktionsalten Ovarien auf eine Dysregulation des „intraovariellen IIRS“ hindeutet oder Ausdruck eines Kompensationsmechanismus aufgrund endokriner Veränderungen sein könnte, sollte durch spezifische Analyse der einzelnen Zelllinien geklärt werden. Die Zielmoleküle im Ovar zeigen in der Regulation ähnliche Tendenzen wie auch im Endometrium.

2.2.2 In Blastozysten adaptiert das IIRS und nachgeschaltete Signalmoleküle als Reaktion auf die veränderte para- und endokrine Versorgung der alternden Mutter

Während im Endometrium des reproduktionsalten Kaninchens in der Präimplantationsphase vermutlich kompensatorisch IGF1 und IGF1R überexprimiert werden, ist die Expression der IGFs sowohl im EB, als auch im TB vermindert und der Rezeptoren unverändert (Trohl et al. 2023). Präimplantationsembryonen sind sensitiv für IGFs und Insulin (Thieme et al. 2012b; Schindler et al. 2013). Während Insulin in der Präimplantationsphase ausschließlich von der Mutter gebildet wird, werden IGFs sowohl vom Embryo, als auch von maternalen Reproduktionsorganen und der Leber produziert (Ramin et al. 2010).

Es kann nicht abschließend beurteilt werden, ob in reproduktionsalten Kaninchen IGF1 in ausreichendem Maße durch das Endometrium bereitgestellt wird, obwohl die parakrine Funktion des Endometriums gut untersucht ist. Glykogen und Fettsäuren werden beispielsweise im *Stratum functionale* des Endometriums gespeichert und können dem Embryo bereitgestellt werden (Übersichtsartikel: Ribeiro et al. 2016; Dean 2019). Durch Untersuchungen am Kaninchen konnte nachgewiesen werden, dass IGF1 vom Endometrium nicht nur lokal für die Proliferation des Endometriums, sondern auch für die Blastozyste bereitgestellt wird (Trohl et al. 2023). IGF1 wirkt abhängig von seiner Konzentration und reguliert Signalwege, die sowohl stimulierende, als auch inhibierende Effekte auf den Embryo haben. Bei zu hohen Konzentrationen kann die embryonale Synthese der IGFs reduziert sein, denn in einem bestimmten Umfang sind die Embryonen in der Lage an das IGF-Angebot des Endometriums zu adaptieren. Supraphysiologische IGF1-Konzentrationen können zu höheren Apoptoseraten, hyperplastischen Embryoblasten und einer insgesamt geringeren Variabilität der Embryonen führen, wie in-vitro-Studien mit Mäusen und Rindern beweisen. Dies geht als Ausdruck der Feedback-Regulation mit einer verringerten IGF1R-Expression einher (Chi et al. 2000; Zaraza et al. 2010; Velazquez et al. 2011b; 2011a). Auch bei Kaninchenembryonen mit einer erhöhten Transkription an IGFs ist die Proteinmenge von InsR und IGF1R verringert (Ramin et al. 2010; Thieme et al. 2012b).

In Embryonen reproduktionsalter Kaninchen findet eine Anpassung an die bereitgestellten IGFs statt, ohne dass es zu einer Regulation der Rezeptoren kommt, welche mit supraphysiologischen Konzentrationen und einer verringerten Viabilität und Entwicklungskompetenz assoziiert ist. In physiologischen Konzentrationen wirkt IGF1 mitogen, proliferativ und antiapoptotisch und trägt zu einer erfolgreichen Entwicklung bei, sodass die Embryonen das Blastozystenstadium erreichen. Die Apoptoserate ist geringer und der Embryoblast nimmt an Masse zu. Dies konnten

Stimulationsversuche in Rindern (Byrne et al. 2002; Makarevich und Markkula 2002; Block et al. 2008), Menschen (Lighten et al. 1998; Spanos et al. 2000) und Kaninchen (Herrler et al. 1998) zeigen. Herrler et al. beschreiben eine Größenzunahme von Kaninchenembryonen unter IGF1-Stimulation (Herrler et al. 1998). Auch die Embryonen reproduktionsalter Kaninchen waren im Durchschnitt größer als die junger Häsinnen, was einen Zusammenhang mit der erhöhten Bereitstellung an IGF1 durch das Endometrium vermuten lässt. Die „balancierte“ IGF1-Konzentration scheint dem Goldilocks-Prinzip zu entsprechen (siehe Kapitel 1.4) und Voraussetzung für eine optimale embryo-maternale Kommunikation zu sein. Der höhere Embryonenverlust in alten Kaninchen kann auch in der veränderten Regulation des IIRS begründet sein.

Von Bedeutung scheint hier außerdem die zelltypabhängige Expression der IGF-Rezeptoren zu sein (wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben). Eine erhöhte IGF1-Produktion durch das Endometrium würde demzufolge vor allem den EBs (und das Endometrium) proliferativ und mitogen stimulieren, während TBs, die vor allem InsR-A/-B exprimieren, weniger sensitiv sind (Navarrete Santos et al. 2008). Daher kann es zu der oben beschriebenen Größenzunahme vor allem des EB bei IGF1-Stimulation kommen.

Die Wirkungen des IIRS werden über zentrale Signalwege in Blastozyten vermittelt. ERK1/2 und auch Akt sind in Kaninchenblastozysten hochreguliert (Trohl et al. 2023), wobei die Blastozysten vermehrt metabolische und antiapoptotische Stimuli über Akt und Signale zur Zelldifferenzierung über ERK1/2 bekommen. Der nachgeschaltete Transkriptionsfaktor CREB liegt in EBs ebenfalls verstärkt phosphoryliert vor. Die CREB-Menge selbst ist im EB verringert, was im negativen Feedback-Mechanismus zu begründen ist (Schindler et al. 2013).

Die Veränderungen in zentralen Signalwegen in EBs und TBs alter Kaninchen können auf Veränderungen des IIRS im Embryo auf der einen und eine veränderte Versorgung durch das Endometrium auf der anderen Seite zurückgeführt werden. Die Regulationsmechanismen können als ein Beispiel embryo-maternalen Kommunikation gesehen werden, bei der mütterliche Veränderungen im Endometrium zur Adaptation des Embryo *in utero* führen. Weitere Analysen sind notwendig, um die Balancierung der mitogenen und antiapoptotischen Prozesse im Detail zu verstehen.

2.3 Der maternale und embryonale Lipidmetabolismus in der Präimplantationsphase verändert sich mit steigendem mütterlichen Alter

Der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine entscheidende Rolle als Bindeglied zwischen dem IIRS und dem Metabolismus in Präimplantationsembryonen (Schindler et al. 2013). CREB bindet CRE-Sequenzen, die in einer großen Vielzahl von metabolischen Genen, unter anderem in metabolischen Genen des Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus vorkommen (Zhang et al. 2005). Daher wurden diese Zielgene in der vorliegenden Arbeit in maternalen und embryonalen Geweben untersucht. In Abbildung 7 ist eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dargestellt.

Im Serum alter Tiere sind neben den freien Fettsäuren und auch die LDL-Werte signifikant höher als im Serum junger Tiere (Buske et al. in preparation). Beide Werte liegen jedoch noch innerhalb der Referenzserumwerte für Kaninchen (Kraft 2013). Für andere Parameter, wie Glucose, Cholesterin, HDL oder Triglyceride lagen keine Unterschiede zwischen jungen und reproduktionsalten Tieren vor (Buske et al. in preparation). Diese Ergebnisse sind im Sinne eines „alternden“ Metabolismus als frühe Veränderungen einzuordnen, eine klinische Dyslipidämie ist (noch) nicht auffällig. Im Laufe des Lebens nehmen LDL und Triglyceride zu, HDL nimmt ab (Ericsson et al. 1991; García-Fernández et al. 2008; Johnson und Stolzing 2019). Die Dyslipidämie ist eine „*Pathologie*“ des Alters.

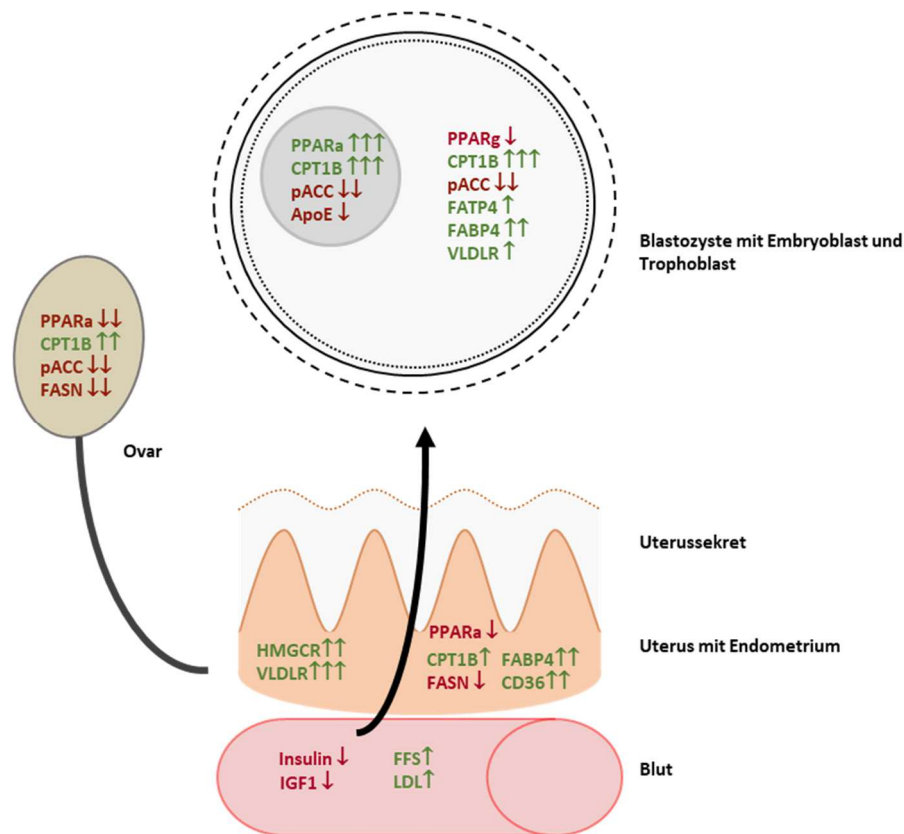


Abbildung 7: **Schematische Zusammenfassung der Veränderungen bei Zielgenen und Faktoren des Lipidmetabolismus** in Blastozysten und im Reproduktionstrakt reproduktionsalter Häsinnen an Tag 6 p.c.

Es werden die relativen Transkriptions- und Proteinmengen der Zielgene des Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus in EBs, TBs, Endometrium und Ovar, sowie die Quantität von Insulin, IGF1, FFS und LDL im Serum reproduktionsalter (>108 Wochen) in Bezug auf junge (<22 Wochen) Kaninchen dargestellt. Die Pfeile zeigen die relative Veränderung mit dem Alter der Mutter an, wobei die Anzahl der Pfeile Ausdruck der Signifikanz des Ergebnisses ist (↑ $p \leq 0,05$; ↑↑ $p \leq 0,01$; ↑↑↑ $p \leq 0,001$; = kein Unterschied). Um die Übersicht zu wahren, werden nur veränderte Parameter dargestellt.

Insulin-like-growth-factor 1 (IGF1), *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPARα), Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT1B), *fatty acid synthase* (FASN), *phospho-acetyl-CoA carboxylase* (pACC), Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4), Fettsäurebindungsprotein 4 (FABP4), *cluster of differentiation 36* (CD36), *very low density lipoproteinen receptor* (VLDLR), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR), Apolipoprotein E (ApoE), freie Fettsäuren (FFS), *low density lipoprotein* (LDL)

2.3.1 Die Umstellung des Fettsäuremetabolismus mit Hochregulation der CPT1 gewährleistet die Versorgung der Embryonen

Eine vermehrte Aktivierung von nukleärem CREB reguliert unter anderem das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der β -Oxidation, CPT1. In Hepatozyten können, nachdem nukleäres pCREB und CREB reduziert wurde, verminderte mRNA-Mengen an CPT1 nachgewiesen werden, was mit einer vermehrten Verfettung der Leber einhergeht (Aroor et al. 2012). In Reproduktionsorganen und Embryonen reproduktionsalter Häsinnen wird nach Stimulation durch pCREB CPT1 vermehrt transkribiert, was für einen intensivierten Abbau freier Fettsäuren in diesen Geweben spricht (Trohl et al. 2023). Die gesteigerte β -Oxidation durch Zugabe des Cofaktors von CPT1 verbessert die Entwicklungskompetenz von Oozyten und

Morulae in vitro. Sowohl der metabolisch-regulative, als auch der antioxidative Effekt, der durch die Verminderung der cytotoxischen, freien Fettsäuren zustande kommt, sind förderlich für die Lebensfähigkeit der Embryonen (Dunning et al. 2010; Dunning et al. 2011; Shafiei et al. 2020). Die Hemmung der Fettsäureoxidation in Schweine- und Rinderootozyten, sowie in Rinderembryonen bremst wiederum deren Entwicklung (Sturmey und Leese 2003; Ferguson und Leese 2006). Auch Kaninchenembryonen zeigen eine positive Anpassung durch die gesteigerte Fettsäureoxidation. Gleichzeitig sind Enzyme zur Fettsäuresynthese (*fatty acid synthase* (FASN), *phospho-acetyl-CoA carboxylase* (pACC)) in Reproduktionsorganen reproduktionsalter Kaninchen herunterreguliert. Es zeigt sich ein Expressionsmuster mit einem vermehrten Fettsäureabbau bei einer geringeren -synthese. Gleichzeitig lässt sich eine gesteigerte Verfügbarkeit freier Fettsäuren nachweisen. Des Weiteren konnten Gene für die Fettsäureaufnahme (FATP4) und den -transport (FABP4, CD36) zelllinienspezifisch mit einer höheren Expression nachgewiesen werden (Trohl et al. 2023).

Von Krebszellen ist bekannt, dass ein vermehrter Abbau von Fettsäuren zellulär genutzt wird, um den erhöhten Energieverbrauch bedingt durch die forcierte Proliferation zu decken (Samudio et al. 2009). Krisher und Prather vergleichen embryonale Zellen mit Krebszellen. Sie stellen heraus, dass Embryonen in der Frühschwangerschaft vergleichsweise weniger an Masse zulegen und Fettsäuren somit hauptsächlich der Energiebereitstellung und weniger dem Aufbau von Biomembranen dienen (Krisher und Prather 2012).

Im Endometrium dienen Fettsäuren als Energieressource und als Ausgangsprodukt für andere Lipidderivate wie Eicosanoide (Ribeiro et al. 2016). Zu den Eicosanoiden zählen unter anderem Prostaglandine, die wichtige Funktionen als Gewebsmediatoren erfüllen und eine essentielle Rolle in der Dezidualisierung und Implantation des Embryos spielen (Kennedy et al. 2007; Yanes et al. 2010). Auch der Embryo wird mit den gespeicherten Lipiden versorgt (Ribeiro et al. 2016).

Es sei darauf hingewiesen, dass eine Untersuchung der Aktivität der CPT1 in den vorliegenden Studien nicht durchgeführt wurde. Somit ist eine Aussage darüber, ob tatsächlich vermehrt Fettsäuren zur Energiegewinnung oxidiert werden, nicht möglich. Aus Herz, Lunge und Skelettmuskel ist jedoch bekannt, dass die CPT1-Aktivität im Alter abnimmt (Hansford und Castro 1982; (McMillin et al. 1993; Odiet et al. 1995) und mit der Akkumulation von Lipiden korreliert (Dobbins et al. 2001; Kim et al. 2009). Erhöhte Konzentrationen an Fettsäuren können die Fertilität wiederum beeinträchtigen. In Embryonen führen sie zu einer herabgesetzten Viabilität und Qualität, sowie einem veränderten Metabolismus (van Hoeck et al. 2011). Bezogen auf die Goldilocks-Hypothese (siehe Kapite 1.4) wird eine optimale Spannbreite metabolischer

Aktivität in Embryonen postuliert. Es wäre deshalb anzunehmen, dass der höhere Embryonenverlust reproduktionsalter Mütter in einer geringeren Stresstoleranz und geringeren Spannbreite metabolischer Aktivität in Embryonen alter Mütter begründet sein könnte. Durch weitere Untersuchungen bleibt zu klären, inwieweit die Hochregulation der CPT1 tatsächlich zur erhöhten Bereitstellung von Energie führt.

Freie Fettsäuren können in Lipidtröpfchen gespeichert werden, was dem Schutz vor Lipotoxizität dient (Bradley und Swann 2019). Ein hoher Anteil an Lipidtröpfchen ist ein Marker schlechter Embryonenlebensfähigkeit und Qualität in Rindern und Schweinen (Abe et al. 1999; Abe et al. 2002; Kikuchi et al. 2002; Andrade Melo-Sterza und Poehland 2021). Adipophilin ist eines der Proteine in der Membran der Lipidtröpfchen und dient als Marker für deren Gehalt in der Zelle (Heid et al. 1998). Da die mRNA-Mengen für Adipophilin in EBs und TBs alter Kaninchen nicht verändert sind, weist nichts auf einen erhöhten Anteil an Lipidtröpfchen in Blastozysten alter Kaninchen hin.

Zusammenfassend wird durch diese Arbeit gezeigt, dass der altersbedingte Insulin- und IGF1-Mangel, sowie die erhöhte Zufuhr freier Fettsäuren über das mütterliche Serum, zu kompensatorischen Regulationen des IIRS und des Fettstoffwechsels in den Reproduktionsorganen und Embryonen führt. Die Fettsäureaufnahme und der Fettsäureabbau sind in den betroffenen Geweben intensiviert. Gleichzeitig kann weder von einer erhöhten Fettsäuresynthese noch von einer vermehrten Speicherung von Lipidtröpfchen ausgegangen werden, da weder die FASN, noch Adipophilin erhöht waren. Stattdessen scheint die Energiegewinnung aus Fettsäuren durch die Hochregulation von CPT1 gesteigert zu sein. Die Resultate demonstrieren einen embryonalen Adaptationsmechanismus der eine optimale Energieversorgung der überlebenden Embryonen gewährleistet.

2.3.2 Mit zunehmendem Alter der Mutter kommt es zu einer vermehrten

Cholesterinsynthese und -aufnahme in Reproduktionsorganen und Blastozysten

Im Endometrium alter Kaninchen und in deren Embryonen kommt es zu altersbedingten Veränderungen im Cholesterinmetabolismus. Der VLDLR ist in der Leber, im Endometrium und in TBs, der LDLR zudem in der Leber erhöht (Trohl et al. 2023). Erhöhte Serum-LDL-Konzentrationen, wie sie regelhaft im Alter auftreten, können auf die verminderte Kapazität LDL (hepatisch) aufzunehmen zurückgeführt werden. So kann über Stimulation der Expression des hepatischen LDLR in alten Männern die Abbaurate von LDL auf die von jungen Männern erhöht werden (Ericsson et al. 1991). Erhöhte LDL-Konzentrationen im Serum alter Kaninchen sind repräsentativ für altersbedingte Veränderungen des Metabolismus, die vermehrte Transkription des hepatischen LDLR weist auf eine erhöhten Endozytose und Degradation des

LDL hin und könnte einen Anpassungsmechanismus des alternden Kaninchenmetabolismus darstellen.

Der VLDLR ist in der Lage die Lipoproteine VLDL und Chylomikronen über Endozytose aufzunehmen und anschließend aufzuspalten (Perman 2011; Perman et al. 2011; Takahashi 2017). Anders als der LDLR kann VLDLR kein LDL endozytieren und wird nicht durch den intrazellulären Gehalt an Sterine über die *sterol regulatory element* (SRE)-1 reguliert (Takahashi et al. 2004; Takahashi 2017). Stattdessen wird die Expression des VLDLR als Reaktion auf Stress, wie Hypoxämie oder über die Stimulation mit cAMP hochreguliert, sodass es zu einer vermehrten Aufnahme von Chylomikronen und VLDL kommt (Yang et al. 2014; Tamura et al. 2020). In humanen endometrialen Stromazellen führt die Hochregulation des VLDLR zur Lipidakkumulation während der Dezidualisierung, um die Versorgung des Embryos zu gewährleisten (Tamura et al. 2020). Durch die Hochregulation des VLDLR in alten Häsinnen wäre eine vermehrte Aufnahme von VLDL, Chylomikronen und Cholesterin als Bestandteil des VLDL möglich.

Des Weiteren liegt die HMGCR, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, im Endometrium alter Kaninchen vermehrt transkribiert vor. Eine Hochregulation von HMGCR, die mit der Induktion der Cholesterinsynthese korreliert, wurde in fetoplazentalen Endothelzellen von an GDM erkrankten Müttern beobachtet (Sun et al. 2018). Bei IGF1-defizienten Mäusen führt der Mangel an IGF1 zu Veränderungen der hepatischen Gene des Lipidmetabolismus, wie der HMGCR und zu Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und Hyperglykämie. Durch IGF1-Substitution waren diese Effekte reversibel (Ita et al. 2015). Die Assoziation zwischen geringen IGF1-Konzentrationen im Serum, Hypercholesterinämie und Hyperlipidämie, sowie dem metabolischen Syndrom und kardiovaskulären Erkrankungen ist in der Literatur wiederholt beschrieben (Malík et al. 2008; Ren und Anversa 2015). Um die Komplexität der spezifischen Regulationsmechanismen zu verstehen und diese auf den Reproduktionstrakt zu übertragen, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich. Die HMGCR stellt ein transkriptionell sowie post-translationell reguliertes Enzym dar, dessen Steuerung unter anderem durch CREB, sowie den zellulären LDL- bzw. Cholesteringehalt erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass eine Adaptation des IIRS und erhöhte LDL-Serum-Konzentrationen zu einer vermehrten Expression der HMGCR führen, wodurch der erhöhte Cholesterinbedarf von Mutter und Embryo gedeckt wird.

Cholesterin wird sowohl für den Aufbau und Erhalt von Biomembranen, als auch zur Steroidhormonsynthese benötigt. Zu den Steroidhormonen gehören Progesteron und Östrogen,

die für die Aufrechterhaltung vor allem der Frühschwangerschaft essentiell sind. Mit höherem Alter der Mutter fallen die Östrogenspiegel ab, FSH-Spiegel steigen und die Östrogensynthese verlagert sich vom Ovar in periphere Gewebe wie dem Fettgewebe (MacNaughton et al. 1992). In ovariectomierten Mäusen, einem Modell für die postmenopausale Frau, wurde gezeigt, dass ein FSH-Anstieg über die Phosphorylierung von CREB zu einem Anstieg der Transformation von Cholesterin in Östrogen im Fettgewebe führt. Gleichzeitig sind Gene des Fettsäure- und Lipidmetabolismus hochreguliert und die Fettakkumulation wird gefördert (Cui et al. 2018). Vergleichbare Zusammenhänge zeigen sich bereits im Endometrium reproduktionsalter Kaninchen. So liegt die Vermutung nahe, dass in alten Kaninchen die Granulosazellen des Ovars weniger Östrogen produzieren und das Endometrium nun lokal Cholesterin speichert, um es der Steroidhormonsynthese bereit zu stellen. Während der Implantation wird der Synzytiotrophoblast zum Hauptsyntheseort des Östrogens (Simpson et al. 1994). In humanen Trophoblast- und Plazentazellen steigt abhängig vom LDL-Gehalt auch die Progesteronsekretion (Winkel et al. 1981; Rabe et al. 1983). In weiterführenden Untersuchungen sollten die Serumkonzentrationen von Östrogen, Progesteron und FSH bestimmt und die Transkription bzw. Proteinmenge der Aromatase im Ovar und Endometrium quantifiziert werden.

2.4 Das reproduktive Alter der Mutter wirkt sich differentiell auf das antioxidative und glykative, zelluläre Stresssystem des Reproduktionstrakts aus

Altern ist neben metabolischen Veränderungen, auch mit der Bildung und Akkumulation Stressmetaboliten assoziiert (Barzilai et al. 2012; Simm und Klotz 2015). Veränderungen des Lipidmetabolismus mit vermehrt vorliegenden freien Fettsäuren können außerdem über Lipidperoxidation zum Anfall von ROS führen (Igosheva et al. 2010). Intrazellulärer Stress kann Schäden an Proteinen und DNA verursachen und somit zu einem erhöhten Embryonenverlust und Infertilität beitragen (Miquel et al. 1980; Thornalley et al. 2003; Thornalley et al. 2010; Jinno et al. 2011). Hierbei können unter anderem oxidativer und glykativer Stress unterschieden werden. Die Ergebnisse beider Publikationen sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

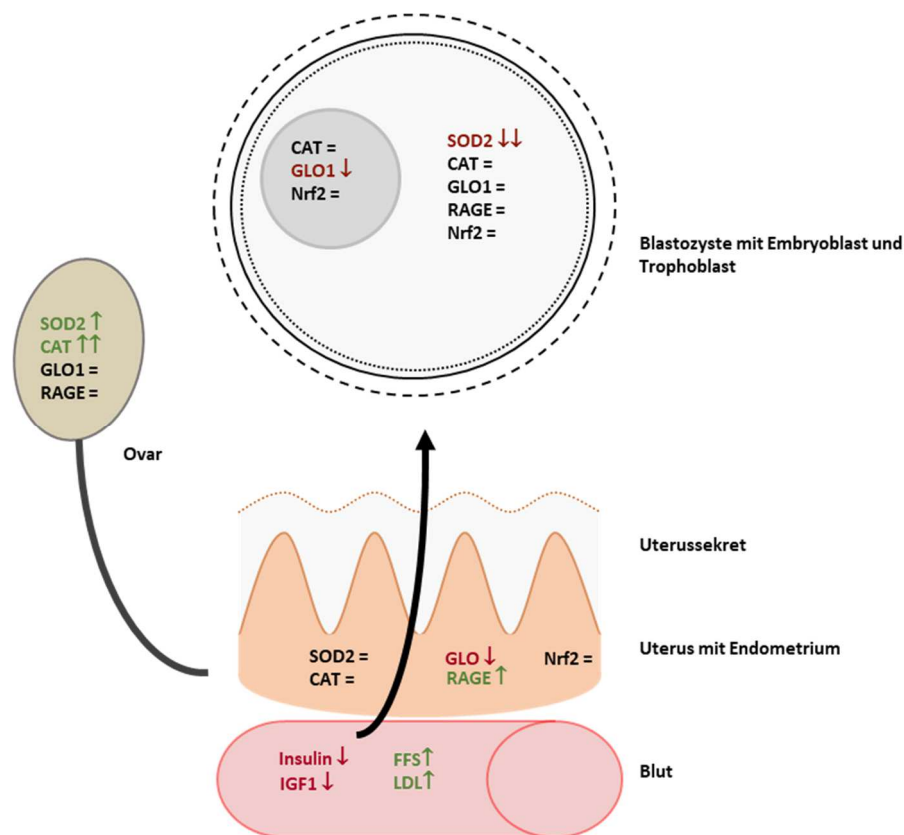


Abbildung 8: **Schematische Darstellung der Expression von Zielgenen des Stresssystems** in Blastozysten und in den Reproduktionsorganen reproduktionsalter Häsinnen an Tag 6 p.c.

Es werden die relativen Transkriptions- oder Proteinmengen der Liganden und Rezeptoren des antioxidativen und des Glyoxalase-Systems in EBs, TBs, Endometrium und Ovar, sowie die Quantität von Insulin, IGF1, freien Fettsäuren (FFS) und LDL im Serum reproduktionsalter (>108 Wochen) in Bezug auf junge (<22 Wochen) Kaninchen an Tag 6 Schwangerschaft dargestellt. Die Pfeile zeigen die relative Veränderung mit dem Alter der Mutter an, wobei die Anzahl der Pfeile Ausdruck der der Signifikanz des Ergebnisses ist (↑ $p \leq 0,05$; ↑↑ $p \leq 0,01$; ↑↑↑ $p \leq 0,001$; = kein Unterschied).

Insulin-like-growth-factor 1 (IGF1), Glyoxalase 1 (GLO1), catalase (CAT), Superoxid Dismutase (SOD2), receptor for advanced glycation end products (RAGE), Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (NrF2), freie Fettsäuren (FFS), low density lipoprotein (LDL)

2.4.1 In Endometrium und Embryoblasten reproduktionsalter Häsinnen ist der Schutz gegen die Akkumulation von AGEs und Dicarbonylen reduziert

Die GLO1 ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Glyoxalase-System, welches die Zelle vor reaktive Dicarbonyl-Verbindungen, wie MG und der Akkumulation von AGEs schützt (Übersichtsartikel: Rabbani und Thornalley 2015). Erhöhte AGE-Serumlevel sind mit einer herabgesetzten Fertilität assoziiert und werden als ein prädiktiver oder sogar therapeutischer Marker in der Reproduktionsmedizin diskutiert (Tatone et al. 2006; Tatone et al. 2014).

Im Endometrium reproduktionsalter Kaninchen ist die Protein- und Transkriptmengen der GLO1 reduziert, was mit einer Akkumulation von AGEs einhergeht (Nivelle et al. 2020). Gleichzeitig liegt der Rezeptor für AGEs (RAGE) vermehrt vor (Trohl et al. 2023). Der Verlust von GLO1 führt sowohl in der Zellkultur, als auch in Tierversuchen zum Anstieg von MG und AGEs (Stratmann et al. 2017; Nigro et al. 2019). Auch im Ovar reproduktionsalter Mäuse ist eine reduzierte Aktivität, sowie Protein- und Genexpression von GLO1 mit einer steigenden MG-AGE-Menge assoziiert (Tatone et al. 2010). Der Anstieg der AGEs korreliert mit der Hochregulation des RAGE, welcher über Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden zu anhaltenden zellulären Dysfunktionen und Gewebeerstörung führt und an chronischen Entzündungsprozessen beteiligt ist (Bierhaus et al. 2005). Zu diesen Signalkaskaden gehören unter anderem auch Akt und ERK1/2, welche durch Phosphorylierung des IGF1R stimuliert werden (Yang et al. 2013). Neben Entzündungsprozessen wird die Aktivierung von RAGE auch mit einer verminderten GLO1-Transkription in Verbindung gebracht, was wiederum zu erhöhten Konzentrationen an MG und AGEs führt (Bierhaus et al. 2005; Bierhaus und Nawroth 2009). Es wird außerdem davon ausgegangen, dass die Interaktion von AGEs mit RAGE den Alterungsprozess über die Aufrechterhaltung der Entzündung vorantreibt (Fleming et al. 2011). Bezogen auf die Untersuchungen reproduktionsalter Häsinnen lässt sich ableiten, dass im Endometrium alter Kaninchen der Schutz gegen AGEs und Dicarbonyle aufgrund der verminderten GLO1 eingeschränkt ist und mehr AGEs und reaktive Diacarbonyle vorliegen. Diese könnten an den RAGE binden und dysfunktionelle, entzündliche Veränderungen in endometrialen Zellen hervorrufen und dadurch die Fertilität beeinträchtigen.

Auch bei Embryonen alter Häsinnen sind die Transkriptionsmengen der GLO1 reduziert (Trohl et al. 2023). Angaben zu RAGE konnten aufgrund der zu geringen Proteinmengen nicht erhoben werden. Erhöhte Mengen von AGEs in Blastozysten alter Kaninchen liegen daher nahe und müssen Bestandteil weiterführenden Untersuchungen sein. In Blastozysten diabetischer Kaninchen, die aufgrund der Hyperglykämie und Dyslipidämie der Mutter vermehrt MGs und AGEs ausgesetzt sind, konnte bereits in EBs eine geringere Protein- und Genmengen der GLO1

nachgewiesen werden (Haucke et al. 2014; Seeling et al. 2019). Mausoozyten, die in vitro oder in vivo mit MG behandelt wurden, zeigen Störungen der Oozytenreifung, werden vermehrt nach der Implantation resorbiert und sind frühembryonal wachstumsretardiert (Chang und Chan 2010). In TBs alter Kaninchen sind weder die GLO1, noch der RAGE verändert. Weiterer Analysen sind erforderlich, um die Tragweite der Einschränkung der GLO1 vor allem in EBs zu analysieren.

GLO1 wird durch den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2* (Nrf2) reguliert abhängig vom intrazellulären Stress (Xue et al. 2012). Nrf2 ist auch in der Lage antioxidativen Enzyme, wie CAT und SOD2, zu regulieren und ist somit ein Bindeglied zwischen oxidativen und glykativen Stress (Xue et al. 2012; Übersichtsartikel: Schmidlin et al. 2019). Dies bedingt auch, dass Nrf2 eng mit Prozessen des Alterns als „Masterregulator“ der zellulären Stress-Homöostase assoziiert ist. Die zelluläre Funktion von Nrf2 nimmt mit dem Alter ab (Übersichtsartikel: Schmidlin et al. 2019). Es wird noch diskutiert, inwieweit die Basalmenge an Nrf2 zell-, gewebe-, speziesabhängig oder abhängig vom Altersstatus ist. Kumulierte Evidenz besteht jedoch in der Annahme, dass die Möglichkeit auf oxidativen Stress mit Aktivierung des Nrf2-Signalweges und Expression entsprechender (antioxidativer) Gene zu reagieren, mit dem Alter abnimmt (Zhang et al. 2015). Auf Proteinebene wurde keine Veränderung der Nrf2-Menge in Blastozysten und Reproduktionsorganen festgestellt (Trohl et al. 2023). In Bezug auf die GLO1-Expression in Endometrium und EBs lässt die unveränderte Nrf2-Konzentration den Schluss zu, dass weitere Regulationsmechanismen neben Nrf2 existieren könnten.

2.4.2 Die Enzyme des antioxidativen Systems in Reproduktionsorganen und Embryonen weisen kaum Veränderungen in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter auf

Zum antioxidativen System gehören die CAT und die SOD2, welche in zwei Reaktionen freie Sauerstoffradikale in Wasser umwandeln und somit die Zelle schützen (Fita und Rossmann 1985; Fridovich 1995). In humanen und bovinen Endometrien führt Stress verschiedener Genese, wie ROS oder Hitze, zu verminderten Enzymmengen und -aktivitäten und ist mit einem defizienten Schutz assoziiert (Oner-Iyidoğan et al. 2004; Prieto et al. 2012; Bai et al. 2020). Die verminderte SOD2-Transkription im TB ist als Reaktion auf vermehrt anfallende ROS zu werten (Trohl et al. 2023). Möglich wäre eine Suppression über pFOXO3a und Akt, wie sie in Gefäßmuskelzellen von Ratten gezeigt wurde (Li et al. 2006). In EBs und Endometrium hingegen sind keine Auswirkungen auf das antioxidative Stresssystem nachweisbar, welche zur unveränderten Regulation der Nrf2 zu passen scheinen (Trohl et al. 2023). Dies impliziert, dass entweder keine vermehrten ROS anfallen oder das antioxidative System in alten Kaninchen im Gleichgewicht steht.

Im Ovar alter Kaninchen wurden hingegen erhöhte SOD2- und CAT-Proteinmengen gemessen (Trohl et al. 2023). In fetalen Herzmuskelzellen aus Ratten konnte eine Nrf2-abhängige protektive Hochregulation antioxidativer Enzyme nachgewiesen werden. Die erhöhte Transkription von unter anderem CAT und SOD1 führte zu einer geringeren Bildung von ROS und dem verbesserten Überleben der fetalen Herzmuskelzellen (Dreger et al. 2009). Die Regulation von SOD2 und CAT im humanen Ovar ist aktuell nicht abschließend geklärt. In humanen Granulosazellen (GC) von Frauen über 38 Jahren sind SOD2 und CAT in geringeren Mengen exprimiert, was zu einer Akkumulation defekter Mitochondrien und oxidativen Schäden führt (Tatone et al. 2006). In der Follikelflüssigkeit älterer Frauen ist die CAT-Aktivität reduziert, die SOD2-Aktivität jedoch erhöht, während die Proteinmengen beider Enzyme unverändert bleiben (Carbone et al. 2003; Debbarh et al. 2021). Debbarh *et al.* hingegen stellten in der Follikelflüssigkeit von Frauen über 37 Jahren eine geringere SOD2-Aktivität fest (Debbarh et al. 2021). Die erhöhte Proteinmenge von SOD2 und CAT im Ovar alter Kaninchen entspricht nicht den publizierten Ergebnissen des humanen Ovars. Es kann vermutet werden, dass eine Hochregulation der CAT und SOD2 im Ovar eine suffiziente Reaktion zur Elimination vermehrt vorliegender ROS darstellt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass als Analysematerial das gesamte Ovar und nicht nur ein einzelner Zelltyp bzw. die Follikelhöhlenflüssigkeit verwendet wurde. Deshalb sollte eine zelllinien-spezifische Untersuchung in weiteren Analysen durchgeführt werden.

In Endometrium und Blastozysten reproduktionsalten Kaninchen sind weder Nrf2 noch antioxidative Enzyme verändert, was auf geringe Auswirkungen auf das antioxidative System hindeuten kann, obwohl Veränderungen des Lipidmetabolismus und ein Embryonenverlust nachweisbar sind. Eine Gegenregulation der CAT und SOD2 als Schutz gegen vermehrt vorliegende ROS ist lediglich im Ovar zu beobachten.

2.5 In ApoE-defizienten Häsinnen ist die Fertilität aufgrund von metabolischen Veränderungen und der chronischen Dyslipidämie deutlich verringert

Das ApoE-Knockout-Modell ist ein bekanntes Krankheitsmodell für Hyperlipidämie und Atherosklerose, sowie einen veränderten Insulinstoffwechsel (Piedrahita et al. 1992; Zhang et al. 1992; Ji et al. 2015; Koren-Itton et al. 2020). Als Bestandteil von Chylomikronen, VLDL und HDL transportiert ApoE Lipide und stellt Cholesterol für die (ovarielle) Steroidgenese bereit (Mahley und Rall 2000; Zofková et al. 2002). Beim Menschen sind Polymorphismen des ApoE-Gens, wie das ApoE2-Allel, mit geringerer Fertilität assoziiert (Corbo et al. 2004; Jasienska et al. 2015). Ziel der Untersuchungen war es, ein Krankheitsmodell für das metabolische Altern in der frühen Schwangerschaft zu etablieren (Buske et al. in preparation). Deshalb wurden ApoE-defiziente

Häsinnen auf ihre Reproduktionsfähigkeit und metabolischen Parameter untersucht. Im Rahmen der ersten orientierenden Beobachtungen wurden systemische Veränderungen in Serum und Leber analysiert, sowie lokale Adaptationen im Reproduktionstrakt von ApoE-Knockout-Kaninchen im Vergleich zu jungen und alten Kaninchen untersucht. Es wurden ausgewählte Marker des IIRS, des Lipidmetabolismus und des Stresssystems analysiert, um einschätzen zu können, ob das ApoE-Knockout-Kaninchen ähnliche Veränderungen aufweist, wie auch das reproduktionsalte Kaninchen. Die Ergebnisse werden schematisch in Abbildung 9 zusammengefasst und dem reproduktionsalten Kaninchen gegenübergestellt.

In den ApoE-Knockout-Tieren waren im Vergleich zu jungen Kaninchen am sechsten Tag der Schwangerschaft die Anzahl der Blastozysten und auch die Anzahl der Ovulationspunkte deutlich reduziert (Buske et al. in preparation), was ein Anzeichen für eine deutlich herabgesetzte Fertilität darstellt. Die verringerte Fertilität korreliert mit deutlichen Veränderungen des Stoffwechsels und der Stressantwort in ApoE-Knockout-Kaninchen.

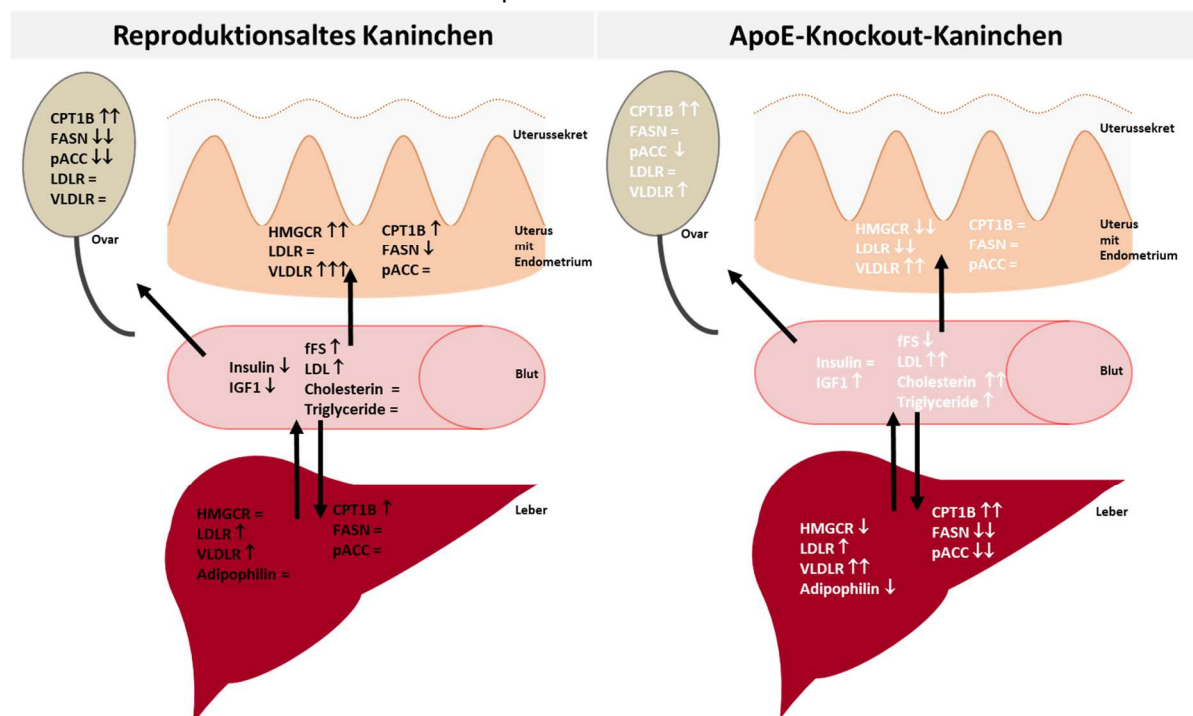


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zielgene des Lipidstoffwechselveränderungen in Reproduktionsorganen reproduktionsalter und ApoE-Knockout-Kaninchen an Tag 6 p.c. in Abhängigkeit von Veränderungen in Serum und Leber der Tiere

Es werden die Transkriptionen oder Proteinmengen von Liganden und Rezeptoren des Lipidmetabolismus Endometrium, Ovar und Leber, sowie die Quantität von Insulin, IGF1, freien Fettsäuren (fFS), LDL, Cholesterin und Triglyceriden im Serum von reproduktionsalten (>108 Wochen) und ApoE-Knockout-Kaninchen in Bezug auf jungen Kaninchen (<22 Wochen) an Tag 6 der Schwangerschaft dargestellt. Die Pfeile zeigen die relative Veränderung, wobei die Anzahl der Pfeile Ausdruck der Signifikanz des Ergebnisses ist (↑ p≤0,05; ↑↑ p≤0,01; ↑↑↑ p≤0,001; = kein Unterschied).

Insulin-like-growth-factor 1 (IGF1), Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT1B), fatty acid synthase (FASN), phospho-acetyl-CoA carboxylase (pACC), Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4), Fettsäurebindungsprotein 4 (FABP4), cluster of differentiation 36 (CD36), low density lipoproteinen receptor (LDLR), very low density lipoproteinen receptor (VLDLR), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR), Apolipoprotein E (ApoE), freie Fettsäuren (fFS), low density lipoprotein (LDL)

2.5.1 Eine ApoE-Defizienz hat deutlichere systemische Veränderungen des Metabolismus und des Stresssystems zur Folge als das fortgeschrittene maternale Alter

ApoE-Knockout-Kaninchen entwickeln eine chronische Dyslipidämie (Ji et al. 2015; Niimi et al. 2016). Auch an graviden ApoE-defizienten Häsinnen an Tag 6 der Schwangerschaft waren eine Erhöhung der Triglyceride, Gesamtcholesterin und LDL und eine Reduktion freier Fettsäuren im Serum nachweisbar. Gleichzeitig waren die Serum-Werte für IGF1 erhöht und für Insulin unverändert (Buske et al. in preparation). Die endokrine Regulation in ApoE-defizienten Kaninchen unterscheidet sich von den Beobachtungen in alten Kaninchen. Metabolische Veränderungen gibt es ähnliche, was vergleichbare Adaptationsmechanismen vermuten lässt. In der Leber von ApoE-Knockout-Kaninchen scheint der Lipidmetabolismus deutlicher verändert als bei alten Häsinnen (Buske et al. in preparation).

Die Enzyme des Stresssystems, sowohl des antioxidativen (SOD2 und CAT) als auch des antiglykativen (GLO1) sind in der Leber von ApoE-Knockout-Kaninchen vermehrt exprimiert (Buske et al. in preparation). In der Leber dyslipidämischer ApoE-Knockout-Mäuse ist oxidativer Stress in Form von oxidiertem DNA, vermehrter Lipidperoxidität und ROS-Produktion nachweisbar (Hayek et al. 1994; Shea et al. 2002; Folkmann et al. 2007). Die Hochregulation der antioxidativen und antiglykativen Enzyme in der Leber von ApoE-defizienten Häsinnen könnte eine Gegenregulation des Stresssystems sein, um die Zellen vor schädlichen ROS und MGs zu schützen. Eine solche Gegenregulation wurde bei reproduktionsalten Häsinnen nicht festgestellt, was mit den geringer ausgeprägten Veränderungen des Lipidmetabolismus in Zusammenhang stehen könnte.

2.5.2 ApoE ist ein lokaler Faktor für den Cholesterinmetabolismus im Endometrium

In der aktuellen Literatur finden sich insgesamt wenige Arbeiten zur Funktion des ApoEs im Endometrium. Aufgrund der Untersuchungen im Kaninchen kann vermutet werden, dass ApoE eine bestimmte Aufgabe während der Implantation zukommt. An humanen Endometriumstromazellen konnte gezeigt werden, dass während der Implantation die ApoE-Expression zunimmt (Kao et al. 2002; Mohtasebi et al. 2021). Ein Polymorphismus mit ApoE4/4 kann für Implantationsfehler ursächlich sein (Mohtasebi et al. 2021). Außerdem wurde von Kao et al. die Vermutung aufgestellt, dass ApoE für die Steroidhormonsynthese und -bindung im Endometrium eine wichtige Funktion erfüllt (Kao et al. 2002). Ein Mangel an ApoE würde entsprechend die Steroidhormonsynthese und die Implantation der Embryonen im Endometrium beeinträchtigen.

Obwohl die Serumlevel an Insulin und IGF1 anders als in den alten Kaninchen nicht vermindert sind, lässt sich im ApoE-Knockout-Kaninchen eine vermehrte Expression von parakrinem IGF1 und IGF2 im Endometrium nachweisen. Ein ApoE4-Polymorphismus ist mit Insulinresistenz assoziiert (Small et al. 2000; Reiman et al. 2001; Reiman et al. 2004; Koren-Itton et al. 2020). Inwieweit auch der ApoE-Knockout mit einer Insulinresistenz einhergeht, ist bisher nicht bekannt. Die Störung des IIRS könnte jedoch Ursache für eine kompensatorisch erhöhte IGF-Expression sowohl im Endometrium, als auch systemisch im Serum sein. Zum Erscheinungsdatum wurden in ApoE-Knockout-Kaninchen keine Untersuchungen zu weiterführenden Signalwegen durchgeführt.

Im Fettsäuremetabolismus des Endometriums weisen ApoE-defiziente Häsinnen keine signifikanten Veränderungen der zentralen Gene für β -Oxidation und Fettsäuresynthese auf. Allerdings sind die Serumspiegel freier Fettsäuren verringert, sodass weniger freie Fettsäuren zur Verstoffwechselung und somit möglichen Energiegewinnung zu Verfügung stehen. Der Cholesterinmetabolismus zeigt hingegen klare Auswirkungen des ApoE-Knockouts. Die Cholesterinaufnahme und -synthese sind über LDLR und HMGCR herabgesetzt, während die VLDLR hochreguliert ist. Dies kann mit dem stark erhöhten Plasmacholesterin und Cholesterolgehalt in VLDL und LDL korreliert werden (Zhang et al. 1992; Zhang et al. 2014). Im Endometrium von ApoE-Knockout-Kaninchen scheint im Gegensatz zum alten Kaninchen der Cholesterinmetabolismus stärker beeinträchtigt zu sein. Diese Störungen könnten zu Veränderungen der Steroidsynthese und -bindung führen und Grund für den Embryonenverlust der ApoE-Knockout-Kaninchen darstellen (Kao et al. 2002).

2.5.3 Ovarielle Veränderungen im Lipidmetabolismus und der Stressantwort in ApoE-Knockout-Kaninchen

Ovarien gelten als ApoE-reiche Gewebe (Driscoll et al. 1985; Polacek et al. 1992). ApoE dient dem Transport von Cholesterol zur Bereitstellung für die Steroidsynthese (Driscoll und Getz 1984; Polacek et al. 1992). In ApoE-Knockout-Mäusen nimmt die Östrogen- und Progesteronkonzentrationen ab. Die Fertilitätsraten in diesen Tieren blieben jedoch unbeeinträchtigt (Zhang et al. 2014). In ApoE-Knockout-Kaninchen sind hingegen eine verminderte Anzahl an Blastozysten an Tag 6 der Schwangerschaft nachweisbar. Die Anzahl der Ovulationspunkte war nicht verändert, weshalb wie in reproduktionsalten Kaninchen von einem erhöhten Embryonenverlust bis Tag 6 der Schwangerschaft auszugehen ist (Buske et al. in preparation; Trohl et al. 2023).

Im Ovar der ApoE-Knockout-Kaninchen wurden vergleichbare Veränderungen wie in alten Kaninchen nachgewiesen. Im IIRS wurde zusätzlich zum erniedrigten IGF2R des alten Kaninchens

eine Hochregulation des InsR gemessen, was als endokrine/parakrine Adaption gewertet werden könnte. Der Fettsäuremetabolismus scheint Richtung β -Oxidation verschoben. Auch hier liegt der VLDLR erhöht vor, was auf eine vermehrte Cholesterinaufnahme im Ovar hinweist. Zhang et al. konnten zeigen, dass nicht nur ApoE-Knockout-Ratten selbst, sondern auch die Ovarien vergrößert sind und sich um die Oozyten Lipide ablagern. Dies könnte mit dem veränderten Cholesteringehalt in VLDL und LDL zusammenhängen (Zhang et al. 2014). Bekannt ist außerdem, dass ApoE in den Thekazellen die Androgensynthese reguliert (Zerbinatti et al. 2001). Daher ist zu vermuten, dass auch hier eine Beeinträchtigung der Steroidhormonsynthese besteht. Veränderungen in Enzymen der Stressantwort weisen auf vermehrt vorliegenden antioxidativen und dicarbonylen Stress hin. Dass in ApoE-Knockout-Mäusen vermehrt ROS gebildet werden, konnte bereits bewiesen werden (Liu et al. 2023). In den Gehirnen von ApoE-defizienten Mäusen konnte eine Gegenregulation des antioxidativen Systems nachgewiesen werden, die in ihrer Ausprägung der Hochregulation der SOD2 im Ovar dieser Kaninchen entspricht. (Shea et al. 2002). Ein Ungleichgewicht des oxidativen Systems im Ovar ist assoziiert mit Apoptose, Meiosearrest und der Beschleunigung der ovariellen Alterung (Yan et al. 2022). Die Gegenregulation des antioxidativen Systems lässt sich sowohl bei ApoE-defizienten als auch bei alten Kaninchen nachweisen. In ApoE-defizienten Tieren ist zusätzlich die Expression von GLO1 vermindert, was darauf hinweist, dass hier eine vermehrte Konzentration von AGEs vorliegt. Diese können aufgrund vermehrt vorliegenden oxidativen Stresses entstehen und in Verbindung mit der eingeschränkten Detoxifikation durch GLO1 zur Schädigung des Proteoms und wiederum zum Voranschreiten der ovariellen Alterung führen (Pertynska-Marczewska und Diamanti-Kandarakis 2017).

In ApoE-defizienten Häsinnen ist die Fertilität signifikant reduziert, was mit den Veränderungen des Stoffwechsels und der chronischen Dyslipidämie in Verbindung gebracht wird. In der wissenschaftlichen Literatur wird das ApoE-Knockout-Modell vorrangig als Modell zur Untersuchung von Hyperlipidämie herangezogen. Aufgrund der geringen klinischen Ausprägung der Hyperlipidämie bei reproduktionsaktiven Kaninchen besteht die Vermutung, dass das ApoE weitere Funktionen im lokalen Netzwerk der maternalen-embryonalen Kommunikation erfüllt. Um die embryo-maternale Interaktion weiter zu charakterisieren, ist es unerlässlich, in künftigen Studien die embryonale Antwort zu analysieren.

2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend ist herauszustellen, dass der Embryonenverlust in alten Kaninchen und ApoE-Knockout-Kaninchen in einer unzureichenden Adaptation an eine veränderte mütterliche Stoffwechsellaage begründet sein kann. Jedoch scheinen in alten und ApoE-Knockout-Kaninchen zentrale Signalwege unterschiedlich reguliert zu sein.

IGF1 und seine Rezeptoren könnten infolge des systemischen Insulin- und IGF1-Mangels reproduktionsalter Tiere im Endometrium kompensatorisch erhöht sein, um ein suffizientes Mikromilieu aufzubauen und eine erfolgreiche Schwangerschaft zu ermöglichen. Die untersuchten Blastozysten alter Kaninchen weisen ein adaptiertes IIRS auf. Zudem ist herauszustellen, dass sich der maternale und embryonale Lipidmetabolismus in reproduktionsalten Kaninchen verändert. Es kommt zu einem vermehrten Fettsäureabbau, bei gleichzeitig erhöhter Cholesterinaufnahme und -synthese. Zudem können erstmals erste Anzeichen für eine Anpassung des Stresssystems in den Reproduktionsorganen und Embryonen von reproduktionsalten Kaninchen beschrieben werden, die auf einen eingeschränkten Schutz gegen Dicarbonyl- und ein vermehrtes Vorliegen von AGEs hinweisen. Gleichzeitig scheint das Alter der Mutter weniger Auswirkungen auf das antioxidative System in Reproduktionsorganen und Embryonen zu haben, als aufgrund des Embryonenverlustes anzunehmen wäre. Es ist davon auszugehen, dass durch die beschriebenen Veränderungen Mutter und Embryo in der Lage sind, für die adaptierten Embryonen eine optimierte Versorgung aufrechtzuerhalten und genügend Energie bereitzustellen.

In ApoE-Knockout-Kaninchen ist eine Hyperlipidämie nachweisbar, die insgesamt ähnliche Signalwege beeinflusst. Jedoch scheint die Regulation dieser zentralen Signalwege unterschiedlich zu sein. In ApoE-Knockout-Kaninchen ist ein relativer Insulin- und IGF-Mangel zu beobachten, der mit einem veränderten Cholesterinmetabolismus in den Reproduktionsorganen einhergeht. Im Gegensatz zu alten Tieren scheint der Fettsäuremetabolismus basierend auf den bisher erhobenen Ergebnissen nicht verändert zu sein. Im ApoE-Knockout-Modell zeigten sich tendenziell ähnliche Veränderungen in den Reproduktionsorganen, jedoch waren zusätzlich Adaptationen der oxidativen und glykativen Stressantwort in der Leber nachweisbar.

An dieser Stelle sei noch einmal darauf verwiesen, dass bei ApoE-Knockout-Kaninchen sowohl die genetisch-bedingten dyslipidämischen Stoffwechseleränderungen der Mutter, als auch eine fehlende spezifische Funktion von ApoE in der embryo-maternalen Interaktion als potentielle Ursachen für die Subfertilität in Betracht kommen. Bei Wildtyp-Kaninchen konnte

keine Dyslipidämie mit zunehmendem Reproduktionsalter beobachtet werden, was die Klärung der Kausalität und die Vergleichbarkeit der Beobachtungen zur Subfertilität in beiden Tiermodellen einschränkt. Es ergeben sich nur für einige untersuchte Stoffwechsel- und Stresssystemfaktoren ähnliche Tendenzen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um genauere Aussagen über die Vergleichbarkeit zu treffen.

Ausblick

In den ersten Tagen eines jeden Embryos werden Grundlagen für dessen Entwicklung und potentielle spätere Erkrankungen gelegt. Veränderungen des intrauterinen Milieus können nicht nur weitreichende Folgen für den embryonalen Metabolismus, sondern auch für die spätere Entwicklung und Gesundheit des Kindes haben. Fleming *et al.* sprechen in diesem Zusammenhang von der fetalen Programmierung (Fleming et al. 2015). So ist es wahrscheinlich, dass altersbedingte Veränderungen der Mutter den Embryo (epigenetisch) beeinflussen. Für Kinder älterer Frauen konnte eine Prädisposition für bestimmte Erkrankungen darunter Hypertension, kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas und Diabetes mellitus gezeigt werden. Auch ist die Lebenserwartung selbst und die Reproduktionskapazität des Nachwuchses herabgesetzt (Velazquez et al. 2016).

Gegenwärtig wird in der Gesellschaft die Rolle der Frau und Mutter in der Arbeitswelt diskutiert. Ein Beispiel hierfür sind Angebote größerer Firmen für Social Freezing. Doch die Ergebnisse unserer und vorheriger Studien können klare negative Auswirkungen des fortgeschrittenen mütterlichen Alters sowohl auf den Reproduktionstrakt, als auch auf den Embryo in der Schwangerschaft und somit auf das heranwachsende Kind im Laufe seines Lebens aufzeigen. Dies hat zwangsläufig Auswirkungen auf die Gesellschaft und sollte nicht vernachlässigt werden. Dieses Wissen zieht unsere Gesellschaft in weitreichende Verantwortung und die Wissenschaft vor große klinische Herausforderungen. Zudem gilt es ein individuelles Bewusstsein für die schwerwiegenden und nachhaltigen Folgen in der Gesellschaft zu fördern.

3 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. D.; Garrison, R. J.; Wilson, P. W.; Epstein, F. H.; Castelli, W. P.; Feinleib, M.; LaRue, C. (1983): Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. In: *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 3 (3), S. 260–272. DOI: 10.1161/01.ATV.3.3.260.
- Abe, Hiroyuki; Yamashita, Shoko; Itoh, Takehiro; Satoh, Takeshi; Hoshi, Hiroyoshi (1999): Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. In: *Mol. Reprod. Dev.* 53 (3), S. 325–335. DOI: 10.1002/(sici)1098-2795(199907)53:3%3C325::aid-mrd8%3E3.0.co;2-t.
- Abe, Hiroyuki; Yamashita, Shoko; Satoh, Takeshi; Hoshi, Hiroyoshi (2002): Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. In: *Mol. Reprod. Dev.* 61 (1), S. 57–66. DOI: 10.1002/mrd.1131.
- AGROGIANNIS, GEORGIOS D.; SIFAKIS, STAVROS; PATSOURIS, EFSTRATIOS S.; KONSTANTINIDOU, ANASTASIA E. (2014): Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). In: *Molecular Medicine Reports* 10 (2), S. 579–584. DOI: 10.3892/mmr.2014.2258.
- Altarejos, Judith Y.; Montminy, Marc (2011): CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (3), S. 141–151. DOI: 10.1038/nrm3072.
- Andrade Melo-Sterza, Fabiana de; Poehland, Ralf (2021): Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions. In: *International journal of molecular sciences* 22 (7). DOI: 10.3390/ijms22073421.
- Ang, Lisa S.; Cruz, Rani P.; Hendel, Alon; Granville, David J. (2008): Apolipoprotein E, an important player in longevity and age-related diseases. In: *Experimental gerontology* 43 (7), S. 615–622. DOI: 10.1016/j.exger.2008.03.010.
- Aquilano, Katia; Vigilanza, Paola; Baldelli, Sara; Pagliei, Beatrice; Rotilio, Giuseppe; Ciriolo, Maria Rosa (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (28), S. 21590–21599. DOI: 10.1074/jbc.M109.070169.
- Aroor, Annayya R.; Jackson, Daniel E.; Shukla, Shivendra D. (2012): Dysregulated phosphorylation and nuclear translocation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) in rat liver after chronic ethanol binge. In: *European journal of pharmacology* 679 (1-3), S. 101–108. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.12.045.
- Bai, Hanako; Ukita, Haruka; Kawahara, Manabu; Mitani, Tomohiro; Furukawa, Eri; Yanagawa, Yojiro et al. (2020): Effect of summer heat stress on gene expression in bovine uterine endometrial tissues. In: *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 91 (1), e13474. DOI: 10.1111/asj.13474.
- Baker, J.; Liu, J. P.; Robertson, E. J.; Efstratiadis, A. (1993): Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. In: *Cell* 75 (1), S. 73–82.

- Barbehenn, E. K.; Wales, R. G.; Lowry, O. H. (1974): The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4), S. 1056–1060. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1056.
- Barbehenn, E. K.; Wales, R. G.; Lowry, O. H. (1978): Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 43, S. 29–46.
- Barzilai, Nir; Huffman, Derek M.; Muzumdar, Radhika H.; Bartke, Andrzej (2012): The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. In: *Diabetes* 61 (6), S. 1315–1322. DOI: 10.2337/db11-1300.
- Baudry, A.; Lamothe, B.; Bucchini, D.; Jami, J.; Montarras, D.; Pinset, C.; Joshi, R. L. (2001): IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. In: *FEBS letters* 488 (3), S. 174–178. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02435-2.
- Bauersachs, Stefan; Almiñana, Carmen (2020): Embryo–Maternal Interactions Underlying Reproduction in Mammals. In: *International journal of molecular sciences* 21 (14). DOI: 10.3390/ijms21144872.
- Baumgarten, Sarah C.; Armouti, Marah; Ko, CheMyong; Stocco, Carlos (2017): IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice. In: *Endocrinology* 158 (7), S. 2309–2318. DOI: 10.1210/en.2017-00146.
- Baumgarten, Sarah C.; Convissar, Scott M.; Zamah, A. Musa; Fierro, Michelle A.; Winston, Nicola J.; Scoccia, Bert; Stocco, Carlos (2015): FSH Regulates IGF-2 Expression in Human Granulosa Cells in an AKT-Dependent Manner. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (8), E1046-55. DOI: 10.1210/jc.2015-1504.
- Bentov, Yaakov; Yavorska, Tetyana; Esfandiari, Navid; Jurisicova, Andrea; Casper, Robert F. (2011): The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. In: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28 (9), S. 773–783. DOI: 10.1007/s10815-011-9588-7.
- Bergh, T.; Ericson, A.; Hillensjö, T.; Nygren, K-G; Wennerholm, U-B (1999): Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982–95: a retrospective cohort study. In: *The Lancet* 354 (9190), S. 1579–1585. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)04345-7.
- Bierhaus, A.; Nawroth, P. P. (2009): Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. In: *Diabetologia* 52 (11), S. 2251–2263. DOI: 10.1007/s00125-009-1458-9.
- Bierhaus, Angelika; Humpert, Per M.; Morcos, Michael; Wendt, Thoralf; Chavakis, Triantafyllos; Arnold, Bernd et al. (2005): Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83 (11), S. 876–886. DOI: 10.1007/s00109-005-0688-7.
- Bilby, T. R.; Guzeloglu, A.; Kamimura, S.; Pancarci, S. M.; Michel, F.; Head, H. H.; Thatcher, W. W. (2004): Pregnancy and Bovine Somatotropin in Nonlactating Dairy Cows: I. Ovarian, Conceptus, and Insulin-Like Growth Factor System Responses. In: *Journal of Dairy Science* 87 (10), S. 3256–3267. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(04)73462-1.
- Bilby, T. R.; Sozzi, A.; Lopez, M. M.; Silvestre, F. T.; Ealy, A. D.; Staples, C. R.; Thatcher, W. W. (2006): Pregnancy, Bovine Somatotropin, and Dietary n-3 Fatty Acids in Lactating Dairy Cows: I.

- Ovarian, Conceptus, and Growth Hormone–Insulin-Like Growth Factor System Responses. In: *Journal of Dairy Science* 89 (9), S. 3360–3374. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72373-6.
- Bleckmann, Susanne C.; Blendy, Julie A.; Rudolph, Dorothea; Monaghan, A. Paula; Schmid, Wolfgang; Schütz, Günther (2002): Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. In: *Molecular and cellular biology* 22 (6), S. 1919–1925. DOI: 10.1128/mcb.22.6.1919-1925.2002.
- Block, Jeremy; Wrenzycki, Christine; Niemann, Heiner; Herrmann, Doris; Hansen, Peter J. (2008): Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. In: *Mol. Reprod. Dev.* 75 (5), S. 895–903. DOI: 10.1002/mrd.20826.
- Bonomini, Francesca; Filippini, Francesca; Hayek, Tony; Aviram, Michael; Keidar, Shlomo; Rodella, Luigi F. et al. (2010): Apolipoprotein E and its role in aging and survival. In: *Experimental gerontology* 45 (2), S. 149–157. DOI: 10.1016/j.exger.2009.11.006.
- Bouzaglou, Ana; Aubenas, Ines; Abbou, Hind; Rouanet, Stephanie; Carbonnel, Marie; Pirtea, Paul; Ayoubi, Jean Marc Bernard (2020): Pregnancy at 40 years Old and Above: Obstetrical, Fetal, and Neonatal Outcomes. Is Age an Independent Risk Factor for Those Complications? In: *Frontiers in medicine* 7, S. 208. DOI: 10.3389/fmed.2020.00208.
- Bradley, Josephine; Swann, Karl (2019): Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. In: *The International journal of developmental biology* 63 (3-4-5), S. 93–103. DOI: 10.1387/ijdb.180355ks.
- Buske, M.; Schindler, M.; Trohl, J.; Nivelte, J. de; Ritsch, A.; Navarrete Santos, A. (in preparation): ApoE deficiency effects maternal metabolism and female fertility in early pregnancy: lessons from the ApoE knock out rabbit.
- Byrne, A. T.; Southgate, J.; Brison, D. R.; Leese, H. J. (2002): Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. In: *Mol. Reprod. Dev.* 62 (4), S. 489–495. DOI: 10.1002/mrd.10153.
- Calder, Michele D.; Edwards, Nicole A.; Betts, Dean H.; Watson, Andrew J. (2017): Treatment with AICAR inhibits blastocyst development, trophoctoderm differentiation and tight junction formation and function in mice. In: *Molecular human reproduction* 23 (11), S. 771–785. DOI: 10.1093/molehr/gax050.
- Capalbo, Antonio; Hoffmann, Eva R.; Cimadomo, Danilo; Ubaldi, Filippo Maria; Rienzi, Laura (2017): Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. In: *Human reproduction update* 23 (6), S. 706–722. DOI: 10.1093/humupd/dmx026.
- Carbone, M. C.; Tatone, C.; Delle Monache, S.; Marci, R.; Caserta, D.; Colonna, R.; Amicarelli, F. (2003): Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. In: *Molecular human reproduction* 9 (11), S. 639–643. DOI: 10.1093/molehr/gag090.
- Cardwell, Chris R.; Stene, Lars C.; Joner, Geir; Bulsara, Max K.; Cinek, Ondrej; Rosenbauer, Joachim et al. (2010): Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: a pooled analysis of 30 observational studies. In: *Diabetes* 59 (2), S. 486–494. DOI: 10.2337/db09-1166.

- Chang, Ying-Jing; Chan, Wen-Hsiung (2010): Methylglyoxal has injurious effects on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development, via apoptosis. In: *Toxicology letters* 193 (3), S. 217–223. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.01.007.
- Chao, Wendy; D'Amore, Patricia A. (2008): IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. In: *Cytokine & growth factor reviews* 19 (2), S. 111–120. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.01.005.
- Chi, M. M.; Schlein, A. L.; Moley, K. H. (2000): High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. In: *Endocrinology* 141 (12), S. 4784–4792. DOI: 10.1210/endo.141.12.7816.
- Cimadomo, Danilo; Fabozzi, Gemma; Vaiarelli, Alberto; Ubaldi, Nicolò; Ubaldi, Filippo Maria; Rienzi, Laura (2018): Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. In: *Frontiers in endocrinology* 9, S. 327. DOI: 10.3389/fendo.2018.00327.
- Corbo, Rosa M.; Scacchi, Renato; Cresta, Massimo (2004): Differential reproductive efficiency associated with common apolipoprotein e alleles in postreproductive-aged subjects. In: *Fertility and sterility* 81 (1), S. 104–107. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.05.029.
- Cui, Huanxian; Zhao, Guiping; Wen, Jie; Tong, Weiming (2018): Follicle-stimulating hormone promotes the transformation of cholesterol to estrogen in mouse adipose tissue. In: *Biochemical and biophysical research communications* 495 (3), S. 2331–2337. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.120.
- Dean, Matthew (2019): Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy†. In: *Biology of reproduction* 101 (2), S. 297–305. DOI: 10.1093/biolre/iox102.
- Debbbarh, H.; Louanjli, N.; Aboulmaouahib, S.; Jamil, M.; Ahbbas, L.; Kaarouch, I. et al. (2021): Antioxidant activities and lipid peroxidation status in human follicular fluid: age-dependent change. In: *Zygote (Cambridge, England)* 29 (6), S. 490–494. DOI: 10.1017/s0967199421000241.
- DeChiara, T. M.; Efstratiadis, A.; Robertson, E. J. (1990): A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. In: *Nature* 345 (6270), S. 78–80. DOI: 10.1038/345078a0.
- DeChiara, Thomas M.; Robertson, Elizabeth J.; Efstratiadis, Argiris (1991): Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. In: *Cell* 64 (4), S. 849–859. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90513-x.
- Denker, H. W. (1977): Implantation. The Role of Proteinases, and Blockage of Implantation by Proteinase Inhibitors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology Ser, v.53/5).
- Denley, Adam; Cosgrove, Leah J.; Booker, Grant W.; Wallace, John C.; Forbes, Briony E. (2005): Molecular interactions of the IGF system. In: *Cytokine & growth factor reviews* 16 (4-5), S. 421–439. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.004.
- destatis (2022): Bei der Geburt ihres ersten Kindes sind Frauen in Deutschland durchschnittlich 30,2 Jahre alt. Hg. v. destatis. Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/Zahl-der-Woche/2022/PD22_18_p002.html, zuletzt aktualisiert am 03.05.2022, zuletzt geprüft am 15.05.2022.

- Dobbins, R. L.; Szczepaniak, L. S.; Bentley, B.; Esser, V.; Myhill, J.; McGarry, J. D. (2001): Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. In: *Diabetes* 50 (1), S. 123–130. DOI: 10.2337/diabetes.50.1.123.
- Doherty, A. S.; Temeles, G. L.; Schultz, R. M. (1994): Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. In: *Mol. Reprod. Dev.* 37 (1), S. 21–26. DOI: 10.1002/mrd.1080370104.
- Dreger, Henryk; Westphal, Kera; Weller, Andrea; Baumann, Gert; Stangl, Verena; Meiners, Silke; Stangl, Karl (2009): Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. In: *Cardiovascular research* 83 (2), S. 354–361. DOI: 10.1093/cvr/cvp107.
- Dri, Maria; Klinger, Francesca Gioia; Felici, Massimo de (2021): The ovarian reserve as target of insulin/IGF and ROS in metabolic disorder-dependent ovarian dysfunctions. In: *Reproduction & fertility* 2 (3), R103-R112. DOI: 10.1530/RAF-21-0038.
- Driscoll, D. M.; Getz, G. S. (1984): Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. In: *Journal of Lipid Research* 25 (12), S. 1368–1379. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)34454-0.
- Driscoll, D. M.; Schreiber, J. R.; Schmit, V. M.; Getz, G. S. (1985): Regulation of apolipoprotein E synthesis in rat ovarian granulosa cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 260 (15), S. 9031–9038. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)39453-X.
- Dumollard, Rémi; Duchen, Michael; Carroll, John (2007): The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. In: *The Mitochondrion in the Germline and Early Development*, Bd. 77: Elsevier (Current Topics in Developmental Biology), S. 21–49.
- Dunning, Kylie R.; Akison, Lisa K.; Russell, Darryl L.; Norman, Robert J.; Robker, Rebecca L. (2011): Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. In: *Biology of reproduction* 85 (3), S. 548–555. DOI: 10.1095/biolreprod.110.090415.
- Dunning, Kylie R.; Cashman, Kara; Russell, Darryl L.; Thompson, Jeremy G.; Norman, Robert J.; Robker, Rebecca L. (2010): Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. In: *Biology of reproduction* 83 (6), S. 909–918. DOI: 10.1095/biolreprod.110.084145.
- Eichenlaub-Ritter, Ursula (2012): Oocyte ageing and its cellular basis. In: *The International journal of developmental biology* 56 (10-12), S. 841–852. DOI: 10.1387/ijdb.120141ue.
- Eichner, June E.; Dunn, S. Terence; Perveen, Ghazala; Thompson, David M.; Stewart, Kenneth E.; Stroehla, Berit C. (2002): Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. In: *American journal of epidemiology* 155 (6), S. 487–495. DOI: 10.1093/aje/155.6.487.
- Ekstrand, Mats I.; Falkenberg, Maria; Rantanen, Anja; Park, Chan Bae; Gaspari, Martina; Hultenby, Kjell et al. (2004): Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. In: *Human molecular genetics* 13 (9), S. 935–944. DOI: 10.1093/hmg/ddh109.
- Ericsson, S.; Eriksson, M.; Vitols, S.; Einarsson, K.; Berglund, L.; Angelin, B. (1991): Influence of age on the metabolism of plasma low density lipoproteins in healthy males. In: *The Journal of clinical investigation* 87 (2), S. 591–596.

- Faddy, M. J.; Gosden, R. G.; Gougeon, A.; Richardson, S. J.; Nelson, J. F. (1992): Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 7 (10), S. 1342–1346. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137570.
- Fall, Caroline H. D.; Sachdev, Harshpal Singh; Osmond, Clive; Restrepo-Mendez, Maria Clara; Victora, Cesar; Martorell, Reynaldo et al. (2015): Association between maternal age at childbirth and child and adult outcomes in the offspring: a prospective study in five low-income and middle-income countries (COHORTS collaboration). In: *The Lancet Global Health* 3 (7), e366–e377. DOI: 10.1016/S2214-109X(15)00038-8.
- Fan, Jianglin; Kitajima, Shuji; Watanabe, Teruo; Xu, Jie; Zhang, Jifeng; Liu, Enqi; Chen, Y. Eugene (2014): Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. In: *Pharmacology & therapeutics* 0, S. 104–119. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.009.
- Ferguson, Elizabeth M.; Leese, Henry J. (2006): A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. In: *Mol. Reprod. Dev.* 73 (9), S. 1195–1201. DOI: 10.1002/mrd.20494.
- Fischer, Bernd; Chavatte-Palmer, Pascale; Viebahn, Christoph; Navarrete Santos, Anne; Duranthon, Veronique (2012): Rabbit as a reproductive model for human health. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 144 (1), S. 1–10. DOI: 10.1530/REP-12-0091.
- Fita, Ignacio; Rossmann, Michael G. (1985): The active center of catalase. In: *Journal of Molecular Biology* 185 (1), S. 21–37. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90180-9.
- Fleming, T. P.; Velazquez, M. A.; Eckert, J. J. (2015): Embryos, DOHaD and David Barker. In: *Journal of developmental origins of health and disease* 6 (5), S. 377–383. DOI: 10.1017/S2040174415001105.
- Fleming, Thomas H.; Humpert, Per M.; Nawroth, Peter P.; Bierhaus, Angelika (2011): Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review. In: *Gerontology* 57 (5), S. 435–443. DOI: 10.1159/000322087.
- Folkmann, Janne Kjaersgaard; Loft, Steffen; Møller, Peter (2007): Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE^{-/-} and wild-type mice. In: *Mutagenesis* 22 (2), S. 105–110. DOI: 10.1093/mutage/gel059.
- Fragouli, Elpida; Alfarawati, Samer; Spath, Katharina; Jaroudi, Souraya; Sarasa, Jonas; Enciso, Maria; Wells, Dagan (2013): The origin and impact of embryonic aneuploidy. In: *Human genetics* 132 (9), S. 1001–1013. DOI: 10.1007/s00439-013-1309-0.
- Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. In: *Annual review of biochemistry* 64, S. 97–112. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- García-Fernández, María; Delgado, Gloria; Puche, Juan Enrique; González-Barón, Salvador; Castilla Cortázar, Inma (2008): Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. In: *Endocrinology* 149 (5), S. 2433–2442. DOI: 10.1210/en.2007-1190.
- Gellersen, B.; Brosens, J. (2003): Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. In: *The Journal of endocrinology* 178 (3), S. 357–372. DOI: 10.1677/joe.0.1780357.

- Gleicher, Norbert; Darmon, Sarah K.; Albertini, David F.; Molinari, Emanuela; Patrizio, Pasquale; Barad, David H. (2020): DO INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR (IGF-1) LEVELS IN INFERTILITY PATIENTS AFFECT IVF OUTCOMES? In: *Fertility and sterility* 114 (3), e326-e327. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.08.885.
- Gleicher, Norbert; Darmon, Sarah K.; Molinari, Emanuela; Patrizio, Pasquale; Barad, David. H. (2022): Importance of IGF-I levels in IVF: potential relevance for growth hormone (GH) supplementation. In: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 39 (2), S. 409–416. DOI: 10.1007/s10815-021-02379-8.
- Graur, D.; Duret, L.; Gouy, M. (1996): Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). In: *Nature* 379 (6563), S. 333–335. DOI: 10.1038/379333a0.
- Griffiths, Richard M.; Pru, Cindy A.; Behura, Susanta K.; Cronrath, Andrea R.; McCallum, Melissa L.; Kelp, Nicole C. et al. (2020): AMPK IS REQUIRED FOR UTERINE RECEPTIVITY AND NORMAL RESPONSES TO STEROID HORMONES. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 159 (6), S. 707–717. DOI: 10.1530/REP-19-0402.
- Grøndahl, Marie Louise; Christiansen, Sofie Lindgren; Kesmodel, Ulrik Schiøler; Agerholm, Inge Errebo; Lemmen, Josephine Gabriela; Lundstrøm, Peter et al. (2017): Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence-A multicenter cohort study. In: *PloS one* 12 (4), e0172456. DOI: 10.1371/journal.pone.0172456.
- Gubbi, Sriram; Quipildor, Gabriela Farias; Barzilai, Nir; Huffman, Derek M.; Milman, Sofiya (2018): 40 YEARS OF IGF1: IGF1: the Jekyll and Hyde of the aging brain. In: *Journal of molecular endocrinology* 61 (1), T171-T185. DOI: 10.1530/JME-18-0093.
- Guerif, Fabrice; McKeegan, Paul; Leese, Henry J.; Sturmey, Roger G. (2013): A simple approach for CONsumption and RElease (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. In: *PloS one* 8 (8), e67834. DOI: 10.1371/journal.pone.0067834.
- Han, V. K.; Bassett, N.; Walton, J.; Challis, J. R. (1996): The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81 (7), S. 2680–2693. DOI: 10.1210/jcem.81.7.8675597.
- Hansen, Karl R.; Thyer, Angela C.; Sluss, Patrick M.; Bremner, William J.; Soules, Michael R.; Klein, Nancy A. (2005): Reproductive ageing and ovarian function: is the early follicular phase FSH rise necessary to maintain adequate secretory function in older ovulatory women? In: *Human reproduction (Oxford, England)* 20 (1), S. 89–95. DOI: 10.1093/humrep/deh544.
- Hardy, K.; Spanos, S. (2002): Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. In: *The Journal of endocrinology* 172 (2), S. 221–236. DOI: 10.1677/joe.0.1720221.
- Harman, Denham (2006): Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, S. 10–21. DOI: 10.1196/annals.1354.003.
- Hassold, T.; Chiu, D. (1985): Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. In: *Human genetics* 70 (1), S. 11–17. DOI: 10.1007/bf00389450.
- Hatano, Naoya; Mori, Yoshiko; Oh-hora, Masatsugu; Kosugi, Atsushi; Fujikawa, Takahiko; Nakai, Naoya et al. (2003): Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in

- placental development. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8 (11), S. 847–856. DOI: 10.1046/j.1365-2443.2003.00680.x.
- Haucke, Elisa; Navarrete Santos, Alexander; Simm, Andreas; Henning, Christian; Glomb, Marcus A.; Gürke, Jacqueline et al. (2014): Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 148 (2), S. 169–178. DOI: 10.1530/rep-14-0149.
- Hayek, T.; Oiknine, J.; Brook, J. G.; Aviram, M. (1994): Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. In: *Biochemical and biophysical research communications* 201 (3), S. 1567–1574. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1883.
- Hayflick, L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. In: *Experimental Cell Research* 37 (3), S. 614–636. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Heid, H. W.; Moll, R.; Schwetlick, I.; Rackwitz, H. R.; Keenan, T. W. (1998): Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. In: *Cell and tissue research* 294 (2), S. 309–321. DOI: 10.1007/s004410051181.
- Heiss, G.; Tamir, I.; Davis, C. E.; Tyroler, H. A.; Rifkind, B. M.; Schonfeld, G. et al. (1980): Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. In: *Circulation* 61 (2), S. 302–315. DOI: 10.1161/01.CIR.61.2.302.
- Herrler, A.; Krusche, C. A.; Beier, H. M. (1998): Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. In: *Biology of reproduction* 59 (6), S. 1302–1310. DOI: 10.1095/biolreprod59.6.1302.
- Herzig, Sébastien; Shaw, Reuben J. (2018): AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (2), S. 121–135. DOI: 10.1038/nrm.2017.95.
- Hewitt, Sylvia C.; Lierz, Sydney L.; Garcia, Marleny; Hamilton, Katherine J.; Gruzdev, Artiom; Grimm, Sara A. et al. (2019): A distal super enhancer mediates estrogen-dependent mouse uterine-specific gene transcription of Igf1 (insulin-like growth factor 1). In: *The Journal of biological chemistry* 294 (25), S. 9746–9759. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008759.
- Huang, Lii-Shung; Lee, Maw-Sheng; Cheng, En-Hui; Lee, Tsung-Hsien; Liu, Chung-Hsien; Lee, Meng-Chih; Chou, Ming-Chih (2008): Recipient age and pulsatility index affect uterine receptivity in oocyte donation programmes. In: *Reproductive BioMedicine Online* 17 (1), S. 94–100. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60299-4.
- Igosheva, Natalia; Abramov, Andrey Y.; Poston, Lucilla; Eckert, Judith J.; Fleming, Tom P.; Duchon, Michael R.; McConnell, Josie (2010): Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. In: *PloS one* 5 (4), e10074. DOI: 10.1371/journal.pone.0010074.
- Impey, Soren; McCorkle, Sean R.; Cha-Molstad, Hyunjoo; Dwyer, Jami M.; Yochum, Gregory S.; Boss, Jeremy M. et al. (2004): Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. In: *Cell* 119 (7), S. 1041–1054. DOI: 10.1016/j.cell.2004.10.032.
- Ita, J. Rodríguez de; Castilla-Cortázar, I.; Aguirre, G. A.; Sánchez-Yago, C.; Santos-Ruiz, M. Olleros; Guerra-Menéndez, L. et al. (2015): Altered liver expression of genes involved in lipid and glucose metabolism in mice with partial IGF-1 deficiency: an experimental approach to

metabolic syndrome. In: *Journal of Translational Medicine* 13. DOI: 10.1186/s12967-015-0684-9.

Jasienska, Grazyna; Ellison, Peter T.; Galbarczyk, Andrzej; Jasienski, Michal; Kalembe-Drozd, Malgorzata; Kapiszewska, Maria et al. (2015): Apolipoprotein E (ApoE) polymorphism is related to differences in potential fertility in women: a case of antagonistic pleiotropy? In: *Proceedings. Biological sciences* 282 (1803), S. 20142395. DOI: 10.1098/rspb.2014.2395.

Ji, Diana; Zhao, Guojun; Songstad, Allison; Cui, Xiaoxia; Weinstein, Edward J. (2015): Efficient creation of an APOE knockout rabbit. In: *Transgenic research* 24 (2), S. 227–235. DOI: 10.1007/s11248-014-9834-8.

Jin, X. L.; O'Neill, C. (2007): cAMP-responsive element-binding protein expression and regulation in the mouse preimplantation embryo. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 134 (5), S. 667–675. DOI: 10.1530/rep-07-0249.

Jin, X. L.; O'Neill, C. (2014): The regulation of the expression and activation of the essential ATF1 transcription factor in the mouse preimplantation embryo. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 148 (2), S. 147–157. DOI: 10.1530/rep-13-0535.

Jinno, Masao; Takeuchi, Masayoshi; Watanabe, Aiko; Teruya, Koji; Hirohama, Jun; Eguchi, Noriko; Miyazaki, Aiko (2011): Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 26 (3), S. 604–610. DOI: 10.1093/humrep/deq388.

Johnson, Adiv A.; Stolzing, Alexandra (2019): The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. In: *Aging Cell* 18 (6), e13048. DOI: 10.1111/accel.13048.

Kahveci, Bekir; Melekoglu, Rauf; Evruke, Ismail Cuneyt; Cetin, Cihan (2018): The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. In: *BMC pregnancy and childbirth* 18 (1), S. 343. DOI: 10.1186/s12884-018-1984-x.

Kane, M. T. (1979): Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. In: *Biology of reproduction* 20 (2), S. 323–332. DOI: 10.1095/biolreprod20.2.323.

Kao, L. C.; Tulac, S.; Lobo, S.; Imani, B.; Yang, J. P.; Germeyer, A. et al. (2002): Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. In: *Endocrinology* 143 (6), S. 2119–2138. DOI: 10.1210/endo.143.6.8885.

Kautzky-Willer, A.; Prager, R.; Waldhausl, W.; Pacini, G.; Thomaseth, K.; Wagner, O. F. et al. (1997): Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. In: *Diabetes care* 20 (11), S. 1717–1723. DOI: 10.2337/diacare.20.11.1717.

Kaye, P. L.; Bell, K. L.; Beebe, L. F.; Dunlison, G. F.; Gardner, H. G.; Harvey, M. B. (1992): Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. In: *Reproduction, fertility, and development* 4 (4), S. 373–386. DOI: 10.1071/rd9920373.

Kennedy, Thomas G.; Gillio-Meina, Carolina; Phang, Sen Han (2007): Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 134 (5), S. 635–643. DOI: 10.1530/REP-07-0328.

Kenny, Louise C.; Lavender, Tina; McNamee, Roseanne; O'Neill, Sinéad M.; Mills, Tracey; Khashan, Ali S. (2013): Advanced maternal age and adverse pregnancy outcome: evidence from a large contemporary cohort. In: *PloS one* 8 (2), e56583. DOI: 10.1371/journal.pone.0056583.

Khalil, A.; Syngelaki, A.; Maiz, N.; Zinevich, Y.; Nicolaides, K. H. (2013): Maternal age and adverse pregnancy outcome: a cohort study. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 42 (6), S. 634–643. DOI: 10.1002/uog.12494.

Kikuchi, Kazuhiro; Ekwall, Hans; Tienthai, Paisan; Kawai, Yasuhiro; Noguchi, Junko; Kaneko, Hiroyuki; Rodriguez-Martinez, Heriberto (2002): Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. In: *Zygote (Cambridge, England)* 10 (4), S. 355–366. DOI: 10.1017/s0967199402004100.

Kim, Ji Young; Kim, Dae Hyun; Choi, Jaehun; Park, Jin-Kyu; Jeong, Kyu-Shik; Leeuwenburgh, Christiaan et al. (2009): Changes in lipid distribution during aging and its modulation by calorie restriction. In: *Age (Dordrecht, Netherlands)* 31 (2), S. 127–142. DOI: 10.1007/s11357-009-9089-0.

Klotz, Diane M.; Hewitt, Sylvia Curtis; Ciana, Paolo; Raviscioni, Michele; Lindzey, Jonathan K.; Foley, Julie et al. (2002): Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (10), S. 8531–8537. DOI: 10.1074/jbc.M109592200.

Koren-Iton, Amit; Salomon-Zimri, Shiran; Smolar, Alex; Shavit-Stein, Efrat; Dori, Amir; Chapman, Joab; Michaelson, Daniel M. (2020): Central and Peripheral Mechanisms in ApoE4-Driven Diabetic Pathology. In: *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041289.

Kraft, Wilfried (Hg.) (2013): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Der neue Kraft/Dürr. 7., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer.

Krisher, Rebecca L.; Prather, Randall S. (2012): A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. In: *Mol. Reprod. Dev.* 79 (5), S. 311–320. DOI: 10.1002/mrd.22037.

Krisher, Rebecca L.; Schoolcraft, William B.; Katz-Jaffe, Mandy G. (2015): Omics as a window to view embryo viability. In: *Fertility and sterility* 103 (2), S. 333–341. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.116.

Krishna, M.; Narang, H. (2008): The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (22), S. 3525–3544. DOI: 10.1007/s00018-008-8170-7.

Lammi, N.; Moltchanova, E.; Blomstedt, P.; Eriksson, J. G.; Taskinen, O.; Sarti, C. et al. (2007): The effect of birth order and parental age on the risk of type 1 and 2 diabetes among young adults. In: *Diabetologia* 50 (12), S. 2433–2438. DOI: 10.1007/s00125-007-0843-5.

Lamminpää, Reeta; Vehviläinen-Julkunen, Katri; Gissler, Mika; Heinonen, Seppo (2012): Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008. In: *BMC pregnancy and childbirth* 12, S. 47. DOI: 10.1186/1471-2393-12-47.

Lane, Michelle; Gardner, David K. (2007): Embryo culture medium: which is the best? In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 21 (1), S. 83–100. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009.

Laopaiboon, M.; Lumbiganon, P.; Intarut, N.; Mori, R.; Ganchimeg, T.; Vogel, J. P. et al. (2014): Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 121 Suppl 1, S. 49–56. DOI: 10.1111/1471-0528.12659.

Laser, Jordan; Lee, Peng; Wei, Jian-Jun (2010): Cellular senescence in usual type uterine leiomyoma. In: *Fertility and sterility* 93 (6), S. 2020–2026. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.116.

Lawlor, Debbie A.; Najman, Jake M.; Sterne, Jonathan; Williams, Gail M.; Ebrahim, Shah; Davey Smith, George (2004): Associations of parental, birth, and early life characteristics with systolic blood pressure at 5 years of age: findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. In: *Circulation* 110 (16), S. 2417–2423. DOI: 10.1161/01.cir.0000145165.80130.b5.

Leese, Henry J. (2012): Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 143 (4), S. 417–427. DOI: 10.1530/REP-11-0484.

Leese, Henry J.; Brison, Daniel R.; Sturmey, Roger G. (2022): The Quiet Embryo Hypothesis: 20 years on. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 899485. DOI: 10.3389/fphys.2022.899485.

Leese, Henry J.; Guerif, Fabrice; Allgar, Victoria; Brison, Daniel R.; Lundin, Kersti; Sturmey, Roger G. (2016): Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. In: *Mol. Reprod. Dev.* 83 (9), S. 748–754. DOI: 10.1002/mrd.22684.

Leese, Henry J.; Sathyapalan, Thozhukat; Allgar, Victoria; Brison, Daniel R.; Sturmey, Roger (2019): Going to extremes: the Goldilocks/Lagom principle and data distribution. In: *BMJ open* 9 (11), e027767. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-027767.

Li, Muyao; Chiu, Jen-Fu; Mossman, Brooke T.; Fukagawa, Naomi K. (2006): Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (52), S. 40429–40439. DOI: 10.1074/jbc.M606596200.

Li, Yueyi; Ren, Xinghua; He, Lilan; Li, Jing; Zhang, Shiyi; Chen, Weiju (2020): Maternal age and the risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. In: *Diabetes research and clinical practice* 162, S. 108044. DOI: 10.1016/j.diabres.2020.108044.

Liao, Yixin; Jiang, Yaling; He, Hui; Ni, Hao; Tu, Zhaowei; Zhang, Shuang et al. (2015): NEDD8-mediated neddylation is required for human endometrial stromal proliferation and decidualization. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 30 (7), S. 1665–1676. DOI: 10.1093/humrep/dev117.

Lighten, A. D.; Moore, G. E.; Winston, R. M.; Hardy, K. (1998): Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 13 (11), S. 3144–3150. DOI: 10.1093/humrep/13.11.3144.

Lim, Alvin S.T.; Tsakok, Maurine F.H. (1997): Age-related decline in fertility: A link to degenerative oocytes? In: *Fertility and sterility* 68 (2), S. 265–271. DOI: 10.1016/S0015-0282(97)81513-0.

Lima, Camila Bruna de; Dos Santos, Érika Cristina; Ispada, Jéssica; Fontes, Patrícia Kubo; Nogueira, Marcelo Fábio Gouveia; Dos Santos, Charles Morphy Dias; Milazzotto, Marcella Pecora (2020): The dynamics between in vitro culture and metabolism: embryonic adaptation

to environmental changes. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 15672. DOI: 10.1038/s41598-020-72221-1.

Liu, Benrong; Fang, Lei; Mo, Pei; Chen, Changnong; Ji, Yang; Pang, Lihua et al. (2023): Apoe-knockout induces strong vascular oxidative stress and significant changes in the gene expression profile related to the pathways implicated in redox, inflammation, and endothelial function. In: *Cellular signalling* 108, S. 110696. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110696.

Liu, Chia-Chen; Liu, Chia-Chan; Kanekiyo, Takahisa; Xu, Huaxi; Bu, Guojun (2013): Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. In: *Nature reviews. Neurology* 9 (2), S. 106–118. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.263.

Liu, J. P.; Baker, J.; Perkins, A. S.; Robertson, E. J.; Efstratiadis, A. (1993): Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). In: *Cell* 75 (1), S. 59–72.

Liu, Yanhe; Chapple, Vincent; Feenan, Katie; Roberts, Peter; Matson, Phillip (2016): Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. In: *Fertility and sterility* 105 (3), 656–662.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.003.

Louhio, H.; Hovatta, O.; Sjöberg, J.; Tuuri, T. (2000): The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. In: *Molecular human reproduction* 6 (8), S. 694–698. DOI: 10.1093/molehr/6.8.694.

Louvi, A.; Accili, D.; Efstratiadis, A. (1997): Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. In: *Developmental biology* 189 (1), S. 33–48. DOI: 10.1006/dbio.1997.8666.

Lutz, Beat; Schmid, Wolfgang; Niehrs, Christof; Schütz, Günther (1999): Essential role of CREB family proteins during *Xenopus* embryogenesis. In: *Mechanisms of Development* 88 (1), S. 55–66. DOI: 10.1016/s0925-4773(99)00170-7.

MacNaughton, J.; Banah, M.; McCloud, P.; Hee, J.; Burger, H. (1992): Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. In: *Clinical endocrinology* 36 (4), S. 339–345. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1992.tb01457.x.

Mahley, R. W. (1988): Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. In: *Science (New York, N.Y.)* 240 (4852), S. 622–630. DOI: 10.1126/science.3283935.

Mahley, R. W.; Rall, S. C. (2000): Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. In: *Annual review of genomics and human genetics* 1, S. 507–537. DOI: 10.1146/annurev.genom.1.1.507.

Makarevich, A. V.; Markkula, M. (2002): Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. In: *Biology of reproduction* 66 (2), S. 386–392. DOI: 10.1095/biolreprod66.2.386.

Malík, J.; Stulc, T.; Wichterle, D.; Melenovský, V.; Chytilová, E.; Lacinová, Z. et al. (2008): Hyperlipidemia is associated with altered levels of insulin-like growth factor-I. In: *Physiological research* 57 (6), S. 919–925. DOI: 10.33549/physiolres.931281.

- Massimiani, Micol; Lacconi, Valentina; La Civita, Fabio; Ticconi, Carlo; Rago, Rocco; Campagnolo, Luisa (2019): Molecular Signaling Regulating Endometrium-Blastocyst Crosstalk. In: *International journal of molecular sciences* 21 (1). DOI: 10.3390/ijms21010023.
- Maurer, R. R.; Foote, R. H. (1971): Maternal ageing and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer. In: *Journal of reproduction and fertility* 25 (3), S. 329–341. DOI: 10.1530/jrf.0.0250329.
- May-Panloup, P.; Brochard, V.; Hamel, J. F.; Desquiret-Dumas, V.; Chupin, S.; Reynier, P.; Duranthon, V. (2019): Maternal ageing impairs mitochondrial DNA kinetics during early embryogenesis in mice. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 34 (7), S. 1313–1324. DOI: 10.1093/humrep/dez054.
- Mayr, B.; Montminy, M. (2001): Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (8), S. 599–609. DOI: 10.1038/35085068.
- Mazurkiewicz, Dominika; Bronkowska, Monika (2021): Circulating Insulin and IGF-1 and Frequency of Food Consumption during Pregnancy as Predictors of Birth Weight and Length. In: *Nutrients* 13 (7). DOI: 10.3390/nu13072344.
- McCallum, Melissa L.; Pru, Cindy A.; Smith, Andrea R.; Kelp, Nicole C.; Foretz, Marc; Viollet, Benoit et al. (2018): A Functional Role for AMPK in Female Fertility and Endometrial Regeneration. In: *Reproduction (Cambridge, England)*. DOI: 10.1530/REP-18-0372.
- McMillin, J. B.; Taffet, G. E.; Taegtmeyer, H.; Hudson, E. K.; Tate, C. A. (1993): Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart. In: *Cardiovascular research* 27 (12), S. 2222–2228. DOI: 10.1093/cvr/27.12.2222.
- Miquel, J.; Economos, A. C.; Fleming, J.; Johnson, J. E. (1980): Mitochondrial role in cell aging. In: *Experimental gerontology* 15 (6), S. 575–591. DOI: 10.1016/0531-5565(80)90010-8.
- Moghadasian, M. H.; McManus, B. M.; Nguyen, L. B.; Shefer, S.; Nadji, M.; Godin, D. V. et al. (2001): Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (14), S. 2623–2630. DOI: 10.1096/fj.01-0463com.
- Moghadasian, M. H.; Nguyen, L. B.; Shefer, S.; McManus, B. M.; Frohlich, J. J. (1999): Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of apo E-deficient mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79 (3), S. 355–364.
- Mohtasebi, Parinaz; Eslami, Maryam; Ramezanali, Fariba; Borjian Boroujeni, Parnaz; Rokhsat Talab, Zeinab; Zamanian, Mohammadreza (2021): APOE polymorphism status (E4) may help in predicting the risk of recurrent implantation failure. In: *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. DOI: 10.1002/ijgo.14022.
- Monnier, D.; Boutillier, A. L.; Giraud, P.; Chiu, R.; Aunis, D.; Feltz, P. et al. (1994): Insulin-like growth factor-I stimulates c-fos and c-jun transcription in PC12 cells. In: *Molecular and cellular endocrinology* 104 (2), S. 139–145. DOI: 10.1016/0303-7207(94)90116-3.
- Morcos, Michael; Du, Xuiliang; Pfisterer, Friederike; Hutter, Harald; Sayed, Ahmed A. R.; Thornalley, Paul et al. (2008): Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and

- enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. In: *Aging Cell* 7 (2), S. 260–269. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00371.x.
- Murphy, L. J.; Bell, G. I.; Friesen, H. G. (1987): Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. In: *Endocrinology* 120 (4), S. 1279–1282. DOI: 10.1210/endo-120-4-1279.
- Nass, N.; Bartling, B.; Navarrete Santos, A.; Scheubel, R. J.; Börgermann, J.; Silber, R. E.; Simm, A. (2007): Advanced glycation end products, diabetes and ageing. In: *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 40 (5), S. 349–356. DOI: 10.1007/s00391-007-0484-9.
- Navarrete Santos, Anne; Ramin, Nicole; Tonack, Sarah; Fischer, Bernd (2008): Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbit blastocysts. In: *Endocrinology* 149 (2), S. 515–524. DOI: 10.1210/en.2007-0821.
- Navarrete Santos, Anne; Tonack, Sarah; Kirstein, Michaela; Pantaleon, Marie; Kaye, Peter; Fischer, Bernd (2004): Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 128 (5), S. 517–526. DOI: 10.1530/rep.1.00204.
- Nayak, N. R.; Giudice, L. C. (2003): Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. In: *Placenta* 24 (4), S. 281–296. DOI: 10.1053/plac.2002.0906.
- Nigro, Cecilia; Leone, Alessia; Longo, Michele; Prevezano, Immacolata; Fleming, Thomas H.; Nicolò, Antonella et al. (2019): Methylglyoxal accumulation de-regulates HoxA5 expression, thereby impairing angiogenesis in glyoxalase 1 knock-down mouse aortic endothelial cells. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1865 (1), S. 73–85. DOI: 10.1016/j.bbdis.2018.10.014.
- Nigro, Cecilia; Raciti, Gregory A.; Leone, Alessia; Fleming, Thomas H.; Longo, Michele; Prevezano, Immacolata et al. (2014): Methylglyoxal impairs endothelial insulin sensitivity both in vitro and in vivo. In: *Diabetologia* 57 (7), S. 1485–1494. DOI: 10.1007/s00125-014-3243-7.
- Niimi, Manabu; Yang, Dongshan; Kitajima, Shuji; Ning, Bo; Wang, Chuan; Li, Shen et al. (2016): ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia. In: *Atherosclerosis* 245, S. 187–193. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.002.
- Nivelle, Johanna de; Thoma, Juliane; Toto Nienguesso, Alicia; Seeling, Tom; Jung, Juliane-Susanne; Navarrete Santos, Anne; Schindler, Maria (2020): Rabbit as an Aging Model in Reproduction: Advanced Maternal Age Alters GLO1 Expression in the Endometrium at the Time of Implantation. In: *Applied Sciences* 10 (21), S. 7732. DOI: 10.3390/app10217732.
- Odiet, Jeff A.; Boerrigter, Michaël E.T.I.; Wei, Jeanne Y. (1995): Carnitine palmitoyl transferase-I activity in the aging mouse heart. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 79 (2-3), S. 127–136. DOI: 10.1016/0047-6374(94)01552-w.
- Oka, Y.; Rozek, L. M.; Czech, M. P. (1985): Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (16), S. 9435–9442.
- Olmos, Yolanda; Sánchez-Gómez, Francisco J.; Wild, Brigitte; García-Quintans, Nieves; Cabezudo, Sofía; Lamas, Santiago; Monsalve, María (2013): SirT1 regulation of antioxidant

- genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. In: *Antioxidants & redox signaling* 19 (13), S. 1507–1521. DOI: 10.1089/ars.2012.4713.
- Oner-Iyidoğan, Yildiz; Koçak, Hikmet; Gürdöl, Figen; Korkmaz, Düzgün; Buyru, Faruk (2004): Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. In: *Gynecologic and obstetric investigation* 57 (4), S. 214–217. DOI: 10.1159/000076691.
- Pantaleon, M.; Kaye, P. L. (1998): Glucose transporters in preimplantation development. In: *Reviews of reproduction* 3 (2), S. 77–81.
- Perman, Jeanna (2011): Mechanisms for and consequences of cellular lipid accumulation. The role of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor. Göteborg: Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research, Dept. of Molecular and Clinical Medicine, Institute of Medicine at Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg.
- Perman, Jeanna C.; Boström, Pontus; Lindbom, Malin; Lidberg, Ulf; Ståhlman, Marcus; Hägg, Daniel et al. (2011): The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (7), S. 2625–2640. DOI: 10.1172/JCI43068.
- Pertynska-Marczewska, Magdalena; Diamanti-Kandarakis, Evanthia (2017): Aging ovary and the role for advanced glycation end products. In: *Menopause (New York, N.Y.)* 24 (3), S. 345–351. DOI: 10.1097/gme.0000000000000755.
- Phillips, Michael C. (2014): Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. In: *IUBMB life* 66 (9), S. 616–623. DOI: 10.1002/iub.1314.
- Piedrahita, J. A.; Zhang, S. H.; Hagaman, J. R.; Oliver, P. M.; Maeda, N. (1992): Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10), S. 4471–4475. DOI: 10.1073/pnas.89.10.4471.
- Polacek, D.; Beckmann, M. W.; Schreiber, J. R. (1992): Rat ovarian apolipoprotein E: localization and gonadotropic control of messenger RNA. In: *Biology of reproduction* 46 (1), S. 65–72. DOI: 10.1095/biolreprod46.1.65.
- Prast, Johanna; Saleh, Leila; Husslein, Heinrich; Sonderegger, Stefan; Helmer, Hanns; Knöfler, Martin (2008): Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. In: *Endocrinology* 149 (3), S. 979–987. DOI: 10.1210/en.2007-1282.
- Prieto, Laura; Quesada, Juan F.; Cambero, Olivia; Pacheco, Alberto; Pellicer, Antonio; Codoceo, Rosa; Garcia-Velasco, Juan A. (2012): Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. In: *Fertility and sterility* 98 (1), S. 126–130. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.052.
- Qiao, Jie; Wang, Zhen-Bo; Feng, Huai-Liang; Miao, Yi-Liang; Wang, Qiang; Yu, Yang et al. (2014): The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: current status and future prospects. In: *Molecular aspects of medicine* 38, S. 54–85. DOI: 10.1016/j.mam.2013.06.001.
- Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2015): Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. In: *Biochemical and biophysical research communications* 458 (2), S. 221–226. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.140.

- Rabe, T.; Kalbfleisch, H.; Haun, A.; Runnebaum, B. (1983): Influence of human lipoproteins on the progesterone synthesis of human term placenta in organ culture. In: *Biological research in pregnancy and perinatology* 4 (2), S. 75–83.
- Ramin, Nicole; Thieme, René; Fischer, Sünje; Schindler, Maria; Schmidt, Thomas; Fischer, Bernd; Navarrete Santos, Anne (2010): Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. In: *Endocrinology* 151 (9), S. 4158–4167. DOI: 10.1210/en.2010-0187.
- Rappolee, D. A.; Sturm, K. S.; Behrendtsen, O.; Schultz, G. A.; Pedersen, R. A.; Werb, Z. (1992): Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. In: *Genes & development* 6 (6), S. 939–952. DOI: 10.1101/gad.6.6.939.
- Reiher, H.; Fuhrmann, K.; Noack, S.; Woltanski, K. P.; Jutzi, E.; Hahn von Dorsche, H.; Hahn, H. J. (1983): Age-dependent insulin secretion of the endocrine pancreas in vitro from fetuses of diabetic and nondiabetic patients. In: *Diabetes care* 6 (5), S. 446–451. DOI: 10.2337/diacare.6.5.446.
- Reiman, E. M.; Caselli, R. J.; Chen, K.; Alexander, G. E.; Bandy, D.; Frost, J. (2001): Declining brain activity in cognitively normal apolipoprotein E epsilon 4 heterozygotes: A foundation for using positron emission tomography to efficiently test treatments to prevent Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6), S. 3334–3339. DOI: 10.1073/pnas.061509598.
- Reiman, Eric M.; Chen, Kewei; Alexander, Gene E.; Caselli, Richard J.; Bandy, Daniel; Osborne, David et al. (2004): Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (1), S. 284–289. DOI: 10.1073/pnas.2635903100.
- Ren, Jun; Anversa, Piero (2015): The insulin-like growth factor I system: physiological and pathophysiological implication in cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome. In: *Biochemical pharmacology* 93 (4), S. 409–417. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.006.
- Ribeiro, Eduardo S.; Santos, José E. P.; Thatcher, William W. (2016): Role of lipids on elongation of the preimplantation conceptus in ruminants. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 152 (4), R115–26. DOI: 10.1530/REP-16-0104.
- Richards, M. W.; Wettemann, R. P.; Spicer, L. J.; Morgan, G. L. (1991): Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. In: *Biology of reproduction* 44 (6), S. 961–966. DOI: 10.1095/biolreprod44.6.961.
- Richardson, S. J.; Senikas, V.; Nelson, J. F. (1987): Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 65 (6), S. 1231–1237. DOI: 10.1210/jcem-65-6-1231.
- Ruan, Ye Chun; Guo, Jing Hui; Liu, Xinmei; Zhang, Runju; Tsang, Lai Ling; Da Dong, Jian et al. (2012): Activation of the epithelial Na⁺ channel triggers prostaglandin E₂ release and production required for embryo implantation. In: *Nature medicine* 18 (7), S. 1112–1117. DOI: 10.1038/nm.2771.

- Ryan, E. A.; Imes, S.; Liu, D.; McManus, R.; Finegood, D. T.; Polonsky, K. S.; Sturis, J. (1995): Defects in insulin secretion and action in women with a history of gestational diabetes. In: *Diabetes* 44 (5), S. 506–512. DOI: 10.2337/diab.44.5.506.
- S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM). Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2. Auflage (2018). In: *AWMF Das Portal der wissenschaftlichen Medizin* (AWMF-Registernummer: 057–008). Online verfügbar unter https://www.awmf.org/fileadmin/user_upload/Leitlinien/057_D_Diabetes_Ges/057-008pr_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-03.pdf.
- Saba-El-Leil, Marc K.; Vella, Francis D. J.; Vernay, Bertrand; Voisin, Laure; Chen, Lan; Labrecque, Nathalie et al. (2003): An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. In: *EMBO reports* 4 (10), S. 964–968. DOI: 10.1038/sj.embor.embor939.
- Sale, E. M.; Sale, G. J. (2008): Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (1), S. 113–127. DOI: 10.1007/s00018-007-7274-9.
- Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. In: *Nature* 414 (6865), S. 799–806. DOI: 10.1038/414799a.
- Samudio, Ismael; Fiegl, Michael; Andreeff, Michael (2009): Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. In: *Cancer research* 69 (6). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3722.
- Sauer, Mark V. (2015): Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. In: *Fertility and sterility* 103 (5), S. 1136–1143. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.004.
- Scandalios, J. G. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 38 (7), S. 995–1014. DOI: 10.1590/s0100-879x2005000700003.
- Schindler, Maria; Fischer, Sünje; Thieme, René; Fischer, Bernd; Santos, Anne Navarrete (2013): cAMP-responsive element binding protein: a vital link in embryonic hormonal adaptation. In: *Endocrinology* 154 (6), S. 2208–2221. DOI: 10.1210/en.2012-2096.
- Schmidlin, Cody J.; Dodson, Matthew B.; Madhavan, Lalitha; Zhang, Donna D. (2019): Redox Regulation by NRF2 in Aging and Disease. In: *Free Radical Biology and Medicine* 134, S. 702–707. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.016.
- Schultz, G. A.; Hogan, A.; Watson, A. J.; Smith, R. M.; Heyner, S. (1992): Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. In: *Reproduction, fertility, and development* 4 (4), S. 361–371. DOI: 10.1071/rd9920361.
- Sebastiani, Paola; Gurinovich, Anastasia; Nygaard, Marianne; Sasaki, Takashi; Sweigart, Benjamin; Bae, Harold et al. (2019): APOE Alleles and Extreme Human Longevity. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 74 (1), S. 44–51. DOI: 10.1093/gerona/gly174.
- Seeling, Tom; Haucke, Elisa; Navarrete Santos, Alexander; Grybel, Katarzyna J.; Gürke, Jacqueline; Pendzialek, S. Mareike et al. (2019): Glyoxalase 1 expression is downregulated in

- preimplantation blastocysts of diabetic rabbits. In: *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 54 Suppl 3, S. 4–11. DOI: 10.1111/rda.13462.
- Segal, S.; Casper, R. F. (1990): The response to ovarian hyperstimulation and in-vitro fertilization in women older than 35 years. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 5 (3), S. 255–257. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137083.
- Sekulovski, Nikola; Whorton, Allison E.; Shi, Mingxin; Hayashi, Kanako; MacLean, James A. (2019): Periovulatory insulin signaling is essential for ovulation, granulosa cell differentiation, and female fertility. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (2), S. 2376–2391. DOI: 10.1096/fj.201901791R.
- Sekulovski, Nikola; Whorton, Allison E.; Shi, Mingxin; Hayashi, Kanako; MacLean, James A. (2021): Insulin signaling is an essential regulator of endometrial proliferation and implantation in mice. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (4), e21440. DOI: 10.1096/fj.202002448R.
- Sengupta, Pallav; Dutta, Sulagna (2020): Mapping the Age of Laboratory Rabbit Strains to Human. In: *International Journal of Preventive Medicine* 11. DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_530_18.
- Shafiei, Golnaz; Almasi, Majid; Nikzad, Hossein; Miyan, Jaleel; Mahabadi, Javad Amini; Moshkdanian, Ghazaleh (2020): L-carnitine reduces the adverse effects of ROS and up-regulates the expression of implantation related genes in in vitro developed mouse embryos. In: *Theriogenology* 145, S. 59–66. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.008.
- Shea, Thomas B.; Rogers, Eugene; Ashline, David; Ortiz, Daniela; Sheu, Min-Shyan (2002): Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. In: *Free Radical Biology and Medicine* 33 (8), S. 1115–1120. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)01001-8.
- Silva, J. R. V.; Figueiredo, J. R.; van den Hurk, R. (2009): Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. In: *Theriogenology* 71 (8), S. 1193–1208. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.015.
- Simm, Andreas; Klotz, Lars-Oliver (2015): Stress and biological aging: A double-edged sword. In: *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 48 (6), S. 505–510. DOI: 10.1007/s00391-015-0928-6.
- Simpson, E. R.; Mahendroo, M. S.; Means, G. D.; Kilgore, M. W.; Hinshelwood, M. M.; Graham-Lorence, S. et al. (1994): Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. In: *Endocrine reviews* 15 (3), S. 342–355. DOI: 10.1210/edrv-15-3-342.
- Small, G. W.; Ercoli, L. M.; Silverman, D. H.; Huang, S. C.; Komo, S.; Bookheimer, S. Y. et al. (2000): Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11), S. 6037–6042. DOI: 10.1073/pnas.090106797.
- Smits, Luc J.; Zielhuis, Gerhard A.; Jongbloet, Piet H.; van Poppel, Frans W. A. (2002): Mother's age and daughter's fecundity. An epidemiological analysis of late 19th to early 20th century family reconstitutions. In: *International journal of epidemiology* 31 (2), S. 349–358.
- Spanos, S.; Becker, D. L.; Winston, R. M.; Hardy, K. (2000): Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. In: *Biology of reproduction* 63 (5), S. 1413–1420. DOI: 10.1095/biolreprod63.5.1413.

- Springer, Mark S.; Murphy, William J. (2007): Mammalian evolution and biomedicine: new views from phylogeny. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 82 (3), S. 375–392. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2007.00016.x.
- Stratmann, Bernd; Goldstein, Bernhard; Thornalley, Paul J.; Rabbani, Naila; Tschoepe, Diethelm (2017): Intracellular Accumulation of Methylglyoxal by Glyoxalase 1 Knock Down Alters Collagen Homeostasis in L6 Myoblasts. In: *International journal of molecular sciences* 18 (3). DOI: 10.3390/ijms18030480.
- Stubbs, Christopher D.; Smith, Anthony D. (1984): The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 779 (1), S. 89–137. DOI: 10.1016/0304-4157(84)90005-4.
- Sturmey, R. G.; Leese, H. J. (2003): Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 126 (2), S. 197–204. DOI: 10.1530/rep.0.1260197.
- Sturmey, R. G.; Reis, A.; Leese, H. J.; McEvoy, T. G. (2009): Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. In: *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 44 Suppl 3, S. 50–58. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x.
- Sudano, Mateus José; Paschoal, Daniela Martins; Da Rascado, Tatiana Silva; Magalhães, Luis Carlos Oña; Crocomo, Letícia Ferrari; Lima-Neto, João Ferreira de; Da Landim-Alvarenga, Fernanda Cruz (2011): Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. In: *Theriogenology* 75 (7), S. 1211–1220. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.033.
- Sun, Yidan; Kopp, Susanne; Strutz, Jasmin; Gali, Chaitanya Chakravarthi; Zandl-Lang, Martina; Fanaee-Danesh, Elham et al. (2018): Gestational diabetes mellitus modulates cholesterol homeostasis in human fetoplacental endothelium. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (9), S. 968–979. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.05.005.
- Takahashi, Sadao (2017): Triglyceride Rich Lipoprotein -LPL-VLDL Receptor and Lp(a)-VLDL Receptor Pathways for Macrophage Foam Cell Formation. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 24 (6), S. 552–559. DOI: 10.5551/jat.RV17004.
- Takahashi, Sadao; Sakai, Juro; Fujino, Takahiro; Hattori, Hiroaki; Zenimaru, Yasuo; Suzuki, Jinya et al. (2004): The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 11 (4), S. 200–208. DOI: 10.5551/jat.11.200.
- Tamura, Isao; Takagi, Haruka; Doi-Tanaka, Yumiko; Shirafuta, Yuichiro; Mihara, Yumiko; Shinagawa, Masahiro et al. (2020): Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization. In: *The Journal of biological chemistry* 295 (14), S. 4673–4683. DOI: 10.1074/jbc.RA120.012841.
- Tarín, J. J.; Vidal, E.; Pérez-Hoyos, S.; Cano, A.; Balasch, J. (2001): Delayed motherhood increases the probability of sons to be infertile. In: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18 (12), S. 650–654. DOI: 10.1023/a:1013163217089.
- Tatone, C.; Carbone, M. C.; Campanella, G.; Festuccia, C.; Artini, P. G.; Talesa, V. et al. (2010): Female reproductive dysfunction during ageing: role of methylglyoxal in the formation of

advanced glycation endproducts in ovaries of reproductively-aged mice. In: *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 24 (1), S. 63–72.

Tatone, C.; Carbone, M. C.; Falone, S.; Aimola, P.; Giardinelli, A.; Caserta, D. et al. (2006): Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. In: *Molecular human reproduction* 12 (11), S. 655–660. DOI: 10.1093/molehr/gal080.

Tatone, Carla; Amicarelli, Fernanda; Carbone, Maria Cristina; Monteleone, Patrizia; Caserta, Donatella; Marci, Roberto et al. (2008): Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. In: *Human reproduction update* 14 (2), S. 131–142. DOI: 10.1093/humupd/dmm048.

Tatone, Carla; Eichenlaub-Ritter, Ursula; Amicarelli, Fernanda (2014): Dicarbonyl stress and glyoxalases in ovarian function. In: *Biochemical Society transactions* 42 (2), S. 433–438. DOI: 10.1042/BST20140023.

te Velde, Egbert R.; Pearson, Peter L. (2002): The variability of female reproductive ageing. In: *Human reproduction update* 8 (2), S. 141–154. DOI: 10.1093/humupd/8.2.141.

Thieme, René; Ramin, Nicole; Fischer, Sünje; Püschel, Bernd; Fischer, Bernd; Santos, Anne Navarrete (2012a): Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. In: *Molecular and cellular endocrinology* 348 (1), S. 112–119. DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.044.

Thieme, René; Schindler, Maria; Ramin, Nicole; Fischer, Sünje; Mühleck, Britta; Fischer, Bernd; Navarrete Santos, Anne (2012b): Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. In: *Molecular and cellular endocrinology* 358 (1), S. 96–103. DOI: 10.1016/j.mce.2012.03.007.

Thornalley, Paul J.; Battah, Sinan; Ahmed, Naila; Karachalias, Nikolaos; Agalou, Stamatina; Babaei-Jadidi, Roya; Dawnay, Anne (2003): Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. In: *The Biochemical journal* 375 (Pt 3), S. 581–592. DOI: 10.1042/bj20030763.

Thornalley, Paul J.; Waris, Sahar; Fleming, Thomas; Santarius, Thomas; Larkin, Sarah J.; Winklhofer-Roob, Brigitte M. et al. (2010): Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. In: *Nucleic acids research* 38 (16), S. 5432–5442. DOI: 10.1093/nar/gkq306.

Toyofuku, Aya; Hara, Tetsuaki; Taguchi, Takashi; Katsura, Yuki; Ohama, Koso; Kudo, Yoshiki (2006): Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 21 (5), S. 1122–1128. DOI: 10.1093/humrep/dei454.

Treloar, Alan E. (1981): Menstrual cyclicity and the pre-menopause. In: *Maturitas* 3 (3-4), S. 249–264. DOI: 10.1016/0378-5122(81)90032-3.

Trohl, Juliane; Schindler, Maria; Buske, Maximilian; Nivelle, Johanna de; Toto Nienguesso, Alicia; Navarrete Santos, Anne (2023): Advanced maternal age leads to changes within the insulin/IGF system and lipid metabolism in the reproductive tract and preimplantation embryo: insights from the rabbit model. In: *Molecular human reproduction* 29 (12). DOI: 10.1093/molehr/gaad040.

Tsuji, Hirotsada; Khandoker, M.A.M. Yahia; Hamano, Koh-ichi (2001): Lipid in Mammalian Embryo Development. In: *J.Mamm.Ova.Res.* 18 (3), S. 73–80. DOI: 10.1274/jmor.18.73.

- Ullrich, A.; Gray, A.; Tam, A. W.; Yang-Feng, T.; Tsubokawa, M.; Collins, C. et al. (1986): Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. In: *The EMBO Journal* 5 (10), S. 2503–2512.
- Utermann, G.; Kindermann, I.; Kaffarnik, H.; Steinmetz, A. (1984): Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. In: *Human genetics* 65 (3), S. 232–236. DOI: 10.1007/BF00286508.
- Vallejo, Griselda; La Greca, Alejandro D.; Tarifa-Reischle, Inti C.; Mestre-Citrinovitz, Ana C.; Ballaré, Cecilia; Beato, Miguel; Saragüeta, Patricia (2014): CDC2 Mediates Progesterone Initiated Endometrial Stromal Cell Proliferation: A PR Signaling to Gene Expression Independently of Its Binding to Chromatin. In: *PloS one* 9 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0097311.
- van Blerkom, Jonathan (2011): Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. In: *Mitochondrion* 11 (5), S. 797–813. DOI: 10.1016/j.mito.2010.09.012.
- van der Weijden, Vera A.; Schmidhauser, Meret; Kurome, Mayuko; Knubben, Johannes; Flöter, Veronika L.; Wolf, Eckhard; Ulbrich, Susanne E. (2021): Transcriptome dynamics in early in vivo developing and in vitro produced porcine embryos. In: *BMC Genomics* 22. DOI: 10.1186/s12864-021-07430-7.
- van Hoeck, Veerle; Sturmey, Roger G.; Bermejo-Alvarez, Pablo; Rizos, Dimitrios; Gutierrez-Adan, Alfonso; Leese, Henry J. et al. (2011): Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. In: *PloS one* 6 (8), e23183. DOI: 10.1371/journal.pone.0023183.
- van Noord-Zaadstra, B. M.; Looman, C. W.; Alsbach, H.; Habbema, J. D.; te Velde, E. R.; Karbaat, J. (1991): Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 302 (6789), S. 1361–1365. DOI: 10.1136/bmj.302.6789.1361.
- Velazquez, M. A.; Hermann, D.; Kues, W. A.; Niemann, H. (2011a): Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 141 (1), S. 91–103. DOI: 10.1530/REP-10-0336.
- Velazquez, M. A.; Smith, C. G. C.; Smyth, N. R.; Osmond, C.; Fleming, T. P. (2016): Advanced maternal age causes adverse programming of mouse blastocysts leading to altered growth and impaired cardiometabolic health in post-natal life. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 31 (9), S. 1970–1980. DOI: 10.1093/humrep/dew177.
- Velazquez, Miguel A.; Hadeler, Klaus-Gerd; Herrmann, Doris; Kues, Wilfried A.; Ulbrich, Susanne E.; Ulbrich, Susanne et al. (2011b): In vivo oocyte developmental competence is reduced in lean but not in obese superovulated dairy cows after intraovarian administration of IGF1. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 142 (1), S. 41–52. DOI: 10.1530/REP-10-0512.
- Viebahn, C.; Mayer, B.; Miething, A. (1995): Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. In: *Acta anatomica* 154 (2), S. 99–110. DOI: 10.1159/000147756.
- Wahl, Patricia W.; Warnick, G. Russell; Albers, John J.; Hoover, J. Joanne; Walden, Carolyn E.; Bergelin, Robert O. et al. (1981): Distribution of lipoprotein triglyceride and lipoprotein cholesterol in an adult population by age, sex, and hormone use. In: *Atherosclerosis* 39 (1), S. 111–124. DOI: 10.1016/0021-9150(81)90093-9.

- Warshaviak, Miriam; Kalma, Yael; Carmon, Ariela; Samara, Nivin; Dviri, Michal; Azem, Foad; Ben-Yosef, Dalit (2019): The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics. In: *Frontiers in endocrinology* 10, S. 686. DOI: 10.3389/fendo.2019.00686.
- Watson, A. J.; Hogan, A.; Hahnel, A.; Wiemer, K. E.; Schultz, G. A. (1992): Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. In: *Mol. Reprod. Dev.* 31 (2), S. 87–95. DOI: 10.1002/mrd.1080310202.
- Whincup, P. H.; Cook, D. G.; Shaper, A. G. (1989): Early influences on blood pressure: a study of children aged 5–7 years. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 299 (6699), S. 587–591. DOI: 10.1136/bmj.299.6699.587.
- White, Morris F. (2006): Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84 (7), S. 725–737. DOI: 10.1139/y06-008.
- Wilding, M.; Dale, B.; Marino, M.; Di Matteo, L.; Alviggi, C.; Pisaturo, M. L. et al. (2001): Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 16 (5), S. 909–917. DOI: 10.1093/humrep/16.5.909.
- Wilding, Martin; Coppola, Gianfranco; Icco, Francesco de; Arenare, Laura; Di Matteo, Loredana; Dale, Brian (2014): Maternal non-Mendelian inheritance of a reduced lifespan? A hypothesis. In: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31 (6), S. 637–643. DOI: 10.1007/s10815-014-0222-3.
- Winkel, C. A.; MacDonald, P. C.; Simpson, E. R. (1981): The role of receptor-mediated low-density lipoprotein uptake and degradation in the regulation of progesterone biosynthesis and cholesterol metabolism by human trophoblasts. In: *Placenta. Supplement* 3, S. 133–143.
- Woods, Laura; Perez-Garcia, Vicente; Kieckbusch, Jens; Wang, Xiaoqiu; DeMayo, Francesco; Colucci, Francesco; Hemberger, Myriam (2017): Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. In: *Nature communications* 8 (1), S. 352. DOI: 10.1038/s41467-017-00308-x.
- Xue, Mingzhan; Rabbani, Naila; Momiji, Hiroshi; Imbasi, Precious; Anwar, M. Maqsood; Kitteringham, Neil et al. (2012): Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. In: *The Biochemical journal* 443 (1), S. 213–222. DOI: 10.1042/BJ20111648.
- Xue, Mingzhan; Weickert, Martin O.; Qureshi, Sheharyar; Kandala, Ngianga-Bakwin; Anwar, Attia; Waldron, Molly et al. (2016): Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation. In: *Diabetes* 65 (8), S. 2282–2294. DOI: 10.2337/db16-0153.
- Yahia Khandoker, M. A. M.; Tsujii, H.; Karasawa, D. (1998): A kinetics study of fatty acid composition of embryos, oviductal and uterine fluids in the rabbit. In: *Asian Australas. J. Anim. Sci* 11 (1), S. 60–64. DOI: 10.5713/ajas.1998.60.
- Yan, Fei; Zhao, Qi; Li, Ying; Zheng, Zhibo; Kong, Xinliang; Shu, Chang et al. (2022): The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. In: *Journal of ovarian research* 15 (1), S. 100. DOI: 10.1186/s13048-022-01032-x.

- Yanes, Oscar; Clark, Julie; Wong, Diana M.; Patti, Gary J.; Sánchez-Ruiz, Antonio; Benton, H. Paul et al. (2010): Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. In: *Nature chemical biology* 6 (6), S. 411–417. DOI: 10.1038/nchembio.364.
- Yang, Dan; Gao, Lili; Wang, Tingfeng; Qiao, Zhengdong; Liang, Yongjun; Zhang, Peng (2014): Hypoxia triggers endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via induction of VLDL receptor. In: *FEBS letters* 588 (23), S. 4448–4456. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.09.046.
- Yang, Su-Jung; Chen, Chen-Yu; Chang, Geen-Dong; Wen, Hui-Chin; Chen, Ching-Yu; Chang, Shi-Chuan et al. (2013): Activation of Akt by Advanced Glycation End Products (AGEs): Involvement of IGF-1 Receptor and Caveolin-1. In: *PloS one* 8 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0058100.
- Yovich, John L.; Zaidi, Syeda; Nguyen, Minh D. K.; Hinchliffe, Peter M. (2020): Measuring IGF-1 and IGFBP-3 Profiles in Women Seeking Assisted Reproduction; Relationship to Clinical Parameters (Study 1). In: *Journal of personalized medicine* 10 (3). DOI: 10.3390/jpm10030122.
- Zaraza, J.; Oropeza, A.; Velazquez, M. A.; Korsawe, K.; Herrmann, D.; Carnwath, J. W.; Niemann, H. (2010): Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. In: *Theriogenology* 74 (1), S. 75–89. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.033.
- Zerbinatti, C. V.; Mayer, L. P.; Audet, R. G.; Dyer, C. A. (2001): Apolipoprotein E is a putative autocrine regulator of the rat ovarian theca cell compartment. In: *Biology of reproduction* 64 (4), S. 1080–1089. DOI: 10.1095/biolreprod64.4.1080.
- Zhang, Hongqiao; Davies, Kelvin J. A.; Forman, Henry Jay (2015): Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. In: *Free radical biology & medicine* 88 (Pt B), S. 314–336. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
- Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Piedrahita, J. A.; Maeda, N. (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5081), S. 468–471. DOI: 10.1126/science.1411543.
- Zhang, Ting; Dai, Pengyuan; Cheng, Dong; Zhang, Liang; Chen, Zijiang; Meng, Xiaoqian et al. (2014): Obesity occurring in apolipoprotein E-knockout mice has mild effects on fertility. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 147 (2), S. 141–151. DOI: 10.1530/REP-13-0470.
- Zhang, Xinmin; Odom, Duncan T.; Koo, Seung-Hoi; Conkright, Michael D.; Canettieri, Gianluca; Best, Jennifer et al. (2005): Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (12), S. 4459–4464. DOI: 10.1073/pnas.0501076102.
- Zhao, Wei; Hou, Yue; Song, Xinxin; Wang, Lei; Zhang, Fangfang; Zhang, Hanting et al. (2021): Estrogen Deficiency Induces Mitochondrial Damage Prior to Emergence of Cognitive Deficits in a Postmenopausal Mouse Model. In: *Frontiers in Aging Neuroscience* 13. DOI: 10.3389/fnagi.2021.713819.
- Zheng, Wen-Hua; Quirion, Rémi (2006): Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. In: *BMC Neuroscience* 7, S. 51. DOI: 10.1186/1471-2202-7-51.

Zhou, Chan; Lv, Meiyang; Wang, Peike; Guo, Chuanhui; Ni, Zhangli; Bao, Haili et al. (2021): Sequential activation of uterine epithelial IGF1R by stromal IGF1 and embryonic IGF2 directs normal uterine preparation for embryo implantation. In: *Journal of molecular cell biology* 13 (9), S. 646–661. DOI: 10.1093/jmcb/mjab034.

Zhu, Liyin; Pollard, Jeffrey W. (2007): Estradiol-17beta regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (40), S. 15847–15851. DOI: 10.1073/pnas.0705749104.

Zofková, Ivana; Zajícková, Katerina; Hill, Martin; Horínek, Ales (2002): Apolipoprotein E gene determines serum testosterone and dehydroepiandrosterone levels in postmenopausal women. In: *European journal of endocrinology* 147 (4), S. 503–506. DOI: 10.1530/eje.0.1470503.

4 Thesen

1. Mit zunehmendem Reproduktionsalter verändern sich der mütterliche Stoffwechsel und die intrauterinen Entwicklungsbedingungen des Embryos. Dies führt zum Verlust von Embryonen in der Präimplantationsphase.
2. Verminderte Serumkonzentrationen an Insulin und IGF1 werden in reproduktionsalten Kaninchen durch parakrine Sekretion von IGF1 im Endometrium kompensiert und ziehen eine Regulation nachgeschalteter Signalwege nach sich.
3. In Blastozyten alter Kaninchen sind das embryonale IIRS und nachfolgende Signalwege an die veränderte para- und endokrine Versorgung mit IGFs und Insulin angepasst.
4. Fortpflanzungsfähige, 2 bis 3 Jahre alte Kaninchen weisen i.R. keine Dyslipidämie auf, zeigen jedoch mäßige Anzeichen einer Stoffwechselalterung.
5. In Reproduktionsorganen und Blastozysten alter Kaninchen erfolgt eine Anpassung des Fettsäure- und Cholesterinstoffwechsels, um eine optimale Versorgung der Embryonen und eine ausreichende Energieversorgung zu gewährleisten.
6. Der Schutz vor Akkumulation von AGEs und Dicarbonylen ist im Endometrium und Embryoblasten reproduktionsalter Kaninchen reduziert.
7. Hyperlipidämie führt bei ApoE-Knockout-Kaninchen zu veränderten maternalen Expressionsmustern des Lipidstoffwechsels und des zellulären Stresssystems, sowie zu einer insgesamt verringerten Fruchtbarkeit.

Publikationen

- Trohl, Juliane*; Schindler, Maria*; Buske, Maximilian; Nivelle, Johanna de; Toto Nienguesso, Alicia; Navarrete Santos, Anne (2023): Advanced maternal age leads to changes within the insulin/IGF system and lipid metabolism in the reproductive tract and preimplantation embryo: insights from the rabbit model.

* beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen. Dr. Maria Schindler ist mit der Veröffentlichung innerhalb dieser Dissertationsschrift einverstanden

(Ausführung und Analyse von Untersuchungen, Schreiben – Originalentwurf)

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags vom 19.03.2025

- Nivelle, Johanna de; Thoma, Juliane; Toto Nienguesso, Alicia; Seeling, Tom; Jung, Juliane-Susanne; Navarrete Santos, Anne; Schindler, Maria (2020): Rabbit as an Aging Model in Reproduction: Advanced Maternal Age Alters GLO1 Expression in the Endometrium at the Time of Implantation.

(Durchführung und Analyse von Untersuchungen, Schreiben – Überprüfung und Überarbeitung)

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags vom 17.10.2024

- Buske, Maximilian; Schindler, Maria; Trohl, Juliane; Nivelle, Johanna de; Jung, Juliane-Susanne; Halbauer, Elisabeth; Toto Nienguesso, Alicia; Zech, Kristin ;Ritsch, Andreas; Navarrete Santos, Anne (in preparation): ApoE deficiency effects maternal metabolism and female fertility in early pregnancy: lessons from the ApoE knock out rabbit

(Durchführung und Analyse von Untersuchungen, Schreiben – Überprüfung und Überarbeitung)

Advanced maternal age leads to changes within the insulin/IGF system and lipid metabolism in the reproductive tract and preimplantation embryo: insights from the rabbit model

Juliane Trohl[†], Maria Schindler ^{*,†}, Maximilian Buske, Johanna de Nivelle, Alicia Toto Nienguesso, and Anne Navarrete Santos

Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Faculty of Medicine, Halle (Saale), Germany

*Correspondence address. Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Faculty of Medicine, Grosse Steinstrasse 52, D-06097 Halle (Saale), Germany. Tel: +49-345-5571725; Fax: +49-345-5571700; E-mail: maria.schindler@medizin.uni-halle.de  <https://orcid.org/0000-0002-2151-767X>

[†]These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Reproductive potential in women declines with age. The impact of ageing on embryo–maternal interactions is still unclear. Rabbits were used as a reproductive model to investigate maternal age-related alterations in reproductive organs and embryos on Day 6 of pregnancy. Blood, ovaries, endometrium, and blastocysts from young (16–20 weeks) and advanced maternal age phase (>108 weeks, old) rabbits were analysed at the mRNA and protein levels to investigate the insulin-like growth factor (IGF) system, lipid metabolism, and stress defence system. Older rabbits had lower numbers of embryos at Day 6 of pregnancy. Plasma insulin and IGF levels were reduced, which was accompanied by paracrine regulation of IGFs and their receptors in ovaries and endometrium. Embryos adapted to hormonal changes as indicated by reduced embryonic IGF1 and 2 levels. Aged reproductive organs increased energy generation from the degradation of fatty acids, leading to higher oxidative stress. Stress markers, including catalase, superoxide dismutase 2, and receptor for advanced glycation end products were elevated in ovaries and endometrium from aged rabbits. Embryonic fatty acid uptake and β -oxidation were increased in both embryonic compartments (embryoblast and trophoblast) in old rabbits, associated with minor changes in the oxidative and glycolytic stress defence systems. In summary, the insulin/IGF system, lipid metabolism, and stress defence were dysregulated in reproductive tissues of older rabbits, which is consistent with changes in embryonic metabolism and stress defence. These data highlight the crucial influence of maternal age on uterine adaptability and embryo development.

Keywords: advanced maternal age / preimplantation embryo / stress defence / insulin IGF system / lipid metabolism

Introduction

Delayed childbearing has a major impact on human reproduction, either naturally or assisted, since it is highly dependent upon the maternal age at which women attempt to conceive (Mills *et al.*, 2011). The main reasons for age-related infertility include reduced ovarian reserve, decreased oocyte quality, and the developmental competence of the embryo due to harmful alterations during ageing. Advanced maternal age is a risk factor for female infertility, pregnancy loss, foetal anomalies, stillbirth, and obstetric complications and is obstetrically defined as maternal age of 35 years or greater at the time of delivery (Cimadomo *et al.*, 2018).

Over the past 50 years, especially among high-income countries, women are delaying childbearing for various reasons such as pursuing educational and career goals (Simoni *et al.*, 2017). In Germany, the average age for having a child has increased from 28.8 years in 2000 to 31.2 years in 2019 and 5.4% of women giving birth were aged 40 or older (Eurostat (Hg.), 2023; Eurostat, OECD Family Database, 2022). As a result, reproductive medicine specialists are treating more patients with age-related infertility and recurrent pregnancy loss (Goossens *et al.*, 2009). In ART, maternal

age is the strongest predictor of successful IVF treatment (Leridon, 2004; Nelson *et al.*, 2013).

Molecular and biochemical mechanisms involved in age-related infertility and their impact on oocyte and embryo quality are still not completely understood. Most research has focused on oocyte morphology and competence, but the older age of women also implies compromised oocyte/embryo developmental competence due to altered physiological pathways such as intracellular metabolism, meiotic mis-segregation, as well as epigenetic and cell cycle regulation (Santonocito *et al.*, 2013; Capalbo *et al.*, 2017). In addition, the establishment of a successful pregnancy depends on the physiological condition of the mother and continuous signalling between the developing embryo and the mother.

Embryo development is greatly influenced by the maternal environment (Fleming *et al.*, 2018). The insulin/insulin-like growth factor (IGF) system plays a pivotal role in embryo–maternal crosstalk through maternal insulin/IGF regulation of embryonic metabolism, cell proliferation, and differentiation (Kaye *et al.*, 1992; Thieme *et al.*, 2012b; Sekulovski *et al.*, 2021). In mammals, insulin must be provided by the mother since the

preimplantation embryo does not produce it (Heyner et al., 1989; Ramin et al., 2010). In humans and rabbits, the embryo and reproductive tissues produce insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1 and IGF2) (Lighten et al., 1997; Thieme et al., 2012b). The paracrine production of IGFs and the expression of their receptors are highly adaptable to maintain proper early embryonic development (Thieme et al., 2012a; Schindler et al., 2013).

Even though developing embryos have the capacity and plasticity to deal with nutritional and hormonal imbalances posed by stressors from the maternal environment, there is often a trade-off to the overall fitness of these embryos later in life (Goyal et al., 2019). For maternal ageing, these stressors include a global decrease in expression of the blastocyst transcriptome (Kawai et al., 2018; McCallie et al., 2019) and impaired mitochondrial DNA kinetics (Bentov et al., 2011; May-Panloup et al., 2019). In mares, advanced maternal age is associated with lower amounts of free fatty acids and reduced metabolic activity in oocytes and 2-day-old embryos indicating an overall impaired metabolism (Catandi et al., 2021).

Independently of the cause, changes in metabolism leads to altered levels of glycation agents, advanced glycation end products (AGE), and reactive oxygen species (ROS). Accumulation of AGE and glycation compounds induces an oxidative stress response in association with an impairment of antioxidant enzymatic defences during reproductive ageing (Tatone et al., 2008). Antioxidant and antiglycative defence enzymes are present in the mammalian embryo and oocytes (El Mouatassim et al., 1999; Carbone et al., 2003). In aged females, alteration of activity and expression of antioxidant enzymes have been shown in follicular fluid and granulosa cells (Carbone et al., 2003; Tatone et al., 2006).

The rabbit offers numerous advantages compared to other commonly used laboratory models (reviewed by Fischer et al., 2012). For example, rabbits share many similarities with early human embryo development, gastrulation, and lipid metabolism (Paigen 1995; Fischer et al., 2012). Whereas the role of the insulin/IGF system, intracellular metabolism, and stress defence system in reproductive ageing of the ovary and follicle has been well investigated, its importance in early embryo development and embryo-maternal communication is largely unknown. The aim of the current study was to examine these systems as key modulators of reproductive ageing during early pregnancy using the rabbit as a representative model organism. On Day 6 of pregnancy, reproductive organs and developing embryos were collected from reproductively young (16–20 weeks) and advanced maternal age (>108 weeks) rabbits and analysed for the expression of target genes. The age was chosen according to the developmental competence of rabbit embryos depending on the maternal age (Maurer and Foote, 1971). According to Maurer and Foote, the reproductive decline of female rabbits started at age of 2 years. The time interval between 2 years to 4–6 years can be defined as the advanced maternal age in female rabbits. Additionally, the insulin/IGF system and key mediators of intracellular signal transduction were compared in reproductive tissues and blastocysts of young and old rabbits.

Materials and methods

Animal treatment and recovery of preimplantation embryos and reproductive tissues

The rabbit was used to investigate the impact of advanced maternal age on the insulin/IGF system, signal transduction, metabolism, and stress defence in reproductive organs and embryos.

A total of 50 young (16–20 weeks) and 31 advanced maternal age (>108 weeks, old) sexually mature, female rabbits (New Zealand White, hybrid strain Zika) were acquired from Dr. Zimmermann GbR (Abtsgemünd, Germany). The animals were housed in single cages under the same conditions of controlled temperature (18°C) and artificial light (16:8 h light:dark cycle) with free access to rabbit chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the principals of laboratory animal care and the experimental protocol had been authorized by the local ethics committee (Landesverwaltungsamt Dessau; reference number: 42502-2-812).

Rabbits were mated with two fertile bucks after a 6-week adaptation period in species-appropriate conditions. No hormonal stimulation was applied. At Day 6 post coitum (p.c.), after a 12-h fasting period, blood samples were collected and then rabbits were euthanized by a lethal dose of sodium pentobarbital (Merial, Derendingen, Germany). The blood was taken using the standard venepuncture of the vena auricularis. Blood samples were collected in EDTA tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and processed by centrifugation (112×g, 20 min) in order to separate plasma. Plasma samples were isolated, aliquoted and stored at –80°C until further use. Reproductive tract organs were prepared. For this purpose, endometrium was mechanically separated from the myometrium. The ovary was obtained as a whole. Samples from ovaries and endometrium were stored at –80°C until protein and RNA isolation. Only pregnant animals at Day 6 were included in this study.

Embryos were flushed from the opening of the fallopian tube towards the cervix with 10 ml warm phosphate-buffered saline (PBS). Afterwards they were washed twice in ice-cold PBS. Using a stereomicroscope, embryos were characterized morphologically and classified for gastrulation stages. Blastocysts at pre-gastrulating stage 1 were used and prepared (summarized by Fischer et al., 2012) for analyses. Embryonic coverings were mechanically removed and blastocysts were microdissected to harvest embryoblasts (EBs) and trophoblasts (TBs) under a stereomicroscope.

RNA analyses were performed using single embryos. For protein analyses, EBs and TBs were pooled in groups of 8–10 for one protein sample. Samples were stored at –80°C until use in PBS buffer for RNA isolation and radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer for protein isolation.

RNA isolation and cDNA synthesis

For embryonic samples, mRNA was extracted using Dynabeads™ Oligo(dT)₂₅ (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). Isolated mRNA was subsequently used for complementary DNA (cDNA) synthesis. All protocol procedures were carried out according to the manufacturer's instructions with previously described modifications by Tonack et al. (2004). Whole mRNA samples were transcribed into cDNA using RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μl) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) in a thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) as follows: 10 min at 25°C, 1 h at 42°C, and 10 min at 70°C. Sterile water was added to the samples to a final volume of 120 μl.

RNA extraction from ovarian and endometrial tissue was performed using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) according to the protocol published by Navarrete Santos et al. (2000). RNA quantity and quality were checked spectrophotometrically at 260 and 280 nm. Seven μg of RNA was treated with 4 U DNase I (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) for 30 min at 37°C. To verify the absence of DNA, 1 μl of RNA was amplified with 0.6 U of Crimson Taq™ DNA Polymerase (New England

Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) and primers for GAPDH (Supplementary Table S1) for 40 cycles (94°C for 45 s, 60°C for 45 s, and 72°C for 60 s). PCR products were evaluated by electrophoresis on 1.8% agarose gels and stained with ethidium bromide. Three µg of RNA were transcribed into cDNA with the RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl) as described above. Sterile water was added for a final cDNA reaction volume of 150 µl.

Measurement of mRNA levels by quantitative PCR

Amplification- and quantification-specific forward and reverse primers were designed based on rabbit gene sequences using the Primer-BLAST online tool (NIH, Bethesda, MD, USA; Supplementary Table S1). PCR products were sequenced and checked for specificity as described previously (Seeling et al., 2019). Vinculin and GAPDH were quantified as the endogenous controls for EB and TB samples, *vinculin* and β -actin were quantified as the endogenous controls for ovarian samples and *vinculin* as the endogenous control for endometrial samples, respectively. Validation of housekeeping genes were performed in advance by analysing the threshold cycles (ct) value of *vinculin*, GAPDH and β -actin in the ovary, endometrium, and EB and TB. Depending on the tissue, either one reference gene or the geometric mean from two genes were used as the housekeeping reference. Quantitative PCR (qPCR) analyses were performed in duplicate using the Quant Studio 3™ Real Time System (Thermo Fisher, Dreieich, Germany) as previously described (de Nivelle et al., 2020). qPCR reactions were performed using 3 µl of cDNA and 17 µl Master Mix (PowerTrack™ SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher, Dreieich, Germany) and with a 'no template control' for each primer set (Supplementary Table S1). For quantification, target and housekeeping calibration curves were included from serial dilutions (10^7 – 10^3 copies) of gene-specific DNA plasmid standards. A comparative method ($\Delta\Delta CT$) was used to quantify mRNA abundance (Livak and Schmittgen 2001). Target gene expression was normalized in each sample to the geometric mean of the endogenous controls. Target gene expression is described relative to the mean of the young group.

Protein preparation

Protein isolation of tissue samples and pooled blastocysts was performed as described in Pendzialek et al. (2017). In brief, tissues were homogenized in ice-cold RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Reproductive tissues were homogenized in 1 ml of RIPA buffer, and EB in 5 µl and TB in 20 µl of RIPA buffer per embryo. For isolation of nuclear protein fractions, the residual pellet was solubilized in resuspension buffer (RSB; 1 M Tris (pH 6.8), glycerine, 1× TBS, mercaptoethanol, 10% SDS) with 0.5 µl per EB, 1.2 µl per TB, and 500 µl per tissue sample. For EB and TB samples, RIPA buffer was added (2 µl per EB or 5.8 µl per TB). For the isolation of nuclear protein, samples were indirectly sonicated five times for a 7 min period of 30 s of ultrasound at 103 W (SONOPULS HD 3200, Bandelin, Berlin, Germany) and an intermediate incubation on ice for 30 s. The suspension was centrifuged at $13\,226\times g$ for 10 min at 4°C. Concentration of tissue protein was determined using the Pierce™ 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Immunoblotting

For western blot analysis, 25 µl of sample containing 25 µg of protein lysate for reproductive tissues, 20 µg for EBs, and 45 µg for

TBs, was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10–12% gradient gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Cytiva, Freiburg, Germany). Nuclear protein from blastocysts was separated on 10–15% gradient gels for SDS-PAGE. Membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (0.1% TBST) and 3% (wt/vol) non-fat dry milk or in bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at room temperature for at least 1 h and incubated at 4°C overnight with primary antibody. After washing, membranes were incubated with secondary antibody (anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) or anti-rabbit IgG conjugated to HRP). Supplementary Table S2 describes the antibodies that were used and a detailed description of the assay is provided in Supplementary Table S2. Immunoreactive signals were visualized by enhanced chemiluminescence detection and quantified by ChemiDoc™ Touch System and Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Relative protein abundance was calculated as the ratio of the band intensity of the target protein to the band intensity of vinculin in the same blot to correct for differences in protein loading.

Simple Western™ analysis

The Sally Sue™ Simple Western method was used for protein analysis of glyoxalase 1 (GLO1) and heat shock protein 70 (HSP70) in ovary and endometrium and additionally for superoxide dismutase (SOD2) and mitochondrial transcription factor A (mtTFA) in EBs and TBs and was carried out in accordance with the manufacturer's instructions. This method enables automated size-based separation of protein samples with subsequent immunoblotting within provided capillaries (de Nivelle et al., 2020). Antibodies are described in Supplementary Table S3 and a description of the assay protocol is provided in Supplementary Figs S1 and S2. Compass software (Compass for SW 6.2.0, ProteinSimple Biotechnie, San Jose, CA, USA) was used to process and analyse data results. Protein abundance was calculated as the ratio of the area under the curve (AUC) of the target protein relative to the AUC of vinculin in the same run to correct for differences in protein loading.

ELISA

Plasma insulin and IGF1 concentrations were measured by ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany and Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. Insulin and IGF1 concentrations were quantified in duplicate and compared with an internal insulin standard (6.25–100.0 µIU/ml) and IGF1 standard (0.063–4.0 ng/ml), respectively. For IGF1 measurements, EDTA-plasma samples required a 100-fold dilution due to high endogenous levels of protein.

Statistics

Statistical analyses were performed with OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Wellesley, MA, USA). The level of significance between groups was calculated with a two-tailed Student's t-test after testing for outliers and proving normal distribution. If normal distribution failed, the Mann-Whitney U test was used. Results are shown as box plots with white boxes representing samples of old rabbits and grey boxes representing the young controls. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm 1.5\times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. (N) represents the number of individual and independent experiments from which the embryonic and tissue

samples were covered and (n) the number of samples used per measurement per group.

Results

IGF1 and insulin concentrations in plasma

At Day 6 p.c., insulin and IGF1 plasma levels were reduced in advanced maternal age (old) rabbits compared to young controls (median values changed from 44.3 to 30.2 pM and from 20.3 to 16.7 nM, respectively) (Fig. 1).

Ovarian alterations in gene and protein expression

In the ovary of advanced maternal age rabbits, relative mRNA expression of IGF2 was significantly decreased, whereas IGF1, IGF1 receptor (IGF1R), and insulin receptor (*InsR*) were not altered (Fig. 2A). Furthermore, relative protein abundance of extracellular-signal regulated kinase 2 (ERK2), protein kinase B (Akt), and cAMP-responsive element binding protein (CREB), which are important for insulin and IGF signalling, were reduced (Fig. 2B).

Lipoprotein receptor mRNA expression for very low-density lipoprotein receptor (VLDLR) and low-density lipoprotein receptor (LDLR) did not change (Fig. 2C), whereas target protein levels for fatty acid synthesis, fatty acid synthase (FASN), and phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (pACC), were lower and the key enzyme of β -oxidation, carnitine palmitoyltransferase I B (CPT1B), was increased in older rabbits (Fig. 2D). Lower protein abundance of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) was also observed (Fig. 2D). Impaired fatty acid synthesis and elevated fatty acid degradation was in concert with up-regulation of SOD2 and catalase (CAT) (Fig. 2E), indicative of a disturbed stress response in advanced maternal age rabbits.

Endometrial alterations in gene and protein expression

IGF1, IGF1R, and IGF2 receptor (IGF2R) mRNA expression was increased in the endometrium of advanced maternal age rabbits, whereas IGF2 and *InsR* levels were unchanged (Fig. 3A). Relative protein abundance of Akt and CREB was lower, indicating less activation of IGF signalling. HMG-CoA reductase (HMGCR), the key enzyme for cholesterol biosynthesis, and the lipoprotein receptor VLDLR were increased in the endometrium of old rabbits (Fig. 3B).

Furthermore, CPT1B, as well as fatty acid binding and transport proteins FABP4 and CD36, were more highly expressed (Fig. 3C), while FASN and PPAR α protein levels were decreased (Fig. 3D). Aside from an increase in receptor for advanced glycation end products (RAGE) protein abundance (Fig. 3F), no significant changes of stress markers were observed in the endometrium of reproductively old rabbits (Fig. 3F).

Preimplantation embryo production and blastocyst size

The total number of corpora lutea and flushed preimplantation blastocysts per female was not significantly lower in older rabbits compared to young controls (Fig. 4A). However, the difference between numbers of corpora lutea and blastocysts was greater in advanced maternal age than in young rabbits, indicating that either fewer oocytes were fertilized or early stages of development had not survived until Day 6 of pregnancy (Whitney-Rank-Sum test: $z = -2.55$, $P = 0.011$; Fig. 4B). Furthermore, Day 6 blastocysts from old dams were significantly larger in diameter compared to blastocysts from young rabbits (young: 3.56 ± 0.09 mm vs old: 3.87 ± 0.13 mm; Fig. 4C).

Blastocyst expression of key factors in development and signal transduction

In both compartments, embryonic mRNA expression of IGF1 and IGF2 were significantly down-regulated in old rabbits, whereas IGF1R and *InsR* were unchanged (Fig. 5A and B).

Insulin and IGF1 can activate intracellular signalling pathways such as Akt (PI3K-Akt-signaling pathway), ERK 1/2 (MAPK/ERK pathway), and AMP-activated protein kinase (AMPK) by phosphorylation (Saltiel and Kahn, 2001). Phosphorylation of ERK 1 and 2 was increased in EB and TB from older rabbits along with total protein abundance (Fig. 5C and E). In TB from advanced maternal age rabbits, phosphorylation of Akt and AMPK was diminished, while relative total protein amount was increased for Akt and unchanged for AMPK (Fig. 5D and F). Protein abundance was too low to accurately quantify AMPK protein levels and Akt phosphorylation. In advanced maternal age rabbits, Akt protein level and phosphorylated AMPK were elevated in the EB compared to young controls.

In embryos, insulin and IGF1 have been shown to activate transcription factor CREB by phosphorylation and induce nuclear translocation (Schindler et al., 2013). In the present study, phosphorylation of CREB was relatively increased in nuclear extracts

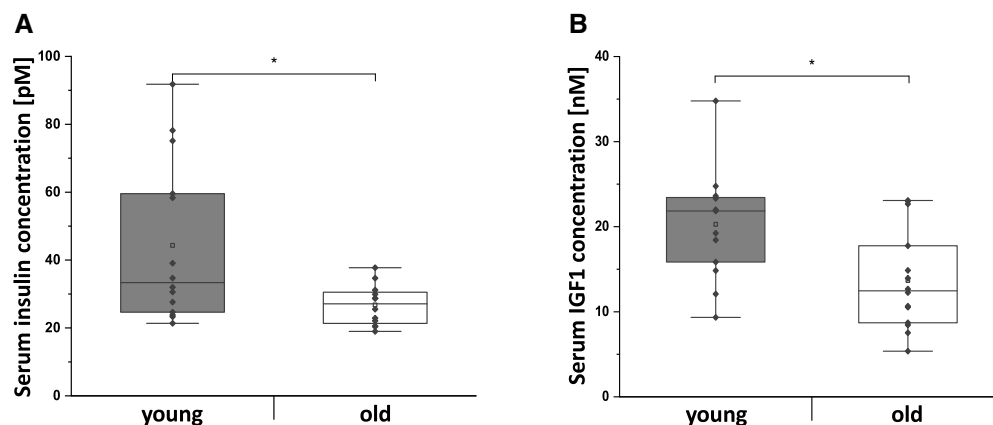


Figure 1. Insulin and insulin-like growth factor 1 concentration in blood of young and old rabbits at day 6 of pregnancy. Insulin (A) and IGF1 (B) concentrations were measured by ELISA in EDTA-plasma samples. Results are shown as box plots in grey and white for young and reproductively old rabbits, respectively. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm 1.5 \times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $n \geq 12$; * $P < 0.05$. IGF1, insulin-like growth factor 1.

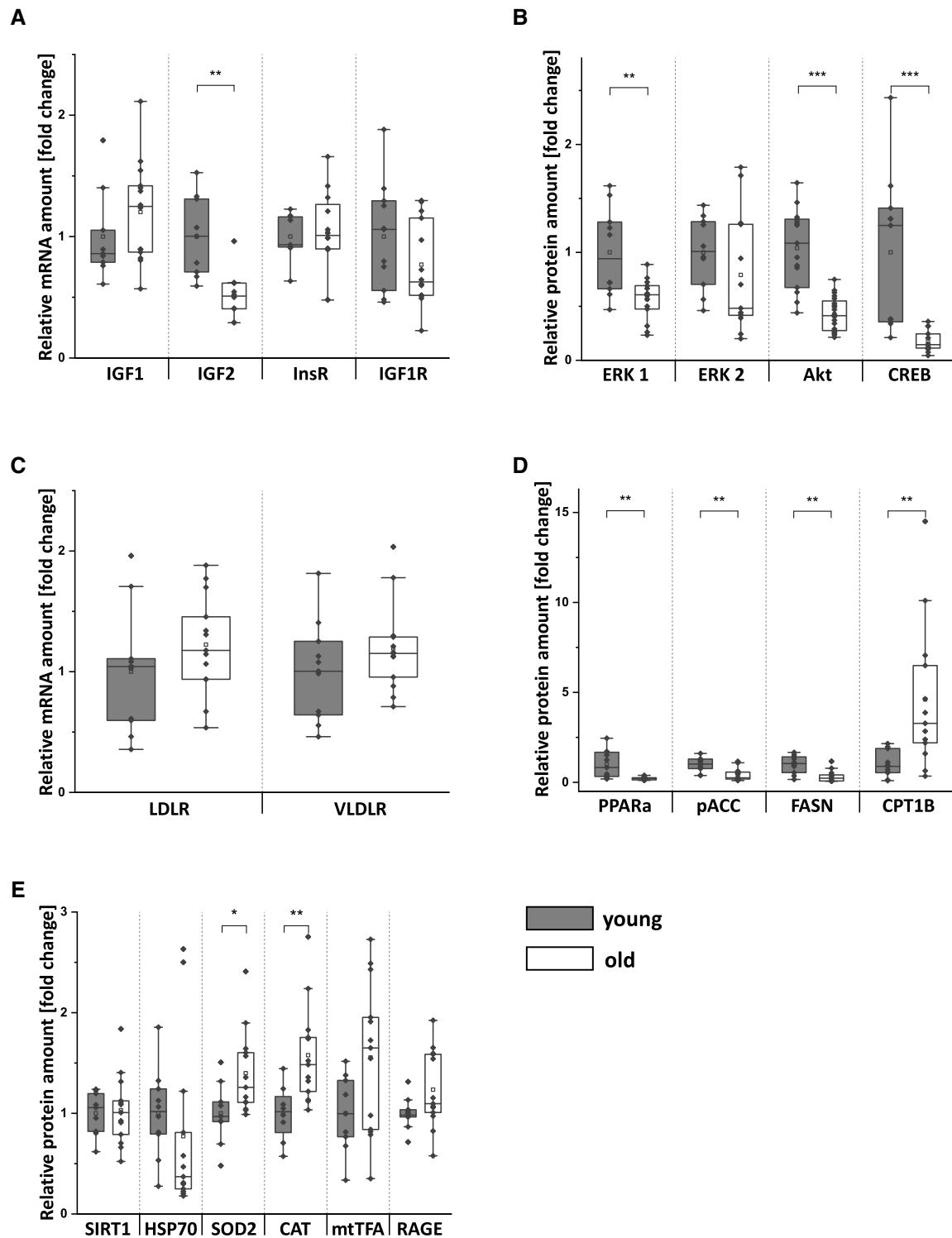


Figure 2. Expression of developmental, metabolic, and stress marker genes in the ovary of young and old rabbits. Relative mRNA expression of (A) developmental marker genes and (C) lipoprotein receptors were quantified by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of *vinculin* and β -*actin*. Relative protein abundance of key factors for (B) signal transduction, (D) metabolic parameters, and (E) stress defence system were measured by western blot or Simple Western. Membranes are shown in [Supplementary Figs S3–S8](#). Protein abundance was normalized to *vinculin* in both experimental approaches. Results are shown in box plots and expressed as fold change relative to young rabbits (set to 1). Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm$ 1.5 $\times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. $n \geq 13$ for mRNA analyses; $n \geq 9$ for protein analyses; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Akt, protein kinase B; CAT, catalase; CPT1B, carnitine palmitoyltransferase I B; CREB, cAMP-responsive element binding protein; ERK, extracellular-signal regulated kinase 1 and 2; FASN, fatty acid synthase; HSP70, heat shock protein 70; IGF, insulin-like growth factor 1 and 2; IGF1R, IGF1 receptor; InsR, insulin receptor; LDLR, low-density lipoprotein receptor; mtTFA, mitochondrial transcription factor A; pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; RAGE, receptor for advanced glycation end products; SIRT1, sirtuin 1; SOD2, superoxide dismutase 2; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

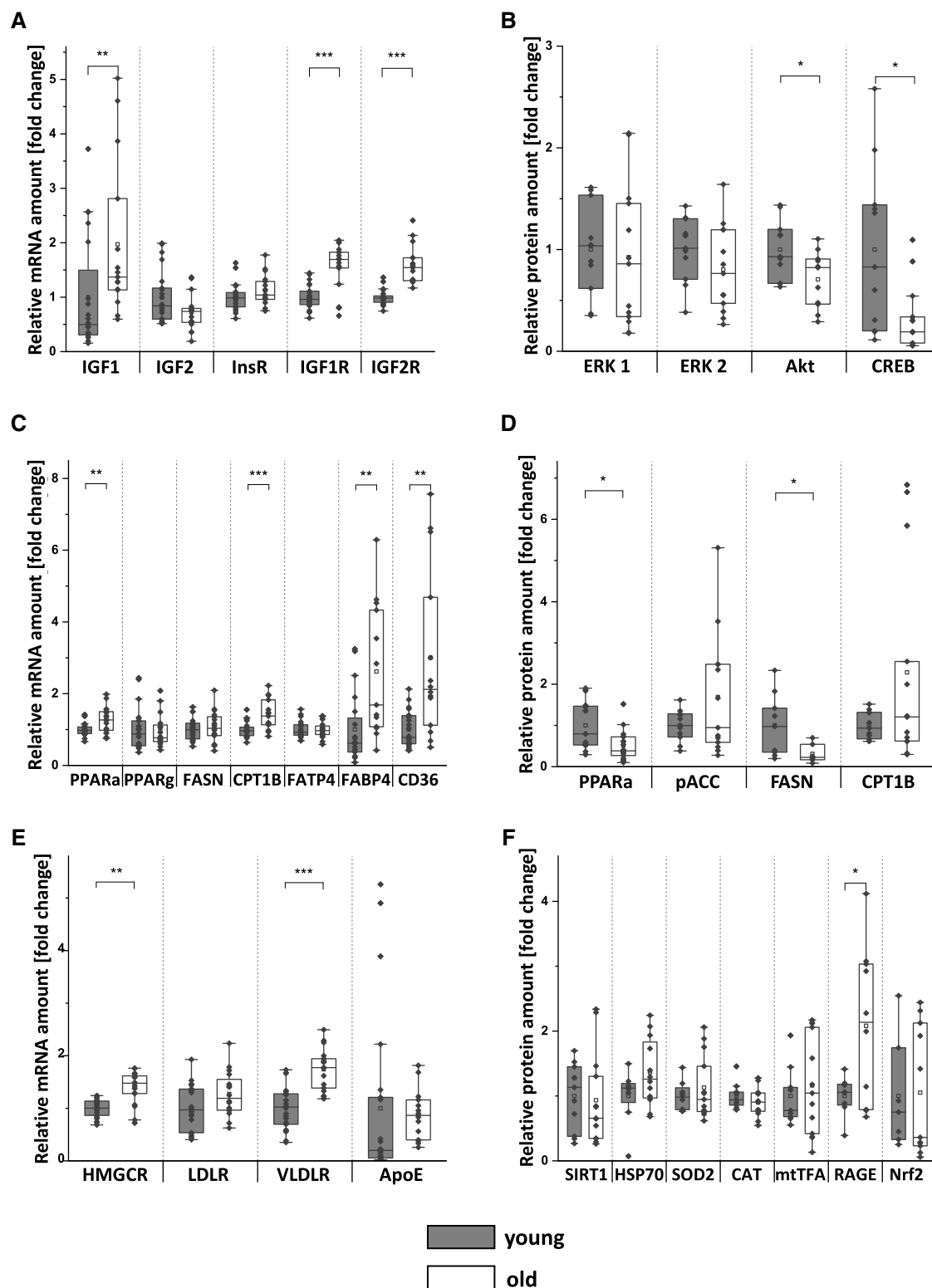


Figure 3. Relative levels of developmental, metabolic, and stress markers in the endometrium of young and old rabbits. Expression of (A) developmental, (C) metabolic, and (E) lipoprotein receptor genes were quantified by RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *vinculin*. Protein abundance of key factors for (B) signal transduction, (D) lipid metabolism, and (F) stress defence system were quantified by western blot or Simple Western. Membranes are shown in [Supplementary Figs S9–S15](#). Protein abundance was normalized to *vinculin* in both experimental approaches. Results are shown in box plots and expressed as fold change relative to young rabbits (set to 1). Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm 1.5 \times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. $n \geq 13$ for mRNA analyses; $n \geq 8$ for protein analyses; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Akt, protein kinase B; ApoE, apolipoprotein E; CAT, catalase; CPT1B, carnitine palmitoyltransferase I B; CREB, cAMP-responsive element binding protein; ERK, extracellular-signal regulated kinase 1 and 2; FASN, fatty acid synthase; HMGCR, HMG-CoA reductase; HSP70, heat shock protein 70; IGF, insulin-like growth factor 1 and 2; IGF1R, IGF1 receptor; InsR, insulin receptor; LDLR, low-density lipoprotein receptor; mtTFA, mitochondrial transcription factor A; pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase; PPARα, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; RAGE, receptor for advanced glycation end products; SIRT1, sirtuin 1; SOD2, superoxide dismutase 2; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

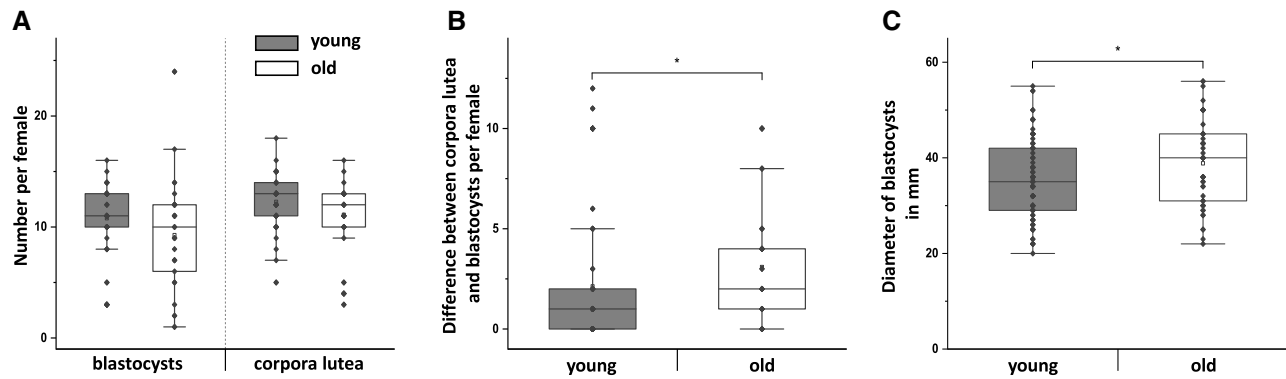


Figure 4. Quantity and diameter of embryos in young and old rabbits at day 6 post coitus. (A) Number of preimplantation blastocysts and *corpora lutea* per female were counted in young and old rabbits. The difference between *corpora lutea* and blastocysts, as an indicator of early embryo loss, per female is shown in (B). (C) Size of blastocysts grown in young and old rabbits were measured with a stereomicroscope. All results are shown as box plots with white boxes representing samples of old rabbits and grey boxes representing the young controls. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm 1.5 \times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $p < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. $n \geq 31$; * $P < 0.05$.

from embryos of old rabbits but statistical significance was only reached in EBs (Fig. 5C and D). Nuclear CREB levels were reduced in EB and TB (Fig. 5E and F).

Blastocyst expression of key metabolic factors

In old rabbits, relative expression of key enzymes regulating fatty acid transport (CD36 and FATP4), binding (FABP4), and β -oxidation (CPT1B) were increased at the mRNA level in EB and TB (Fig. 6A and B). Elevated CPT1B was also observed at the protein level in TBs from advanced maternal age rabbits (Fig. 6D). Protein abundance was too low to quantify CPT1B in EBs.

PPAR α and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) are transcription factors that are important for regulation of intracellular lipid metabolism. In TB, PPAR γ was relatively lower at the mRNA and protein levels in older rabbits whereas in EB, PPAR γ levels were not different (Fig. 6B and D). For PPAR α , mRNA levels were relatively lower and protein abundance was higher in EBs from advanced maternal age rabbits (Fig. 6A and C).

Concerning biomarkers for cholesterol metabolism, *apolipoprotein E* (ApoE) mRNA levels decreased in EBs and VLDLR expression was elevated in TBs of older rabbits (Fig. 6E and F).

Blastocyst expression of key stress defence factors

Only a few of the assayed biomarkers for stress response were altered in EBs and TBs of advanced maternal age rabbits (Fig. 7). In EBs, *GLO1*, the key enzyme for dicarbonyl stress, was reduced. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*) mRNA expression was reduced in TB, but not at the protein level. Lastly, protein abundance of the *Nrf2* target SOD2 was significantly reduced in TB.

Discussion

The negative impact of maternal age on reproductive outcome is most commonly associated with exponentially reduced ovarian reserve and decreased oocyte quality. Much less appreciated is the diminished developmental competence of the embryo due to harmful alterations during ageing and overall changes in maternal metabolism. This study demonstrates age-related changes in maternal lipid metabolism and endocrine regulation, which in turn influence reproductive tissues in an organ-specific manner. These changes can affect the intrauterine environment and embryo-maternal communication, and can lead in turn to a higher

embryo loss during the very first days of pregnancy. We observed a bigger difference between *corpora lutea* and amount of blastocysts, indicating that in old rabbits, either fewer oocytes were fertilized or early stages of development had not survived until Day 6 of pregnancy. Increased embryo loss and reduced embryo developmental competence during the peri-implantation period have also been reported in reproductively old rats, mice, and humans (Gosden, 1975, 1985; Morton et al., 2017; Warshaviak et al., 2019). However, these studies focused on vascular dysfunction, impaired decidual reaction, and reduced uterine prostaglandin synthesis as reasons for increased embryo loss during the peri-implantation period. Age-related changes may affect the ability of the blastocyst to attach to the uterine wall and invade into the decidua, which may be the pivotal factors for the observed changes in placental morphological development and nutrient transport function (Napso et al., 2019).

Advanced maternal age is associated with metabolic and hormonal changes indicated by a higher prevalence of gestational diabetes mellitus in women over the age of 35 years (Kahveci et al., 2018; Li et al., 2020) and blunted hormonal responsiveness of the ageing uterus (Woods et al., 2017). The insulin/IGF system is a major player in embryo-maternal communication, especially during the preimplantation period (Schultz et al., 1993). Moreover, IGF1 and insulin signalling are arguably the most studied set of pathways linking cellular metabolism and pace of ageing (Vitale et al., 2019). In reproductively old gravid rabbits, plasma insulin and IGF1 concentrations were reduced, which is consistent with observations in humans that also show lower IGF1 levels with advanced maternal age (Yovich et al., 2020; Gleicher et al., 2022). Decreased IGF1 concentrations are in line with lower growth hormone (GH) serum concentrations, indicating a central down-regulation of the somatotrophic axis during ageing (Barzilai et al., 2012). However, the IGF1 mRNA amount was increased in the endometrium of old gravid rabbits. The up-regulation of the IGF1 mRNA level could be due to a compensatory, paracrine up-regulation to counteract the lack of insulin and IGF1 in plasma. It would be interesting to know if the amount of IGF1 in the uterine luminal fluid is also increased. However, the amount of uterine luminal fluid that we could collect and the sensitivity of commercially available ELISA kits was too low to measure the IGF1 in the uterine luminal fluid. Since IGF1 is one of the main factors involved in oestrogen-induced uterine growth and early embryo development, an adaptive response could provide conditions to maintain proper embryo development (Inoue

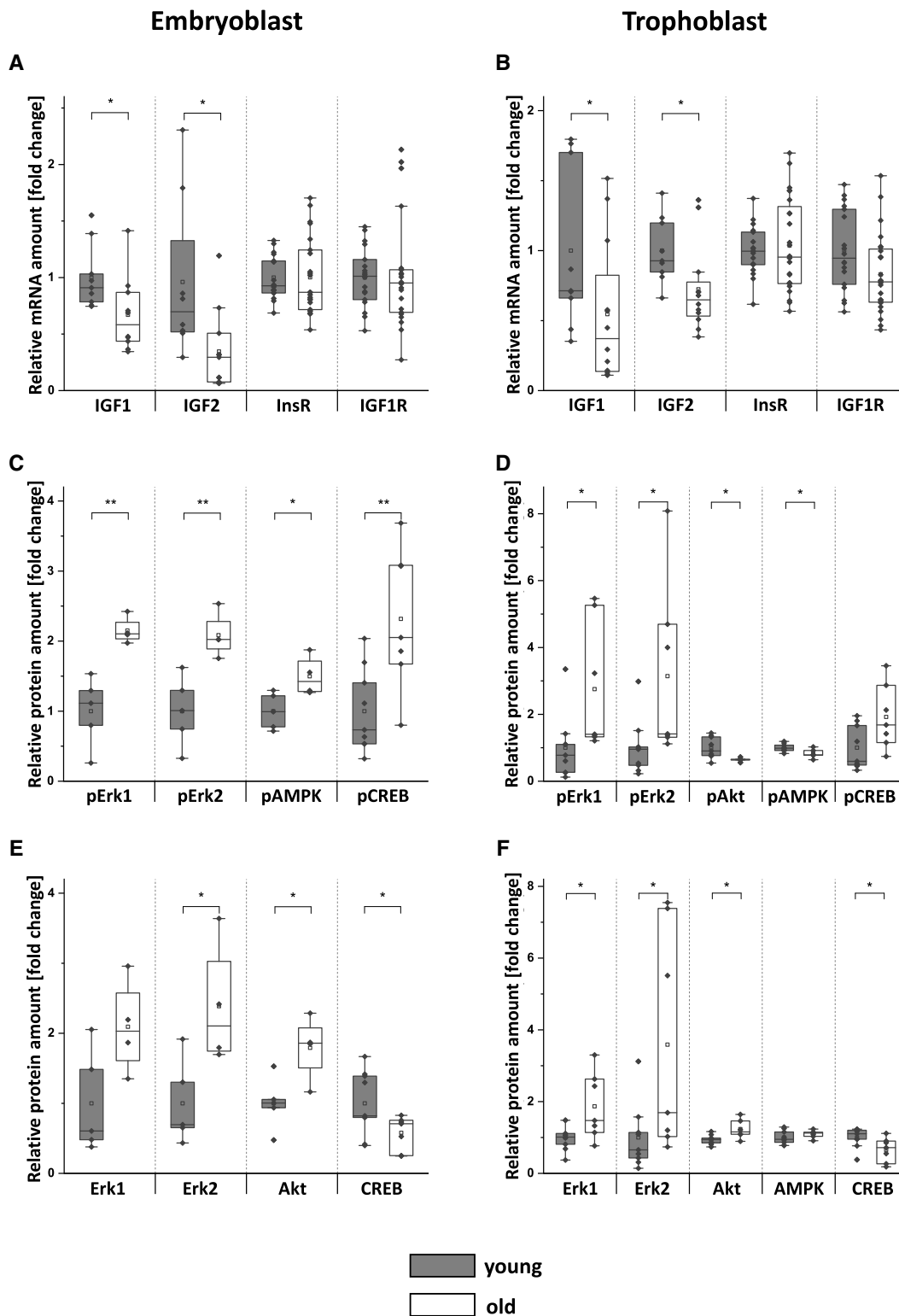


Figure 5. Expression of key developmental and signal transduction biomarkers in embryoblasts and trophoblasts grown in young and old rabbits. mRNA expression was quantified by RT-qPCR for developmental marker genes in embryoblasts (A) and trophoblasts (B). mRNA levels were normalized to the geometric mean of *vinculin* and *GAPDH*. Protein abundance for signal transduction marker genes was quantified by western blot in embryoblasts (C, E) and trophoblasts (D, F). Phosphorylation of ERK1/2, Akt, AMPK, and CREB was normalized to the total protein abundance of ERK1/2, Akt, AMPK, and CREB, respectively (C, E). In embryoblasts, pAMPK was normalized to *vinculin* as AMPK was not detectable. Total protein levels were normalized to *vinculin*. Nuclear CREB protein abundance was normalized to H3 (D, F). Results are shown in box plots and expressed as fold change relative to young rabbits (set to 1). White boxes represent samples of old rabbits and grey boxes represent the young controls. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm$ 1.5 $\times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. Representative western blots are shown in [Supplementary Figs S16 and S17](#). $n \geq 8$ for mRNA analyses; $n = 8-16$ for protein analyses; $N = 5$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (pAkt), phosphorylated protein kinase B; (pAMPK), phosphorylated AMP-activated protein kinase; (pCREB), phosphorylated cAMP-responsive element binding protein; (pERK), phosphorylated extracellular-signal regulated kinase 1 and 2; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H3, histone H3; IGF, insulin-like growth factor 1 and 2; IGF1R, IGF1 receptor; InsR, insulin receptor.

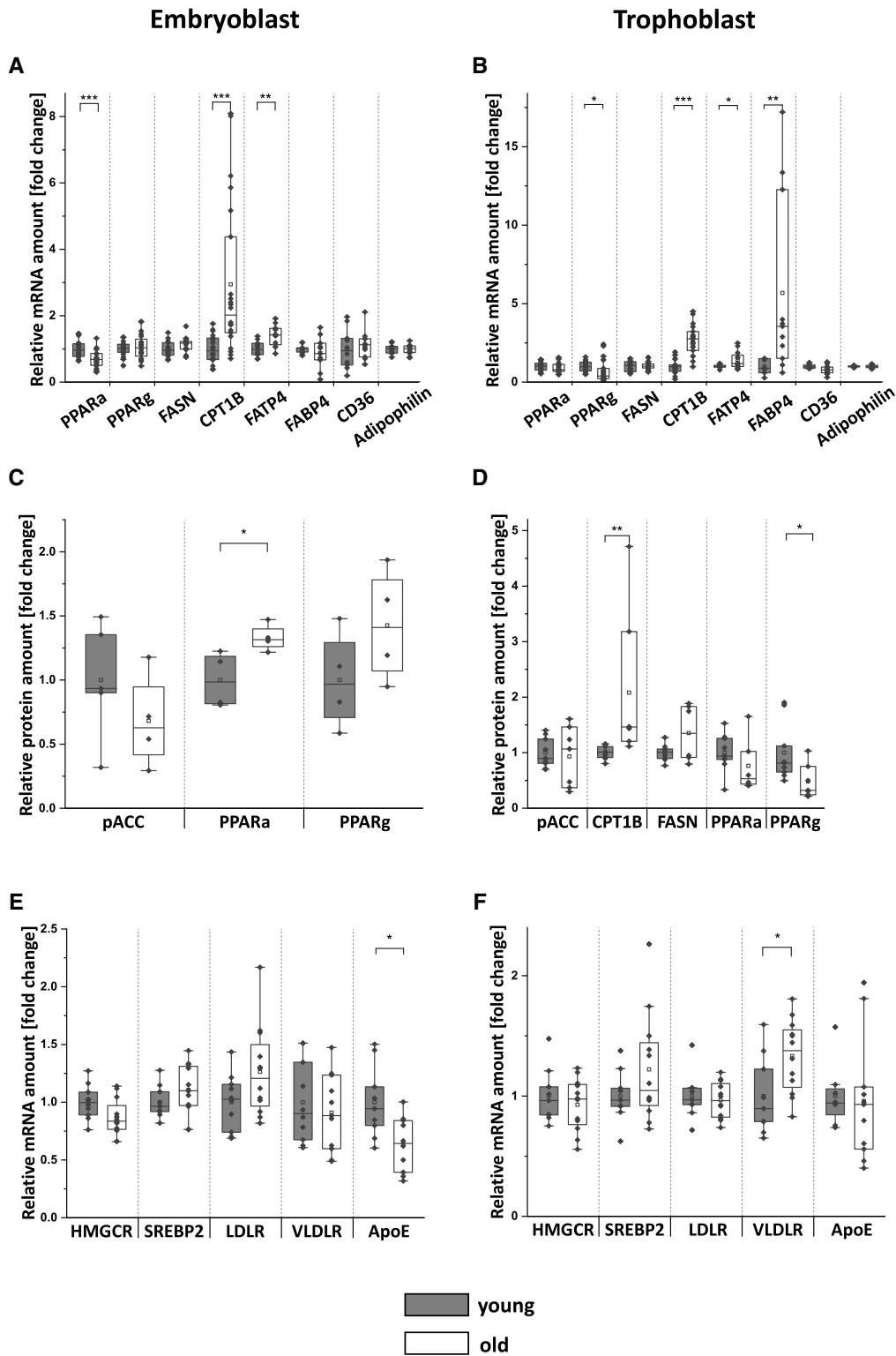


Figure 6. Expression of metabolic marker genes in blastocysts of young and old rabbits. mRNA expression of lipid and cholesterol metabolism markers and lipoprotein receptors were quantified by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of vinculin and GAPDH in single embryoblasts (**A**, **E**) and trophoblasts (**B**, **F**). Relative protein abundance was quantified by western blot and normalized to vinculin. For PPAR α and PPAR γ , nuclear protein abundance was normalized to H3 (**C**, **D**). Results are shown in box plots and expressed as fold change relative to young rabbits (set to 1). White boxes represent samples of old rabbits and grey boxes represent the young controls. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm$ 1.5 $\times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. Western blot membranes are shown in [Supplementary Figs S18 and S19](#). $n \geq 8$ for mRNA analyses; $n = 8-16$ for protein analyses; $N = 5$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. ApoE, apolipoprotein E; CD36, fatty acid translocase/cluster of differentiation 36; CPT1B, carnitine palmitoyltransferase I B; FABP4, fatty acid binding protein 4; FASN, fatty acid synthase; FATP4, fatty acid transport protein 4; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HMGCR, HMG-CoA reductase; LDLR, low-density lipoprotein receptor; pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SREBP2, sterol regulatory element-binding protein 2; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

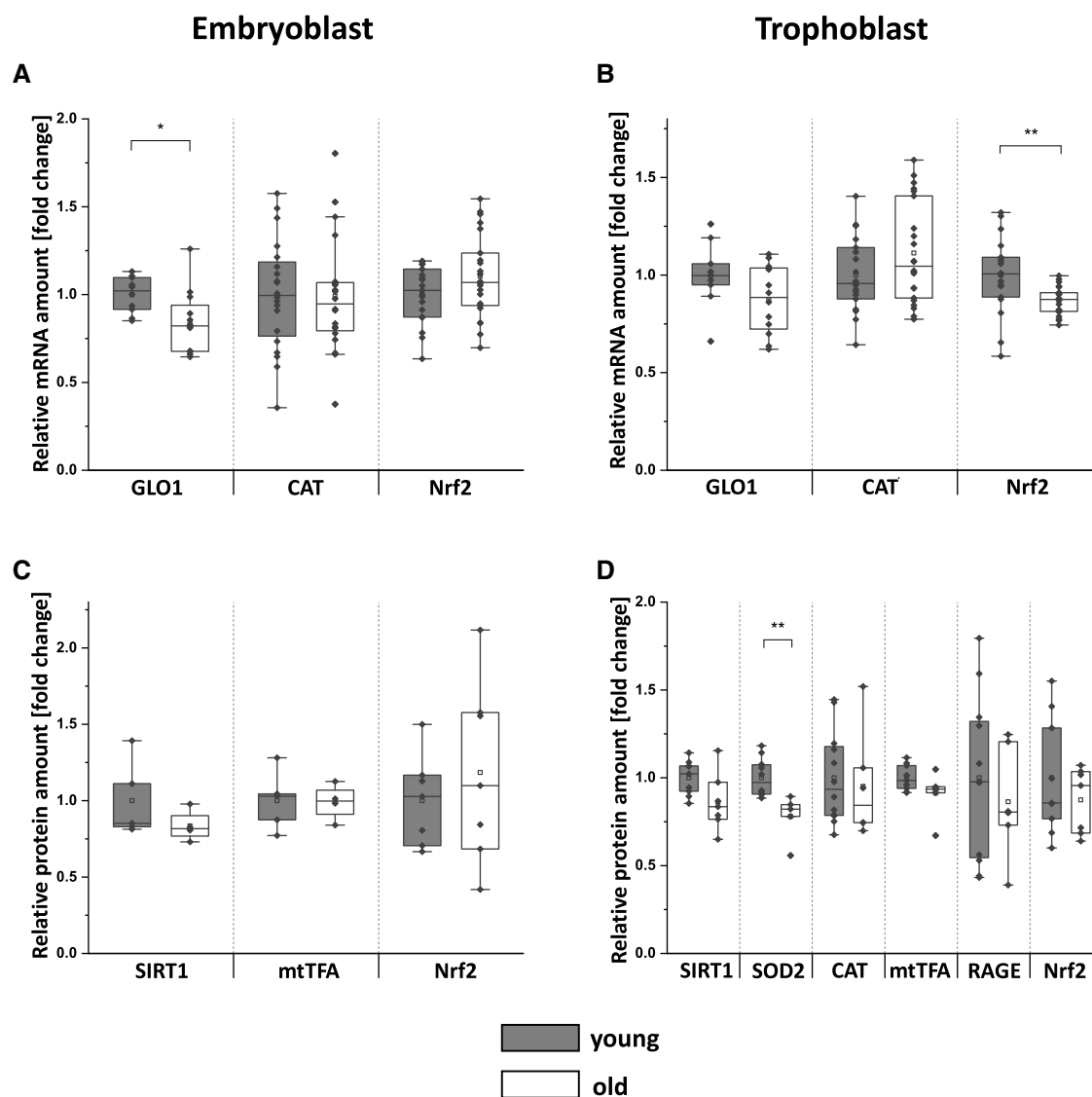


Figure 7. Expression of stress defence genes in blastocysts of young and old rabbits. Target mRNA expression of stress defence markers was quantified by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of *vinculin* and *GAPDH* in embryoblasts and trophoblasts (**A, B**). Protein abundance for lipid metabolism marker genes was quantified by western blot in embryoblasts and trophoblasts and normalized to *vinculin*; nuclear protein abundance was normalized to *H3* (**C, D**). Results are shown in box plots and expressed as fold change relative to young rabbits (set to 1). White boxes represent samples of old rabbits and grey boxes represent the young controls. Median values are shown by a black line, squares represent the mean values, and the box represents quartile 1/quartile 3 $\pm$ 1.5 $\times$ interquartile range indicated by the upper and lower whiskers. $P < 0.05$ was considered statistically significant at an alpha level of 0.05. Western blot membranes are shown in [Supplementary Figs S20–S22](#). $n \geq 8$ for mRNA analyses; $n = 8–16$ for protein analyses; $N = 5$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. CAT, catalase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLO1, glyoxalase 1; H3, histone H3; HSP70, heat shock protein 70; mtTFA, mitochondrial transcription factor A; RAGE, receptor for advanced glycation end products; SIRT1, sirtuin 1; SOD2, superoxide dismutase 2.

et al., 2005; Thieme *et al.*, 2012a,b). Notably, the up-regulation of IGF1 lasts longer than the preimplantation period. For example, IGF1 was elevated in the decidual compartment on Day 11.5 of pregnancy in the placenta of old mice (Woods *et al.*, 2017).

Unlike insulin, the embryo produces IGFs (Ramin *et al.*, 2010); therefore, it was of interest to analyse ligand expression of the IGF system in the developing embryo. IGF1 and IGF2 levels were decreased in both EB and TB from old rabbits, implying lower endogenous synthesis in response to the higher paracrine IGF1 supply from the endometrium. Rabbit blastocysts are able to adapt to autocrine IGFs as demonstrated *in vitro* (Thieme *et al.*, 2012b). In blastocysts from old rabbits, up-regulation of the embryonic IGFs correlates with activation of signal transduction. Phosphorylation of ERK, CREB, and AMPK was elevated in the EB from old rabbits. In TBs, ERK and CREB phosphorylation was

increased as well. Moreover, ERK protein levels were increased in both embryonic compartments. Correlation of embryonic signalling activation with higher IGF1 supply from the endometrium is another example of embryo–maternal communication and embryonic adaptation to the uterine microenvironment. IGFs mediate anti-apoptotic, proliferative, and mitogenic processes (Lighten *et al.*, 1998; Ramin *et al.*, 2010; Thieme *et al.*, 2012b). Blastocysts from old rabbits had a larger diameter which may be related to the increased IGF1 supply from the endometrium. Herrler *et al.* (1998) also observed an increase in rabbit blastocyst diameter following IGF1 stimulation. Taken together, these data suggest that the increased supply of paracrine IGF1 by the endometrium leads to a switch in the embryonic insulin/IGF system resulting in enhanced embryonic growth of embryos as an adaptive response in reproductively old rabbits.

The transcription factor CREB links the insulin/IGF system with intracellular metabolism in preimplantation embryos (Schindler *et al.*, 2013). In EBs and TBs from old rabbits, we observed increased phosphorylation of CREB; however, the total amount of CREB was decreased. Such a feedback mechanism of CREB activation has previously been described in rabbit blastocysts *in vitro* after stimulation with insulin and IGF1, and *in vivo* in diabetic rabbits (Schindler *et al.*, 2013). In reproductively old rabbits, the observed feedback regulation supports the hypothesis that embryonic CREB is tightly regulated by insulin and IGF1 that is supplied by the mother.

CREB modulates lipid metabolism (Zhang *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2013) together with the transcription factors PPAR α and PPAR γ (Awazawa *et al.*, 2009). In EB, PPAR α expression was increased while in TB, PPAR γ was decreased, indicating different regulation mechanisms in EB and TB. However, consequential target genes for fatty acid uptake, binding, and intracellular utilization (CPT1B, FABP4, and FATP4) were elevated, indicating that embryonic metabolism shifts to β -oxidation of fatty acids in blastocysts from old rabbits. Whether this leads to harmful or beneficial alterations in embryo development requires further investigation. In early embryogenesis, the metabolic switch to β -oxidation correlates with higher developmental competence of the blastocysts (Dunning *et al.*, 2010; Shafiei *et al.*, 2020). However, increased fatty acid supply in the developing embryo can have detrimental effects, since elevated concentrations can impair fertility through compromising early embryo quality, viability, and metabolism (Van Hoeck *et al.*, 2011) underlining the importance of an optimal range of fatty acid metabolism. In the Goldilock zone hypothesis, which addresses the optimal range of metabolic activity in embryos (Leese *et al.*, 2022), changes in lipid metabolism may have harmful effects for further embryo development. As stated by the authors, individual embryos are discrete entities, which differ in their ability to handle stressful insults. Based on observations in rabbits and humans, we can speculate that in a reproductively old environment, a lower number of embryos can adapt to the stressful insults of the first days of pregnancy, leading to higher embryo loss (Grøndahl *et al.*, 2017; Warshaviak *et al.*, 2019).

Under hyperlipidaemic conditions, free fatty acids undergo lipid peroxidation and produce excess ROS in a process known as lipotoxicity (Igosheva *et al.*, 2010). ROS can be neutralized by the antioxidant enzymes SOD2 and CAT (Scandalios 2005) which are transcriptionally regulated by Nrf2 (Cherry *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2020). In EBs, neither Nrf2 nor CAT had altered expression profiles, indicating a limited impact on oxidative stress defence in embryoblast cells. In TB, Nrf2 mRNA expression was decreased but not the protein level, which may account for why the target gene CAT was unaltered in the two study groups. SOD2 protein, however, was decreased in TB cells indicating an alternative regulation pattern in TB cells. In oocytes from old mice, SOD2 protein abundance was reduced compared to oocytes from young controls (Zhang *et al.*, 2020). Furthermore, SOD2 levels are known to decrease with repeated ovulation which is a proposed mechanism for ovarian ageing (Miyamoto *et al.*, 2010).

Ageing is associated with increased dicarbonyl stress. In cells, the GLO1 enzyme eliminates toxic dicarbonyl methylglyoxal (Distler and Palmer, 2012) while RAGE, the scavenger receptor for AGE, mediates stress signalling (Bierhaus *et al.*, 2005). GLO1 expression was unaltered in blastocysts from old rabbits (de Nivelle *et al.*, 2020). However, by analysing GLO1 expression patterns in embryonic compartments independently, we found down-regulation of GLO1 in EB, suggesting an impaired dicarbonyl

defence. In TB samples of old rabbits, RAGE protein abundance was unaltered along with GLO1 levels. In the endometrium, RAGE protein abundance was increased which is in line with the increased GLO1 protein abundance and dicarbonyl stress in the endometrium of reproductively old rabbits reported by de Nivelle *et al.* (2020). To the best of our knowledge, this is the first study which analyses RAGE expression in the context of advanced maternal age in the endometrium and in preimplantation embryos. However, the plasticity of RAGE due to metabolic challenges has been shown in obese women (Antoniotti *et al.*, 2018).

Similar to metabolic changes in the developing embryo, we observed altered intracellular lipid metabolism in the endometrium. Fatty acid transport and binding proteins were increased as well as CPT1B, the key molecule for β -oxidation, suggesting that intracellular metabolism becomes shifted towards a metabolism that gains energy from degradation of fatty acids. These results are supported by evidence showing lower protein levels of FASN, the key enzyme of fatty acid synthesis, in endometrium from old rabbits. Interestingly, the changes were observed only at the protein level and not the mRNA level, indicating post-translational modifications of FASN. FASN is protected from degradation by its interaction with O-GlcNAc transferase (Baldini and Lefebvre, 2016), which may explain the difference between the mRNA and protein levels. Independently of its role in fatty acid metabolism, FABP4 modulates uterine receptivity and is an important regulator for the proliferation, migration, and invasion of endometrial epithelial and stromal cells (Tian *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Cumulatively, a higher endometrial FABP4 level, which is related to the overall metabolic changes found in ageing females, is a potential mechanism for compensatory uterine receptivity in advanced maternal age.

Steroid hormones are products of cholesterol metabolism and have an essential role in uterine receptivity in reproductive organs (Paulson, 2011). In the endometrium of old gravid rabbits, expression of VLDLR and HMGCR was found to increase, suggesting a higher endometrial demand for exogenous cholesterol. In cattle, endometrial VLDLR is among the most highly up-regulated genes during gestation (Adhikari *et al.*, 2022), underscoring the central role of VLDLR in maternal recognition of pregnancy. Although rabbit blastocysts express all the important genes for cholesterol metabolism (Penzialek *et al.*, 2017), expression levels can change with age. For example, we found that VLDLR expression was increased in TB of old rabbits whereas in EB, ApoE was elevated. Both VLDLR and ApoE have important roles in peripheral cholesterol transport (Marais, 2019) and increased levels of ApoE have been linked to impaired oocyte maturation in older women (Von Wald *et al.*, 2010). Therefore, changes in embryonic VLDLR and ApoE may have detrimental effects on establishment and course of pregnancy, especially in older women.

Changes in lipid metabolism can lead to oxidative stress. We observed no changes in the expression of key oxidative stress defence molecules in the endometrium; however, in the ovary of old rabbits, relative CAT and SOD2 expression levels were increased. Our results are in contrast to studies conducted in humans which showed reduced protein abundance and activity of the antioxidant enzymes CAT and SOD2, which resulted in lowered ROS scavenging potential in human granulosa cells and follicular fluid of aged women (Carbone *et al.*, 2003; Tatone *et al.*, 2006; Debarh *et al.*, 2021). This difference could be explained by the fact that we analysed the entire ovary and did not study granulosa cells and follicular fluid separately. SOD2 and CAT are the two most important antioxidant enzymes in the human body,

and their expression levels increase in response to oxidative stress (Scandalios 2005; Zhang et al., 2014). The up-regulation of both enzymes within specific cell types of the ovary from gravid old rabbits, like stromal cells as well as theca interna and externa cells, in response to increased oxidative stress in ageing females is plausible and requires further investigation.

Conclusion

These data add to the growing body of knowledge which shows that females undergo a hormonal imbalance and overall changes in metabolism over time. It is becoming more evident that reproductive organs other than the ovary, such as the uterus, are detrimentally affected by age and this may also contribute to higher embryo loss during the first days of pregnancy. The results of our study highlight the importance of the developmental environment in ageing reproductive organs as a cause of fertility decline in older females. More research is required to determine the translatability of these data to humans.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Molecular Human Reproduction* online.

Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

Acknowledgements

We thank Sabine Schrötter for excellent technical assistance.

Authors' roles

M.S. and A.N.S. designed research; J.T., M.S., M.B., J.d.N., and A.T. N. performed research; J.T. and M.S. analysed data; and M.S. and J.T. wrote the paper. All authors reviewed the article.

Funding

This work was supported by the German Research Foundation GRK 2155. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflict(s) of interest to disclose.

References

- Adhikari B, Lee CN, Khadka VS, Deng Y, Fukumoto G, Thorne M, Caires K, Odani J, Mishra B. RNA-sequencing based analysis of bovine endometrium during the maternal recognition of pregnancy. *BMC Genomics* 2022;**23**:494.
- Antonioti GS, Coughlan M, Salamonsen LA, Evans J. Obesity associated advanced glycation end products within the human uterine cavity adversely impact endometrial function and embryo implantation competence. *Hum Reprod* 2018;**33**:654–665.
- Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R, Kadowaki T. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**382**:51–56.
- Baldini SF, Lefebvre T. O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. *Front Oncol* 2016;**6**:6.
- Barzilai NIR, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012;**61**:1315–1322.
- Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:773–783.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* 2005;**83**:876–886.
- Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:706–722.
- Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:639–643.
- Catandi GD, Obeidat YM, Broeckling CD, Chen TW, Chicco AJ, Carnevale EM. Equine maternal aging affects oocyte lipid content, metabolic function and developmental potential. *Reproduction* 2021;**161**:399–409.
- Cherry AD, Suliman HB, Bartz RR, Piantadosi CA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1- α as a critical co-activator of the murine hepatic oxidative stress response and mitochondrial biogenesis in *Staphylococcus aureus* sepsis. *J Biol Chem* 2014;**289**:41–52.
- Cimadomo D, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L. Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:327.
- Contreras AV, Torres N, Tovar AR. PPAR- α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Adv Nutr* 2013;**4**:439–452.
- de Nivelles J, Thoma J, Toto Nienguesso A, Seeling T, Jung J-S, Navarrete Santos A, Schindler M. Rabbit as an aging model in reproduction: advanced maternal age alters GLO1 expression in the endometrium at the time of implantation. *Appl Sci* 2020;**10**:7732.
- Debbbarh H, Louanjli N, Aboulmaouahib S, Jamil M, Ahbbas L, Kaarouch I, Sefrioui O, Cadi R. Antioxidant activities and lipid peroxidation status in human follicular fluid: age-dependent change. *Zygote* 2021;**29**:490–494.
- Distler MG, Palmer AA. Role of glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Front Genet* 2012;**3**:250.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 2010;**83**:909–918.
- El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 1999;**5**:720–725.
- Eurostat (Hg.). Demography of Europe—Statistics Visualised. 2023. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/interactive-publications/demography-2023#older-mothers> (23 November 2023, date last accessed).
- Eurostat, OECD Family Database. Mean Age of Women at Childbirth. Hg. v. OECD.Stat. 2022. <https://ec.europa.eu/eurostat/cache/dig>

- pub/demography_2021/bloc-2b.html?lang=en (23 November 2023, date last accessed).
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 2012;**144**:1–10.
- Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, Barker M, Saffery R, Yajnik CS, Eckert JJ et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *Lancet* 2018;**391**:1842–1852.
- Gleicher N, Darmon SK, Molinari E, Patrizio P, Barad DH. Importance of IGF-I levels in IVF: potential relevance for growth hormone (GH) supplementation. *J Assist Reprod Genet* 2022;**39**:409–416.
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;**24**:1786–1810.
- Gosden RG. Ovarian support of pregnancy in ageing inbred mice. *J Reprod Fertil* 1975;**42**:423–430.
- Gosden RG. Maternal age: a major factor affecting the prospects and outcome of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1985;**442**:45–57.
- Goyal D, Limesand SW, Goyal R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J Endocrinol* 2019;**242**:T105–T119.
- Grøndahl ML, Christiansen SL, Kesmodel US, Agerholm IE, Lemmen JG, Lundstrøm P, Bogstad J, Raaschou-Jensen M, Ladelund S. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence—a multicenter cohort study. *PLoS One* 2017;**12**:e0172456.
- Herrler A, Krusche CA, Beier HM. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 1998;**59**:1302–1310.
- Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith RM. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Dev Biol* 1989;**134**:48–58.
- Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchon MR, McConnell J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One* 2010;**5**:e10074.
- Inoue A, Takeuchi S, Takahashi S. Insulin-like growth factor-I stimulated DNA replication in mouse endometrial stromal cells. *J Reprod Dev* 2005;**51**:305–313.
- Kahveci B, Melekoglu R, Evruke IC, Cetin C. The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018;**18**:343.
- Kawai K, Harada T, Ishikawa T, Sugiyama R, Kawamura T, Yoshida A, Tsutsumi O, Ishino F, Kubota T, Kohda T. Parental age and gene expression profiles in individual human blastocysts. *Sci Rep* 2018;**8**:2380.
- Kaye PL, Bell KL, Beebe LF, Dunlison GF, Gardner HG, Harvey MB. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod Fertil Dev* 1992;**4**:373–386.
- Leese HJ, Brison DR, Sturmey RG. The quiet embryo hypothesis: 20 years on. *Front Physiol* 2022;**13**:899485.
- Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod* 2004;**19**:1548–1553.
- Li Y, Ren X, He L, Li J, Zhang S, Chen W. Maternal age and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. *Diabetes Res Clin Pract* 2020;**162**:108044.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998;**13**:3144–3150.
- Lighten AD, Hardy K, Winston RM, Moore GE. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1997;**47**:134–139.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
- Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 2019;**51**:165–176.
- Maurer RR, Foote RH. Maternal ageing and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer. *J Reprod Fertil* 1971;**25**:329–341.
- May-Panloup P, Brochard V, Hamel JF, Desquiere-Dumas V, Chupin S, Reynier P, Duranthon V. Maternal ageing impairs mitochondrial DNA kinetics during early embryogenesis in mice. *Hum Reprod* 2019;**34**:1313–1324.
- McCallie BR, Parks JC, Trahan GD, Jones KL, Coate BD, Griffin DK, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Compromised global embryonic transcriptome associated with advanced maternal age. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**:915–924.
- Mills M, Rindfuss RR, McDonald P, Te Velde E; ESHRE Reproduction and Society Task Force. Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:848–860.
- Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, Katsuragi M, Odo S, Utsumi K, Inoue M. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2010;**49**:674–681.
- Morton JS, Care AS, Kirschenman R, Cooke CL, Davidge ST. Advanced maternal age worsens postpartum vascular function. *Front Physiol* 2017;**8**:465.
- Napso T, Hung YP, Davidge ST, Care AS, Sferruzzi-Perri AN. Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. *Sci Rep* 2019;**9**:16916.
- Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B. The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**271**:753–760.
- Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:67–83.
- Paigen B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am J Clin Nutr* 1995;**62**:458S–462S.
- Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;**96**:530–535.
- Pendzialek SM, Schindler M, Plösch T, Gürke J, Haucke E, Hecht S, Fischer B, Santos AN. Cholesterol metabolism in rabbit blastocysts under maternal diabetes. *Reprod Fertil Dev* 2017;**29**:1921–1931.
- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 2010;**151**:4158–4167.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;**414**:799–806.
- Santonocito M, Guglielmino MR, Vento M, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Casciano I, Scollo P, Romani M, Tatone C et al. The apoptotic transcriptome of the human MII oocyte: characterization and age-related changes. *Apoptosis* 2013;**18**:201–211.
- Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005;**38**:995–1014.
- Schindler M, Fischer S, Thieme R, Fischer B, Santos AN. cAMP-responsive element binding protein: a vital link in embryonic hormonal adaptation. *Endocrinology* 2013;**154**:2208–2221.

- Schultz GA, Hahnel A, Arcellana-Panlilio M, Wang L, Goubau S, Watson A, Harvey M. Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Mol Reprod Dev* 1993;**35**:414–420.
- Seeling T, Haucke E, Navarrete Santos A, Grybel KJ, Gürke J, Pendzialek SM, Schindler M, Simm A, Navarrete Santos A. Glyoxalase 1 expression is downregulated in preimplantation blastocysts of diabetic rabbits. *Reprod Domest Anim* 2019;**54**(Suppl 3):4–11.
- Sekulovski N, Whorton AE, Shi M, Hayashi K, MacLean JA 2nd. Insulin signaling is an essential regulator of endometrial proliferation and implantation in mice. *FASEB J* 2021;**35**:e21440.
- Shafiei G, Almasi M, Nikzad H, Miyani J, Mahabadi JA, Moshkdanian G. L-carnitine reduces the adverse effects of ROS and up-regulates the expression of implantation related genes in in vitro developed mouse embryos. *Theriogenology* 2020;**145**:59–66.
- Simoni MK, Mu L, Collins SC. Women's career priority is associated with attitudes towards family planning and ethical acceptance of reproductive technologies. *Hum Reprod* 2017;**32**:2069–2075.
- Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:655–660.
- Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:131–142.
- Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Fischer B, Santos AN. Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 2012a;**348**:112–119.
- Thieme R, Schindler M, Ramin N, Fischer S, Mühleck B, Fischer B, Navarrete Santos A. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2012b;**358**:96–103.
- Tian Z, Zhao ZA, Liang XH, Zhang XH, Sha AG, Zhang ZR, Yu YS, Yang ZM. Expression and function of fatty acid-binding protein 4 during mouse decidualization. *Fertil Steril* 2011;**95**:2749–2752.e1-5.
- Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A. Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *Anat Embryol (Berl)* 2004;**208**:225–230.
- Van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizo D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, Bols PE, Leroy JL. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS One* 2011;**6**:e23183.
- Vitale G, Pellegrino G, Vollery M, Hofland LJ. ROLE of IGF-1 system in the modulation of longevity: controversies and new insights from a centenarians' perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:27.
- Von Wald T, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, Usheva A. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril* 2010;**93**:2354–2361.
- Wang P, Zhu Q, Peng H, Du M, Dong M, Wang H. Fatty acid-binding protein 4 in endometrial epithelium is involved in embryonic implantation. *Cell Physiol Biochem* 2017;**41**:501–509.
- Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A, Samara N, Dviri M, Azem F, Ben-Yosef D. The effect of advanced maternal age on embryo morphokinetics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:686.
- Woods L, Perez-Garcia V, Kieckbusch J, Wang X, DeMayo F, Colucci F, Hemberger M. Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. *Nat Commun* 2017;**8**:352.
- Xu JF, Lu JJ, Cao Y, Wang W, Li HH, Chen JG, Wang F, Wu PF. Sulforaphane alleviates ethanol-mediated central inhibition and reverses chronic stress-induced aggravation of acute alcoholism via targeting Nrf2-regulated catalase expression. *Neuropharmacology* 2020;**176**:108235.
- Yovich JL, Zaidi S, Nguyen MDK, Hinchliffe PM. Measuring IGF-1 and IGFBP-3 Profiles in women seeking assisted reproduction; Relationship to clinical parameters (Study 1). *J Pers Med* 2020;**10**:122.
- Zhang JQ, Shen M, Zhu CC, Yu FX, Liu ZQ, Ally N, Sun SC, Li K, Liu HL. 3-Nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse. *PLoS One* 2014;**9**:e86589.
- Zhang M, Lu Y, Chen Y, Zhang Y, Xiong B. Insufficiency of melatonin in follicular fluid is a reversible cause for advanced maternal age-related aneuploidy in oocytes. *Redox Biol* 2020;**28**:101327.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Konkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolzheimer E, Jacobsen E et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:4459–4464.
- Zhu Q, Jin Y, Wang P, Wang H, Lu B, Wang Z, Dong M. Expression and function of fatty acid-binding protein 4 in epithelial cell of uterine endometrium. *Cell Biol Int* 2015;**39**:540–547.

Article

Rabbit as an Aging Model in Reproduction: Advanced Maternal Age Alters GLO1 Expression in the Endometrium at the Time of Implantation

Johanna de Nivelles *, Juliane Thoma, Alicia Toto Nienguesso, Tom Seeling, Juliane-Susanne Jung , Anne Navarrete Santos and Maria Schindler *

Institute for Anatomy and Cell Biology, Medical Faculty of Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06108 Halle, Germany; thoma.juliane@gmx.de (J.T.); alicia.toto-nienguesso@medizin.uni-halle.de (A.T.N.); tom.seeling@medizin.uni-halle.de (T.S.); juliane-susanne.jung@medizin.uni-halle.de (J.-S.J.); a.navarrete-santos@medizin.uni-halle.de (A.N.S.)

* Correspondence: johanna.de-nivelles@student.uni-halle.de (J.d.N.); maria.schindler@medizin.uni-halle.de (M.S.); Tel.: +49-345-557-4037 (J.d.N.); +49-345-557-1725 (M.S.)

Received: 29 September 2020; Accepted: 26 October 2020; Published: 31 October 2020



Abstract: Advanced maternal age is associated with adverse pregnancy outcomes and the decline of female fertility in mammals. A potential reason for reduced fertility is metabolic changes due to protein modifications by advanced glycation end products. To elucidate the aging process in female reproduction, we analysed a key enzyme for detoxification of reactive dicarbonyls, the glyoxalase 1 (GLO1), in reproductive organs and blastocysts of young and old rabbits at the preimplantation stage. At day 6 post coitum, uterine, oviductal, ovarian tissue and blastocysts from young (16–20 weeks) and old rabbits (>108 weeks) were characterised for GLO1 expression. GLO1 amounts, enzymatic activity and localisation were quantified by qPCR, Simple Western, activity assay and immunohistochemistry. The GLO1 enzyme was present and active in all reproductive tract organs in a cell-type-specific pattern. Ovarian follicle and uterine epithelial cells expressed GLO1 to a high extent. In tertiary follicles, GLO1 expression increased, whereas it decreased in the endometrium of old rabbits at day 6 of pregnancy. In blastocysts of old animals, GLO1 expression remained unchanged. In early pregnancy, advanced maternal age leads to modified GLO1 expression in ovarian follicles and the endometrium, indicating an altered metabolic stress response at the preimplantation stage in older females.

Keywords: preimplantation embryo; uterus; ovary; glyoxalase 1; advanced maternal age

1. Introduction

Over the past three decades there has been a pronounced increase in the number of births by older women, especially in their late 30s and 40s, in many high-income countries [1–3]. The mean age of women at birth of their first child has gradually increased from 27.0 in 1987 to 29.3 in 2018 in the European Union [4]. Women are evidently delaying childbearing. However, advanced maternal age can have detrimental effects on fertility and pregnancy outcome. It is well known that the developmental potential of oocytes declines with increasing age, referred to as ovarian aging. This phenomenon is characteristic not only for humans, but for all mammals [5–7]. Advanced maternal age is associated with a range of adverse pregnancy outcomes, including low birth weight, preterm birth and stillbirth [8–11]. It has been proposed that during the reproductive lifespan, ovarian follicles and reproductive tissues become exposed to factors that accumulate irreversibly, leading to an age-related decline of fertility [12,13].

Accumulation of harmful compounds such as advanced glycation end products (AGEs) is strongly associated with aging [14]. Furthermore, higher AGE levels correlate with aging-related diseases;

for example with diabetes, cancer and neurodegenerative diseases [15,16]. A major precursor of AGEs is the α -oxoaldehyde methylglyoxal (MG), a dicarbonyl, which is physiologically formed during glycolysis, and to a lesser extent in cellular lipid and amino acid metabolism [17,18]. Dicarbonyl species are highly reactive, promoting posttranslational modifications of proteins, lipids and nucleic acids [19] and thus interfering with physiological functions of these molecules. MG reacts with arginine residuals to form argpyrimidine [20].

In physiological systems, defence against dicarbonyl glycation and particularly detoxification of MG mainly occurs via the glyoxalase system [21,22]. The glyoxalase system limits carbonyl stress toxicity [23]. It consists of two enzymes: the important rate-limiting glyoxalase 1 (GLO1) and glyoxalase 2 (GLO2, also known as hydroxyacyl glutathione hydrolase, HAGH) [24]. GLO1, the main component of the MG elimination system, is significantly decreased and associated with increased MG-AGEs in ovaries from mice with an advanced reproductive age in comparison to their young control group [25]. Moreover, studies have shown that AGEs are closely associated with female infertility and that AGE accumulation promotes ovarian oxidative stress and steroid hormone production, in consequence leading to ovarian dysfunction [26].

The reproductive dysfunction associated with aging has been so far characterised in terms of reduction of ovarian follicles and oocyte quality, as well as pregnancy complications (reviewed by Sauer [27]). While the extent of literature in this area is profound, there is currently limited knowledge on the molecular pathways leading to the impact that advanced maternal age has on the developmental competences of oocytes and embryos. We have recently shown that AGEs are present in ovarian tissues and embryos in rabbits [28]. Furthermore, the GLO1 enzyme is active in rabbit blastocysts as early as during preimplantation. The GLO1 amount decreases under pathophysiological conditions of maternal diabetes mellitus in embryos [29].

In the current study, we investigated the impact of maternal age on GLO1 expression and localisation in female reproductive organs and embryos at the preimplantation stage. For this purpose, we quantified GLO1 amounts and enzymatic activity of reproductive young (16–20 weeks) and old (over 108 weeks) rabbits in the uterus, oviduct and ovary, as well as in blastocysts on day 6 of pregnancy.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Treatment and Recovery of Reproductive Tissues and Preimplantation Embryos

All animal experiments were performed in accordance with the principles of laboratory animal care and the experimental protocol had been approved by the local ethics committee (Landesverwaltungsamt Dessau; reference number: 42502-2-812).

To investigate whether the glyoxalase system changes with maternal age in reproductive organs during the preimplantation stage, we examined the ovaries, oviduct and uterus of rabbits on day 6 of pregnancy. At least nine young rabbits (16–20 weeks), equivalent to young fertile women, and 13 old rabbits (108–172 weeks), equivalent to 40-years-old women, were analysed for GLO1 expression, activity and localisation. Sexually mature rabbits (New Zealand White, hybrid strain Zika, acquired from Dr. Zimmermann GbR, Germany) were maintained under species-appropriate conditions for four weeks before mating. Female rabbits were mated with two fertile bucks. No hormonal stimulation was used. On day 6 post coitum (p.c.), rabbits were sacrificed using a lethal dose of pentobarbital and reproductive tissues, such as ovary, oviduct and uterus, were collected.

Ovarian, oviductal and uterine tissue sections were prepared and stored at -80°C until usage for RNA and protein isolation or in bouin[®] fixation solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) for immunohistochemistry. Uterine endometrium was abraded mechanically from the myometrium and stored at -80°C before RNA and protein isolation.

Six-day-old blastocysts were flushed from the uterus, washed three times with PBS and characterised morphologically. On day 6 p.c., gastrulation stage of blastocysts was determined

under the stereomicroscope according to morphological characteristics of the embryonic disc which is summarised by Fischer et al. [30].

Blastocysts at the pre-gastrulating stage 0 with no apparent axial differentiation in the embryonic disc were used for analysis. Embryonic coverings were mechanically removed under a stereomicroscope. Blastocysts were stored at -80°C until use for RNA and protein isolation.

2.2. RNA Isolation and cDNA Synthesis of Reproductive Tissues

Total RNA extraction from ovary, oviduct and endometrium tissue was performed using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) according to described protocol [31]. The amount of total RNA was measured spectrophotometrically at 260 nm. To check RNA quality, 260/280 ratio was calculated. Seven μg of isolated mRNA were treated with 4 U DNase-free™ Kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) for 30 min at 37°C . As a control for remaining DNA contamination, 1 μg RNA was PCR amplified without reverse transcription reaction.

One μg of DNA-free RNA was transcribed into cDNA using 200 U reverse transcriptase (RevertAid H Minus RT, Thermo Scientific, USA) and random primer (p(dN)6, Roche, Basel, Switzerland) at 42°C for 1 h, followed by incubation at 70°C for 10 min.

2.3. RNA Isolation and cDNA Synthesis of Single Blastocysts

Messenger RNA (mRNA) of single blastocysts was extracted with Dynabeads® Oligo (dT)25 (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Blastocysts were lysed in 20 μL lysis buffer (100 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.1% SDS). Blastocyst lysate was hybridised with 5 μL Dynabeads for 5 min and separated by magnetic adhesion for 2 min. The supernatant was removed and the pellet was washed as described in Tonack et al. [32]. Isolated mRNA was resolved in 11 μL DEPC and total mRNA amount was used for cDNA synthesis. Water was added for a final cDNA reaction volume of 100 μL .

2.4. Measurement of mRNA Levels by Quantitative PCR

For GLO1 the amplification and quantification forward (5'-ACCCCAGCACCAAGGATTTT-3') and reverse primer (5'-GTGCCCCAATTGTGTGTCAG-3') were designed based on the rabbit GLO1 gene sequence (Gene ID: 100,354,439 NCBI, accession number: XM_002714686) by Primer-BLAST. PCR products were sequenced and checked for specificity as described previously by Seeling et al. [29].

Quantitative PCR (qPCR) analyses were performed in duplicates using the Quant Studio 3™ Real Time System (ThermoFisher, Schwerte, Germany) with no template controls for each primer set. QPCR runs were performed on 3 μL cDNA with 17 μL MasterMix (PowerTrack™ SYBR Green Master Mix, ThermoFisher, Schwerte, Germany). Vinculin was simultaneously quantified as the endogenous control. The target gene expression was normalised to that of vinculin in each sample. Forward (5'-CCGTGAGGCTGGTTACGC-3') and reverse primer (5'-CGGGCAACAGAGAACTAGGAA-3') were designed based on the rabbit vinculin gene sequence (Gene ID: 100,357,160 NCBI, accession number: XM_002718406.3). For quantification, GLO1 and vinculin calibration curves were included from serial dilutions (10^7 – 10^3 copies) of gene specific DNA plasmid standards. Quantification of mRNA amount was calculated using a comparative method ($\Delta\Delta\text{CT}$). The threshold cycle (CT) for each gene was normalized to vinculin (house-keeping gene) and expressed as relative to the mean of the young control group.

2.5. Protein Preparation and Immunoblotting

Embryonic proteins and tissue samples were isolated as previously described [33,34]. Tissues were homogenized in 500 μL of cold radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer with protease and phosphatase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland). In one embryonic protein sample, 5–13 blastocysts were pooled. For analysis 4 samples from young and 6 from old rabbits were used.

The Simple Western™ method was used for GLO1 protein analysis and carried out in accordance to the manufacturer's instructions. This method enables automated size-based separation of protein samples with subsequent immunoblotting within provided capillaries. In an initial step, the extracted denatured protein samples (0.4 µg/µL tissues and 0.6 µg/µL blastocysts), primary antibodies, horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibodies, and the detection-mix were dispensed on a 384-well microplate. An overview of the used antibodies is shown in Table 1. A detailed description of the assay plate design and method is provided in the supplemental (Figures S1 and S2). For peak identification, electropherograms were used, which can be digitally converted into traditionally looking blots (Figure S3). Blots of Simple Western data are provided in the supplemental (Figures S5–S8). Compass software was used to process and analyse all data results. The protein amount was calculated as the ratio of area under the curve (GLO1 protein vs. vinculin) in the same run to correct for differences in protein loading.

Table 1. List of primary and secondary antibodies used for the Simple Western™ method.

Antigen	Name of Antibody	Manufacturer/Company Catalogue NO.	Type	Dilution
GLO1	GLO1 (D-5)	santa cruz, sc-133214	MM	1:50
Vinculin	Vinculin (7F9)	santa cruz, sc-73614	MM	1:300
Mouse IgG	Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey anti-mouse IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch, 715-035-150	DP	1:300
Mouse IgG	Secondary HRP Conjugate Goat anti-mouse IgG (H + L)	ProteinSimple, 042-205	MP	undiluted

MM: mouse monoclonal; DP: donkey polyclonal, MP: mouse polyclonal.

2.6. GLO1 Enzymatic Assay

The activity of GLO1 was measured spectrophotometrically in accordance with Bélanger et al. [35]. A total amount of 10 µg isolated protein per sample were loaded onto an UV microplate (Corning Inc., Corning, NY, USA) and 200 µL of reaction mix was added, as previously described in Seeling et al. [29]. The change in absorbance (ΔE) at 240 nm was measured every minute for one hour at 37 °C, to allow the reaction to reach saturation. GLO1 activity was calculated using ΔE in the linear range after correction for blank: $A = (V_{\text{total}} \times \Delta E) / (V_{\text{sample}} \times \epsilon_{\text{hemithioacetal}} \times d)$, with $\Delta \epsilon_{240} = 2.86 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [36]. Specific GLO1 activity was calculated as a ratio of relative GLO1 activity and GLO1 protein amount within the same sample.

2.7. Immunohistochemical Localisation of GLO1 and Argpyrimidine in the Reproductive Tract Organs

Ovarian, oviductal and uterine tissues were prepared as described in Haucke et al. [28]. Endogenous peroxidases were inhibited by incubating the slides with 3% H₂O₂ in Methanol for 25 min. After blocking with 10% goat serum for one hour, the slides were incubated with mouse monoclonal antibody against GLO1 (1:200, #133214, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) or argpyrimidine (1:100, Biologo, Kiel, Germany) diluted in 1% (wt/vol) BSA/PBS at 4 °C overnight. For detection, the secondary antibody Dako EnVision + System-HRP labelled Polymer anti-mouse (1:1 in PBS; Dako, Jena, Germany) and diaminobenzidine (DAB; WAK-Chemie Medikal, Steinbach, Germany) were used. As negative control, the control reaction of the HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG without the primary antibody was used. The DAB reaction was stopped after 4–6 min. Nuclei were counterstained blue with haematoxylin for 5 min. All steps were performed within the same experiment, examined microscopically during the same session, using an identical microscope (Leica DMI8, Wetzlar, Germany) and camera settings. Description of immunohistochemical evaluation is provided in the supplemental (Figure S4). The software Leica Application Suite X was used for image acquisition and editing.

2.8. Statistics

Statistical analysis was performed using OriginPro 2019 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Student's t-test or one-way ANOVA was used after proving normal distribution. Mann–Whitney U test was used, if normal distribution could not be proven. For results displayed as box plots, the white squares show the mean values. Median values are represented by a black line. The upper/lower whisker represents $Q1/Q3 \pm 1.5 \times$ interquartile range. Results shown by bar chart are expressed as mean value $\pm$ standard error of the mean (mean $\pm$ SEM). Levels of significance are labelled as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (n) represents the number of samples used for the measurement per group, (N) the number of animal experiments from which embryonic samples were recovered.

3. Results

3.1. Expression and Activity of GLO1 in the Ovary of Young and Old Rabbits on Day 6 of Pregnancy

In ovary samples from young and old rabbits, comparable amounts of GLO1 transcripts, GLO1 protein and GLO1 activity were measured (Figure 1).

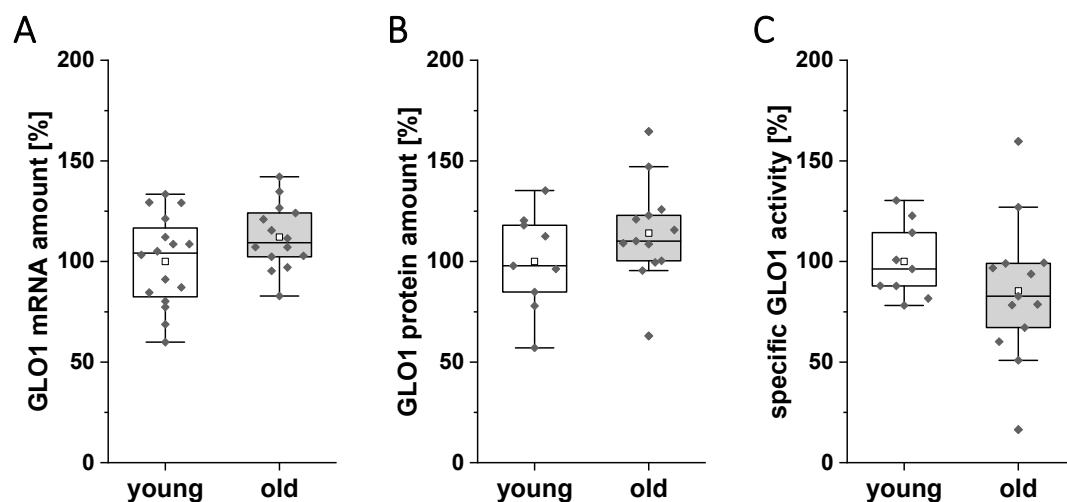


Figure 1. Quantification of GLO1 mRNA, protein and enzymatic activity in the ovary of young and old rabbits at day 6 p.c. (A) GLO1 mRNA levels were quantified by qPCR. (B) GLO1 protein was measured by the Simple Western method. Both mRNA and protein amount were normalised to the levels of vinculin. (C) Enzymatic GLO1 activity was measured spectrophotometrically in 10 μ g ovarian protein lysate. Specific GLO1 activity was calculated relative to GLO1 protein amount within the same sample. Results are shown as box plots. All values are expressed in per cent, with young rabbits = 100% ($n \geq 9$).

Immunohistochemical staining of the ovary revealed that in young and old rabbits GLO1 was exclusively localised in the cytosol and nucleoplasm, showing a dominant staining in follicles in the oocyte and the surrounding follicular epithelium, as well as the germinal epithelium (Figure 2A). During follicle maturation, the follicular cells differentiate to become several layers of granulosa cells, which showed the most prominent GLO1 staining. Ovarian stromal cells and the theca folliculi showed weaker staining. In the ovaries of old rabbits, tertiary follicles were more intensively stained than those of young ones (Figure 2C), indicating an increased expression of GLO1 at this follicle stage in old animals.

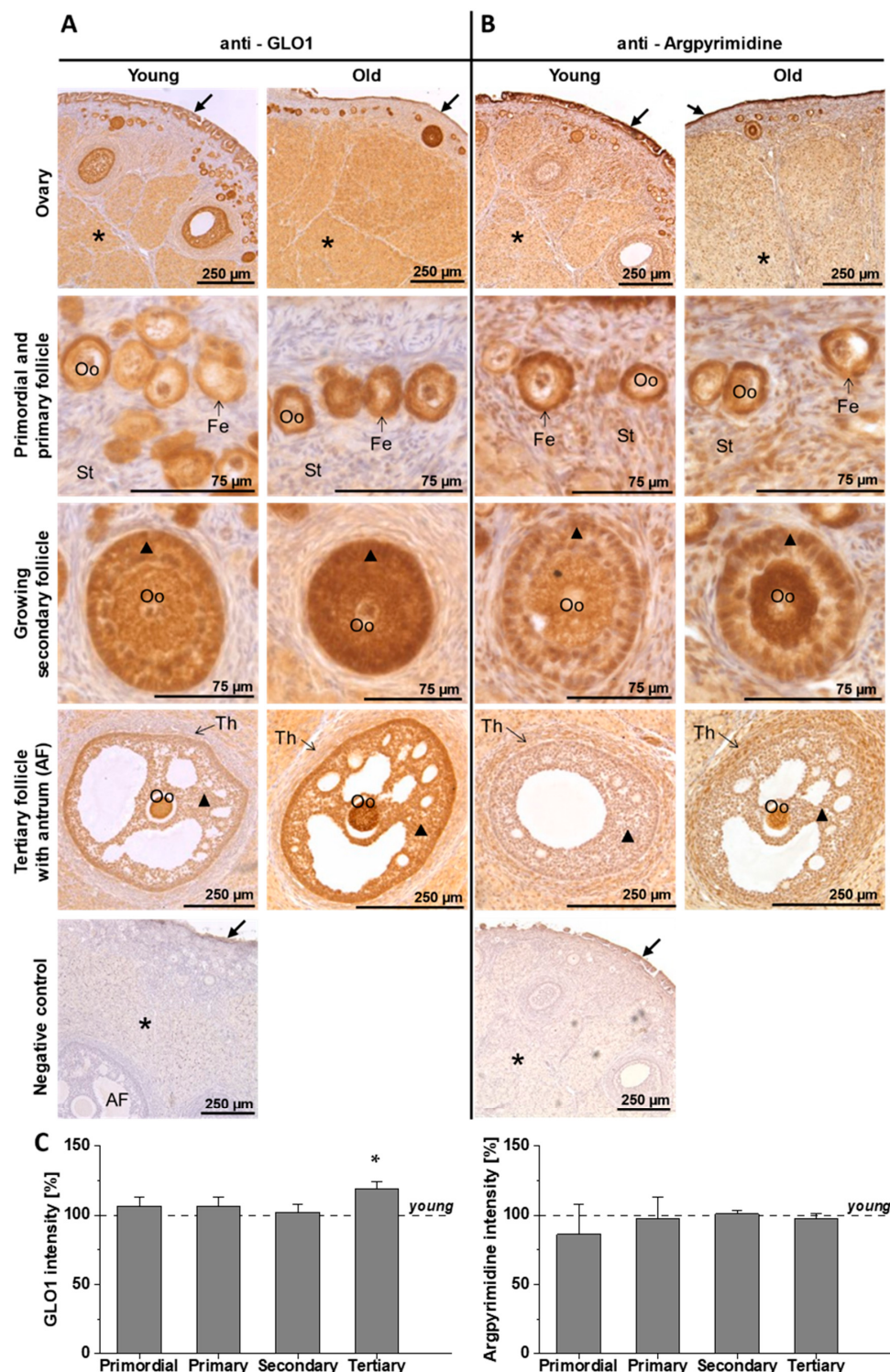


Figure 2. Immunohistochemical analysis of GLO1 (A) and argpyrimidine (B) in the ovary of young and old rabbits. GLO1 and argpyrimidine were visualised through a peroxidase–diaminobenzidine reaction (brown colour). Nuclei were stained with haematoxylin (blue colour). Oo = Oocyte. Th = Theca folliculi. St = Stromal cells. Fe = Follicular epithelium. → = Germinal epithelium. ▲ = Granulosa cells. * = Corpus luteum. (C) GLO1 and argpyrimidine staining intensities were evaluated independently and blindly by at least two researchers. Staining was graded using a scale from 0 (none) to 5 (very strong). The diagram depicts the staining intensity by follicle stage, calculated as average of oocyte, follicular epithelium/granulosa cell and theca folliculi grading. Relative intensities are expressed as mean ± SEM in per cent, with young rabbits = 100% ($n = 6$; * $p = 0.012$).

The AGE argpyrimidine was colocalised in ovarian sections from young and old rabbits (Figure 2B). For argpyrimidine, immunohistochemical analysis revealed a cytosolic as well as a nucleoplasmatic localisation, particularly in stromal cells, corpus luteum and theca folliculi. Staining patterns were similar to those of GLO1, with the strongest signal being observed in the follicles. Comparing argpyrimidine staining to that of GLO1 at the tertiary stage, a more distinct staining was found in the theca folliculi, while granulosa cell staining was reduced. At all follicle stages, no differences in argpyrimidine distribution between young and old rabbits were observed (Figure 2C).

3.2. Expression and Activity of GLO1 in the Oviduct of Young and Old Rabbits on Day 6 of Pregnancy

In mammals, fertilisation takes place in the oviduct. Local changes in reactive dicarbonyls may have a long-term impact on the developing embryo. As an indicator for possible changes, we analysed the expression of GLO1 in the oviduct. GLO1 expression and activity were not altered in the oviduct of old rabbits (Figure 3A–C).

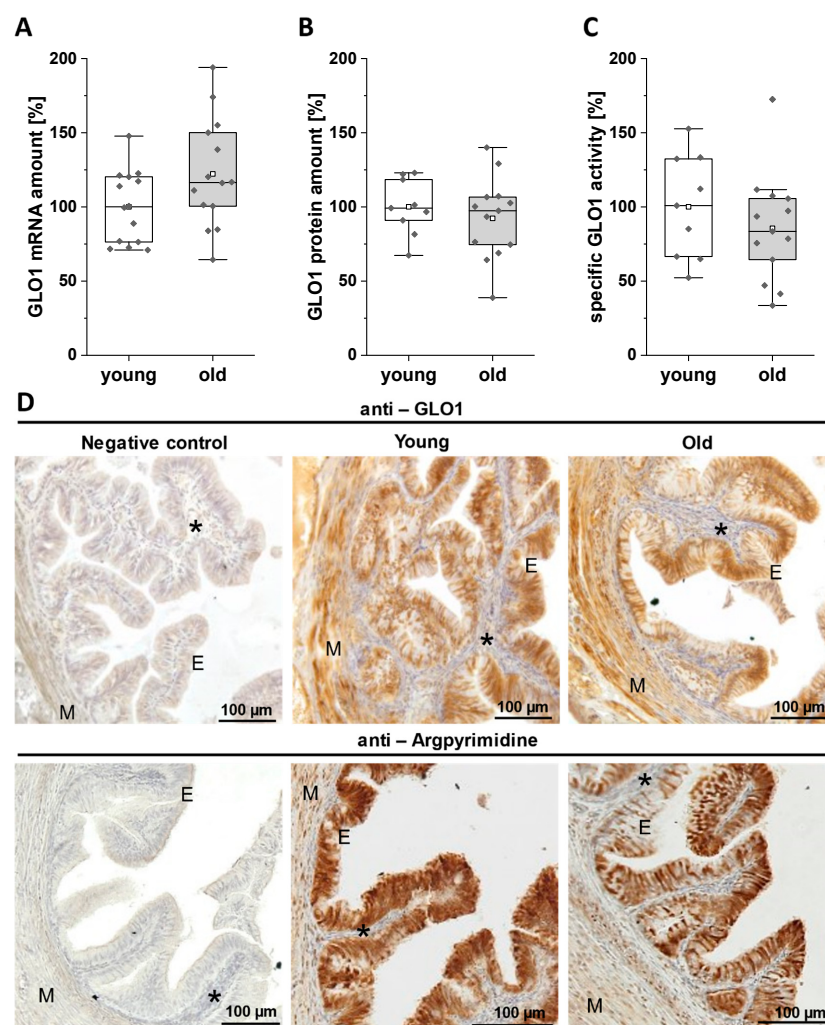


Figure 3. Quantification of GLO1 mRNA, protein and enzymatic activity in the oviduct of young and old rabbits at day 6 p.c. (A) GLO1 mRNA levels were analysed by qPCR. (B) GLO1 protein analysis was carried out by Simple Western method. Vinculin was used for normalization to calculate relative mRNA and protein amounts. (C) Enzymatic GLO1 activity was measured spectrophotometrically in 10 µg oviductal protein. Specific GLO1 activity was calculated relatively to GLO1 protein amount within the same sample. Results are shown as box plots. All values are expressed in per cent, with young = 100% ($n \geq 9$). (D) Immunohistochemical analysis of GLO1 and argpyrimidine in cross-sections through the oviduct. M = Muscularis. * = Mucosa layer with (ciliated) columnar epithelium (E).

We further analysed the localisation of GLO1 and the AGE argpyrimidine in the oviduct of young and old rabbits (Figure 3D). GLO1 was localised in the cytosol and nucleoplasm. An intense staining was revealed in the oviductal epithelium with secretory and ciliated cells, as well as the muscularis layer. Furthermore, smooth muscle cells from vessels were stained positive for GLO1. In oviducts of young and old rabbits, no differences in GLO1 staining, neither in localisation nor in intensity, were observed. Argpyrimidine showed a cytosolic as well as a nucleoplasmatic localisation, particularly in the oviductal epithelium and the muscularis layer. Staining patterns were similar to those of GLO1. No differences in argpyrimidine localisation between young and old rabbits were observed.

3.3. Expression and Activity of GLO1 in the Uterus of Young and Old Rabbits on Day 6 of Pregnancy

The uterus, especially the endometrium, are crucial organs for embryo implantation and the establishment of a successful pregnancy. We analysed the GLO1 expression and activity in the pregnant uterus at day 6 p.c. In the endometrium of old rabbits, we observed significant lower GLO1 mRNA and protein levels (Figure 4A,B), whereas the specific GLO1 activity was not altered (Figure 4C).

In the uterus, GLO1 was localised in the myometrium, as well as in the glands and epithelium of the endometrium. The stroma of the endometrium was weakly stained. No differences in GLO1 localisation and staining intensity were observed between young and old rabbits (Figure 4D). The GLO1 protein decrease detected by qPCR and Simple Western (Figure 4A,B) was not evident in immunohistochemical sections.

For the AGE argpyrimidine, immunohistochemical analysis showed a cytosolic as well as a nucleoplasmatic localisation, particularly in the myometrium, glands and epithelium. In contrast to GLO1, argpyrimidine was also localised in stromal cells. Comparing the staining pattern to that of GLO1, the argpyrimidine staining showed more variety across the endometrium, with a very intense staining in some distinct endometrial cells. In the endometrium of old rabbits, more of these intensively stained endometrial cells were detected than in young rabbits (Figure 4D), indicating an increased accumulation of argpyrimidine in the endometrium of old animals.

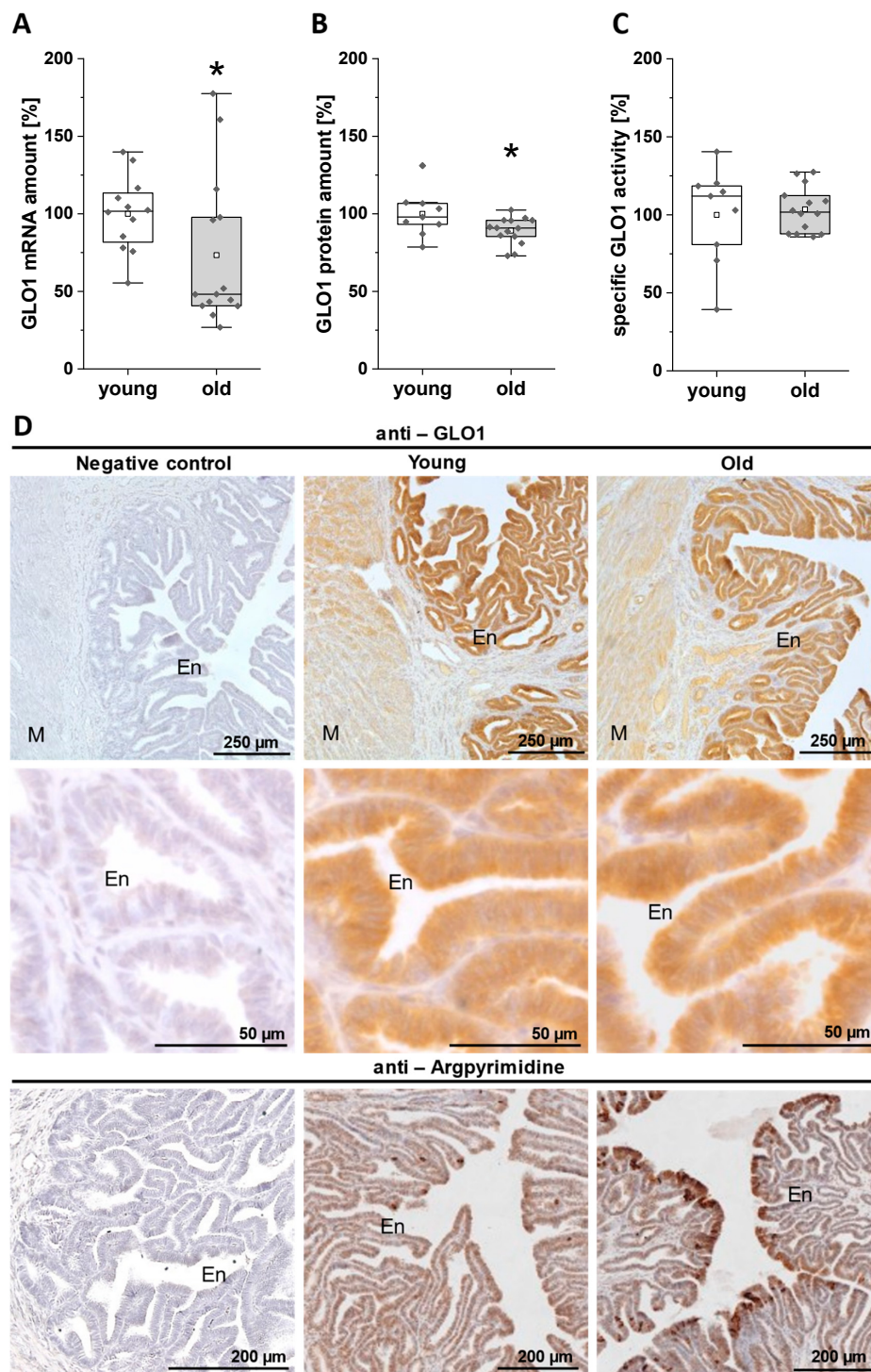


Figure 4. Quantification of GLO1 mRNA, protein and enzymatic activity in the endometrium of young and old rabbits at day 6 p.c. (A) GLO1 mRNA levels were quantified by qPCR. The Mann–Whitney U test was used for statistical analysis (* $p = 0.033$). (B) GLO1 protein analysis was carried out by the Simple Western method. Relative mRNA and protein amount are normalised to the levels of vinculin (* $p = 0.038$). (C) Enzymatic GLO1 activity was measured spectrophotometrically in 10 µg endometrial protein. Specific GLO1 activity was calculated relatively to GLO1 protein amount within the same sample. Results are shown as box plots. All values are expressed in per cent, with young = 100% ($n \geq 9$). (D) Immunohistochemical detection of GLO1 and argpyrimidine in cross-sections through the uterine wall. M = Myometrium. En = Endometrium.

3.4. mRNA and Protein Amount of GLO1 in Blastocysts of Young and Old Rabbits on Day 6 of Pregnancy

In blastocysts from old rabbits, GLO1 mRNA amount was not altered (Figure 5A). On protein level, the mean value of the GLO1 quantity was higher in embryos from old animals; however, the difference did not reach statistical significance (Figure 5B).

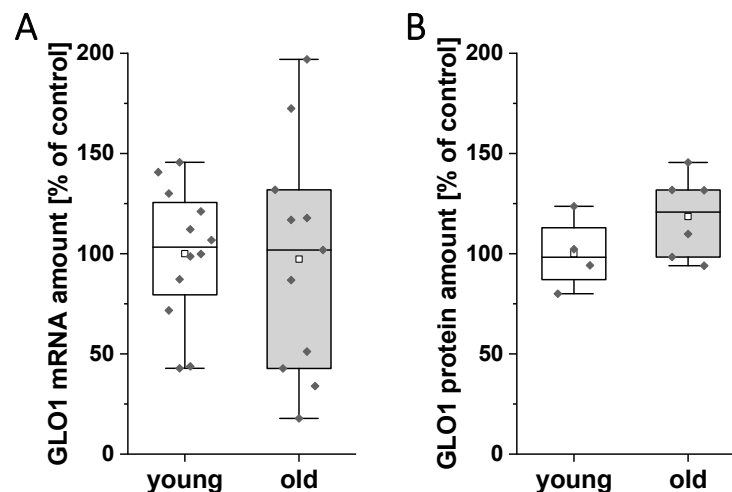


Figure 5. Quantification of GLO1 mRNA and protein amount in 6-day old blastocysts from young and old rabbits. (A) GLO1 mRNA levels were quantified by qPCR. ($N = 2, n \geq 11$) (B) For GLO1 protein analysis by the Simple Western method pooled embryonic samples with 5–13 blastocysts were used ($N = 2, n \geq 4$). Results are shown as box plots. Relative mRNA and protein amount are normalised to the levels of vinculin. All values are expressed in per cent, with young = 100%.

4. Discussion

The postponement of childbearing to the fourth decade of life has made reproductive aging a central topic that entails negative consequences for individual fertility and pregnancy outcome but also for society. Reproductive organs are exposed to metabolites that irreversibly accumulate during the reproductive lifespan, including compounds such as AGEs [25]. The main precursors of AGEs are reactive dicarbonyls, such as MG.MG, which is a ubiquitous reactive dicarbonyl that is eliminated by the glyoxalase system [18,21]. However, some reactive dicarbonyls can escape detoxification and react to form stable AGEs. The accumulation of reactive dicarbonyl compounds can be caused by decreased elimination or increased formation. In the current study, we focused on the key enzyme of the detoxification system, GLO1, in reproductive tissues and embryos of old and young rabbits.

GLO1 represents the frontline defence against dicarbonyl glycation in physiological systems, limiting dicarbonyl stress [21,22]. We could show that GLO1 is expressed in the ovary, oviduct, uterus and blastocyst of rabbits. We observed lower levels of GLO1 in the endometrium of old rabbits whilst the specific GLO1 activity remained the same, implicating an absolute decrease of GLO1 activity in this tissue. In the ovary of polycystic ovary syndrome (PCOS) rats, AGEs lead to reduced GLO1 [37]. In the immunohistochemical analysis of the uterus we observed an increased accumulation of the AGE argpyrimidine in endometrial cells of old rabbits. The decreased amount of GLO1 in the endometrium may be caused by higher AGE levels in the uterine environment of old rabbits. Our findings indicate an impaired AGE defence and higher exposure to dicarbonyl stress in endometrial cells—the cell layer that directly forms and interacts with the surrounding milieu of the developing blastocyst.

The importance of GLO1 has been shown in several knock down studies. The lack of GLO1 in cell culture and animal models results in increased levels of free MG and MG-derived AGEs [38,39]. GLO1 activity is inversely correlated to elevated levels of AGEs and androgen levels, in consequence leading to hormonal imbalance [37]. Hormonal imbalance can impair fertility and pregnancy establishment, as observed in women with advanced maternal age [40]. Lower levels of GLO1

in the endometrium may indicate higher AGE levels and oxidative stress in the uterine cavity fluid, the surrounding milieu of the developing embryo. We have shown already that AGEs such as argpyrimidine, CML and pentosidine are present in rabbit blastocysts [28]. Further research is needed to analyse whether oxidative stress and the levels of AGEs are increased in the blastocysts of old rabbits.

In humans, AGE-modified proteins were detected in follicular cell layers, granulosa and theca cells and in luteinised cells, with a more prominent staining in granulosa cells of women with PCOS [41]. In PCOS patients, AGEs are able to modulate extracellular matrix organisation, leading to deregulation of folliculogenesis [42]. Increased MG and AGE levels, paired with a lower GLO1 expression, resulted in ovarian proteome damage in the mouse model [25]. Accumulation of AGEs in the ovary may, therefore, be one reason for the impaired folliculogenesis in women with an advanced maternal age [43]. A possible correlation between AGEs and follicle aging was first described by an observational study. They could show that the AGE pentosidine was increased in the primordial, primary and atretic follicles of postmenopausal women [44]. In rabbit ovaries, we observed that the AGE argpyrimidine accumulates in follicular cells, especially in granulosa cells. The coincidence of argpyrimidine and GLO1 indicates a high metabolic stress level in these specific cells. As mentioned above, in human ovary AGEs accumulate in follicles with an advanced maternal age. Changes of GLO1 in the reproductive organs and a possible interaction with AGEs are likely in humans as well. However, the rabbit reproductive model only reflects human development during blastocyst formation. Accordingly, results are limited to the developmental stages investigated. Another limitation of the current study is its sole focus on the anti-glycation enzyme GLO1. Other anti-glycation enzymes, such as aldehyde dehydrogenase or aldose reductase, could be investigated in further studies.

In this observational study GLO1 expression and AGE levels were described and quantified. The functional relationships and regulations between increased AGEs and decreased GLO1 amounts were not investigated. A recently published study could show that SIRT1 participates in modulation of MG scavenging in mouse oocytes by promoting the expression of GLO1, SOD2 and catalase to avoid ovarian AGE accumulation [45]. These antioxidant enzymes play a role in the defence system of the ovary [46] and uterus [47] and could give further understanding of GLO1–AGE interactions in the aged endometrium.

5. Conclusions

In rabbits, an advanced maternal age reduces GLO1 expression in the endometrium at the time of implantation, indicating a decrease of metabolic stress defence in the aging uterus. We suppose that a modified GLO1 expression can be one mediating factor regarding the age-related decline in pregnancy rate. Further research is needed to expand analysis of AGEs–GLO1 interactions on a molecular level and the consequences for early embryo-maternal communication.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3417/10/21/7732/s1>. Figure S1: Assay plate design for Simple Western; Figure S2: Simple Western method, modified after ProteinSimple [48]; Figure S3: Example of Simple Western run analysis; Figure S4: Immunohistochemistry grading; Figure S5: Simple Western of the ovary; Figure S6: Simple Western of the oviduct; Figure S7: Simple Western of the endometrium; Figure S8: Simple Western of blastocysts.

Author Contributions: Conceptualization, A.N.S., M.S., J.d.N.; methodology: A.N.S., M.S., J.-S.J., T.S.; validation: M.S., A.N.S.; formal analysis: J.d.N., M.S., A.T.N.; investigation: J.d.N., M.S., A.T.N., J.T.; resources: J.d.N., J.T., T.S., A.T.N., M.S., A.N.S., J.-S.J.; data curation: J.d.N., J.T.; writing—original draft preparation: M.S., J.d.N.; writing—review and editing: M.S., A.N.S., J.D.N., A.T.N., J.-S.J., J.T.; visualization: J.D.N., M.S.; supervision: M.S., A.N.S.; project administration: A.N.S., M.S.; funding acquisition: A.N.S., M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the German Research Foundation GRK 2155. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We thank Sabine Schrötter and Jennifer Kopietz for excellent technical assistance. We acknowledge the financial support within the funding programme Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG) and the ZMG for providing access to SallySue.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Huang, L.; Sauve, R.; Birkett, N.; Fergusson, D.; van Walraven, C. Maternal age and risk of stillbirth: A systematic review. *CMAJ* **2008**, *178*, 165–172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mathews, T.J.; Hamilton, B.E. Mean Age of Mothers is on the Rise: United States, 2000–2014. *NCHS Data Brief* **2016**, *232*, 1–8.
- OECD Family Database. The Structure of Families 2.3: Age of Mothers at Childbirth and Age-Specific Fertility. 2019. Available online: <http://www.oecd.org/social/family/database.htm> (accessed on 18 September 2020).
- Eurostat. Total Fertility Rate and Age of Women at Birth of First Child. Available online: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Fertility_statistics (accessed on 23 September 2020).
- Maurer, R.R.; Foote, R.H. Maternal ageing and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer. *J. Reprod. Fertil.* **1971**, *25*, 329–341. [\[CrossRef\]](#)
- Miller, P.B.; Charleston, J.S.; Battaglia, D.E.; Klein, N.A.; Soules, M.R. Morphometric analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: Symmetry and relationship with age. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 553–556. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jones, K.P.; Walker, L.C.; Anderson, D.; Lacreuse, A.; Robson, S.L.; Hawkes, K. Depletion of ovarian follicles with age in chimpanzees: Similarities to humans. *Biol. Reprod.* **2007**, *77*, 247–251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jolly, M.; Sebire, N.; Harris, J.; Robinson, S.; Regan, L. The risks associated with pregnancy in women aged 35 years or older. *Hum. Reprod.* **2000**, *15*, 2433–2437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Joseph, K.S.; Allen, A.C.; Dodds, L.; Turner, L.A.; Scott, H.; Liston, R. The perinatal effects of delayed childbearing. *Obstet. Gynecol.* **2005**, *105*, 1410–1418. [\[CrossRef\]](#)
- Kenny, L.C.; Lavender, T.; McNamee, R.; O'Neill, S.M.; Mills, T.; Khashan, A.S. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcome: Evidence from a large contemporary cohort. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56583. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hoffman, M.C.; Jeffers, S.; Carter, J.; Duthely, L.; Cotter, A.; González-Quintero, V.H. Pregnancy at or beyond age 40 years is associated with an increased risk of fetal death and other adverse outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2007**, *196*, e11–e13. [\[CrossRef\]](#)
- Tatone, C. Oocyte senescence: A firm link to age-related female subfertility. *Gynecol. Endocrinol.* **2008**, *24*, 59–63. [\[CrossRef\]](#)
- Tatone, C.; Amicarelli, F.; Carbone, M.C.; Monteleone, P.; Caserta, D.; Marci, R.; Artini, P.G.; Piomboni, P.; Focarelli, R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum. Reprod. Update* **2008**, *14*, 131–142. [\[CrossRef\]](#)
- Byun, K.; Yoo, Y.; Son, M.; Lee, J.; Jeong, G.-B.; Park, Y.M.; Salekdeh, G.H.; Lee, B. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *177*, 44–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bellier, J.; Nokin, M.-J.; Lardé, E.; Karoyan, P.; Peulen, O.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *148*, 200–211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Muronetz, V.I.; Melnikova, A.K.; Seferbekova, Z.N.; Barinova, K.V.; Schmalhausen, E.V. Glycation, Glycolysis, and Neurodegenerative Diseases: Is There Any Connection? *Biochem. Mosc.* **2017**, *82*, 874–886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mano, J. Reactive carbonyl species: Their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *59*, 90–97. [\[CrossRef\]](#)
- Thornalley, P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems—role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* **2008**, *23*, 125–150. [\[CrossRef\]](#)
- Peppas, M.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Aging and glycoxidant stress. *Hormones* **2008**, *7*, 123–132. [\[CrossRef\]](#)
- Shipanova, I.N.; Glomb, M.A.; Nagaraj, R.H. Protein modification by methylglyoxal: Chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *344*, 29–36. [\[CrossRef\]](#)
- Thornalley, P.J. Glyoxalase I—Structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1343–1348. [\[CrossRef\]](#)
- Kuhla, B.; Boeck, K.; Lüth, H.-J.; Schmidt, A.; Weigle, B.; Schmitz, M.; Ogunlade, V.; Münch, G.; Arendt, T. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 815–822. [\[CrossRef\]](#)

23. Shinohara, M.; Thornalley, P.J.; Giardino, I.; Beisswenger, P.; Thorpe, S.R.; Onorato, J.; Brownlee, M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J. Clin. Investig.* **1998**, *101*, 1142–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Thornalley, P.J. The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Asp. Med.* **1993**, *14*, 287–371. [[CrossRef](#)]
25. Tatone, C.; Carbone, M.C.; Campanella, G.; Festuccia, C.; Artini, P.G.; Talesa, V.; Focarelli, R.; Amicarelli, F. Female reproductive dysfunction during ageing: Role of methylglyoxal in the formation of advanced glycation endproducts in ovaries of reproductively-aged mice. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2010**, *24*, 63–72. [[PubMed](#)]
26. Merhi, Z. Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 135–145. [[CrossRef](#)]
27. Sauer, M.V. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 1136–1143. [[CrossRef](#)]
28. Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Simm, A.; Henning, C.; Glomb, M.A.; Gürke, J.; Schindler, M.; Fischer, B.; Navarrete Santos, A. Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. *Reproduction* **2014**, *148*, 169–178. [[CrossRef](#)]
29. Seeling, T.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grybel, K.J.; Gürke, J.; Pendzialek, S.M.; Schindler, M.; Simm, A.; Navarrete Santos, A. Glyoxalase 1 expression is downregulated in preimplantation blastocysts of diabetic rabbits. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54* (Suppl. S3), 4–11. [[CrossRef](#)]
30. Fischer, B.; Chavatte-Palmer, P.; Viebahn, C.; Navarrete Santos, A.; Duranthon, V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* **2012**, *144*, 1–10. [[CrossRef](#)]
31. Navarrete Santos, A.; Augustin, R.; Lazzari, G.; Galli, C.; Sreenan, J.M.; Fischer, B. The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *271*, 753–760. [[CrossRef](#)]
32. Tonack, S.; Fischer, B.; Navarrete Santos, A. Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *Anatomy Embryol.* **2004**, *208*, 225–230. [[CrossRef](#)]
33. Pendzialek, S.M.; Knelangen, J.M.; Schindler, M.; Gürke, J.; Grybel, K.J.; Gocza, E.; Fischer, B.; Navarrete Santos, A. Trophoblastic microRNAs are downregulated in a diabetic pregnancy through an inhibition of Drosha. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *480*, 167–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pendzialek, S.M.; Schindler, M.; Plösch, T.; Gürke, J.; Haucke, E.; Hecht, S.; Fischer, B.; Santos, A.N. Cholesterol metabolism in rabbit blastocysts under maternal diabetes. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29*, 1921–1931. [[CrossRef](#)]
35. Bélanger, M.; Yang, J.; Petit, J.-M.; Laroche, T.; Magistretti, P.J.; Allaman, I. Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 18338–18352. [[CrossRef](#)]
36. Arai, M.; Nihonmatsu-Kikuchi, N.; Itokawa, M.; Rabbani, N.; Thornalley, P.J. Measurement of glyoxalase activities. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 491–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kandaraki, E.; Chatzigeorgiou, A.; Piperi, C.; Palioura, E.; Palimeri, S.; Korkolopoulou, P.; Koutsilieris, M.; Papavassiliou, A.G. Reduced ovarian glyoxalase-I activity by dietary glycotoxins and androgen excess: A causative link to polycystic ovarian syndrome. *Mol. Med.* **2012**, *18*, 1183–1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Stratmann, B.; Goldstein, B.; Thornalley, P.J.; Rabbani, N.; Tschoepe, D. Intracellular Accumulation of Methylglyoxal by Glyoxalase 1 Knock Down Alters Collagen Homeostasis in L6 Myoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nigro, C.; Leone, A.; Longo, M.; Prevenzano, I.; Fleming, T.H.; Nicolò, A.; Parrillo, L.; Spinelli, R.; Formisano, P.; Nawroth, P.P.; et al. Methylglyoxal accumulation de-regulates HoxA5 expression, thereby impairing angiogenesis in glyoxalase 1 knock-down mouse aortic endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 73–85. [[CrossRef](#)]
40. Vannuccini, S.; Clifton, V.L.; Fraser, I.S.; Taylor, H.S.; Critchley, H.; Giudice, L.C.; Petraglia, F. Infertility and reproductive disorders: Impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. *Hum. Reprod. Update* **2016**, *22*, 104–115. [[CrossRef](#)]
41. Diamanti-Kandarakis, E.; Piperi, C.; Patsouris, E.; Korkolopoulou, P.; Panidis, D.; Pawelczyk, L.; Papavassiliou, A.G.; Duleba, A.J. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem. Cell Biol.* **2007**, *127*, 581–589. [[CrossRef](#)]

42. Papachroni, K.K.; Piperi, C.; Levidou, G.; Korkolopoulou, P.; Pawelczyk, L.; Diamanti-Kandarakis, E.; Papavassiliou, A.G. Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2460–2469. [[CrossRef](#)]
43. Tatone, C.; Amicarelli, F. The aging ovary—The poor granulosa cells. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 12–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Matsumine, M.; Shibata, N.; Ishitani, K.; Kobayashi, M.; Ohta, H. Pentosidine accumulation in human oocytes and their correlation to age-related apoptosis. *Acta Histochem. Cytochem.* **2008**, *41*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Di Emidio, G.; Santini, S.J.; D'Alessandro, A.M.; Vetuschi, A.; Sferra, R.; Artini, P.G.; Carta, G.; Falone, S.; Amicarelli, F.; Tatone, C. SIRT1 participates in the response to methylglyoxal-dependent glycativ stress in mouse oocytes and ovary. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 1389–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, S.; He, G.; Chen, M.; Zuo, T.; Xu, W.; Liu, X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4371714. [[CrossRef](#)]
47. Al-Gubory, K.H.; Bolifraud, P.; Garrel, C. Regulation of key antioxidant enzymatic systems in the sheep endometrium by ovarian steroids. *Endocrinology* **2008**, *149*, 4428–4434. [[CrossRef](#)]
48. ProteinSimple. Simple Western Assays: Immunoassay. Available online: https://www.proteinsimple.com/simple_western_assays.html (accessed on 18 September 2020).

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich meiner geschätzten Doktormutter, apl. Prof. Dr. Anne Navarrete Santos, meinen aufrichtigen Dank für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zur Anfertigung am Institut für Anatomie und Zellbiologie aussprechen. Ihre fachliche Expertise, Ihre unermüdliche Unterstützung und Ihr stetes Vertrauen in meine Fähigkeiten waren für den Erfolg dieser Dissertation von entscheidender Bedeutung. Unter ihrer Anleitung konnte ich sowohl wissenschaftlich, als auch persönlich wachsen.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin, Dr. Maria Schindler. Ihre engagierte Betreuung von den Kinderschuhen im Labor bis zur wissenschaftlichen Diskussion waren von unschätzbarem Wert für meine Arbeit. Ihre Unterstützung und Ihr offenes Ohr haben mir stets geholfen, die Herausforderungen mit Zuversicht zu meistern. Ihre Geduld und Ihre prägnanten Anregungen haben wesentlich dazu beigetragen, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form abgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus bin ich dankbar über die freundschaftliche Beziehung, die sich im Laufe dieser Arbeit entwickelt hat.

Mein herzlicher Dank geht auch an meine liebe Arbeitsgemeinschaft. Die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit, das Engagement und die gegenseitige Unterstützung waren für den Erfolg dieses Projekts entscheidend.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie. Eure Geduld, Unterstützung und kontinuierliche Ermutigung während dieser langen und oft herausfordernden Zeit waren eine unschätzbare Stütze. Ohne euren Rückhalt wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ich bin dankbar, so ein starkes Netzwerk an Menschen um mich zu haben.