



Софийски университет „Св. Климент Охридски“
Биологически факултет
Катедра „Цитология, хистология и ембриология“

**Оценка на фенотипни и генетични биомаркери
на човешки гранулозо-лутеинни клетки и фоликулна течност
за успешно приложение
на процедури за асистирана репродукция (АРТ)**

**АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд**

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
в професионално направление 4.3. Биологически науки
(Клетъчна биология)

на д-р Георги Иванов Николов

Научен консултант: проф. д-р Росица Конакчиева
Научно жури: проф. д-р Х. Гагов, проф. д-р С. Томов,
проф. д-р С. Хайрабедян, доц. д-р П. Тодоров, проф. д-р Р. Конакчиева

София, 2018 г.

Дисертационният труд е написан на 116 стр., илюстриран е с 32 фигури и 11 таблици. В библиографския списък са цитирани 195 литературни източника. Всички пациенти и контроли са третирани в МЦ „РепроБиоМед“ – София, а обработката на материалите и експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в МЦ „РепроБиоМед“, ИБИР-БАН и Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Публичната защитана дисертационния труд ще се състои на г. от часа в Заседателна зала на Биологически факултет съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в СУ „Свети Климент Охридски“ на открито заседание на научно жури в състав:

1. проф. д-р Христо Гагов, дбн; БФ на СУ „Св. Кл. Охридски”,
2. проф. д-р Славчо Томов, дмн; МУ Плевен,
3. проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн; ИБИР - БАН
4. доц. д-р Пламен Тодоров, дбн; ИБИР – БАН;
5. проф. д-р Росица Конакчиева, дбн; БФ на СУ „Св. Кл. Охридски”

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в канцеларията, както и на web страницата на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ .

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците са същите както в дисертационния труд и някои от тях липсват или не съответстват по поредност в този автореферат.

Използвани съкращения

3.1. На латиница:

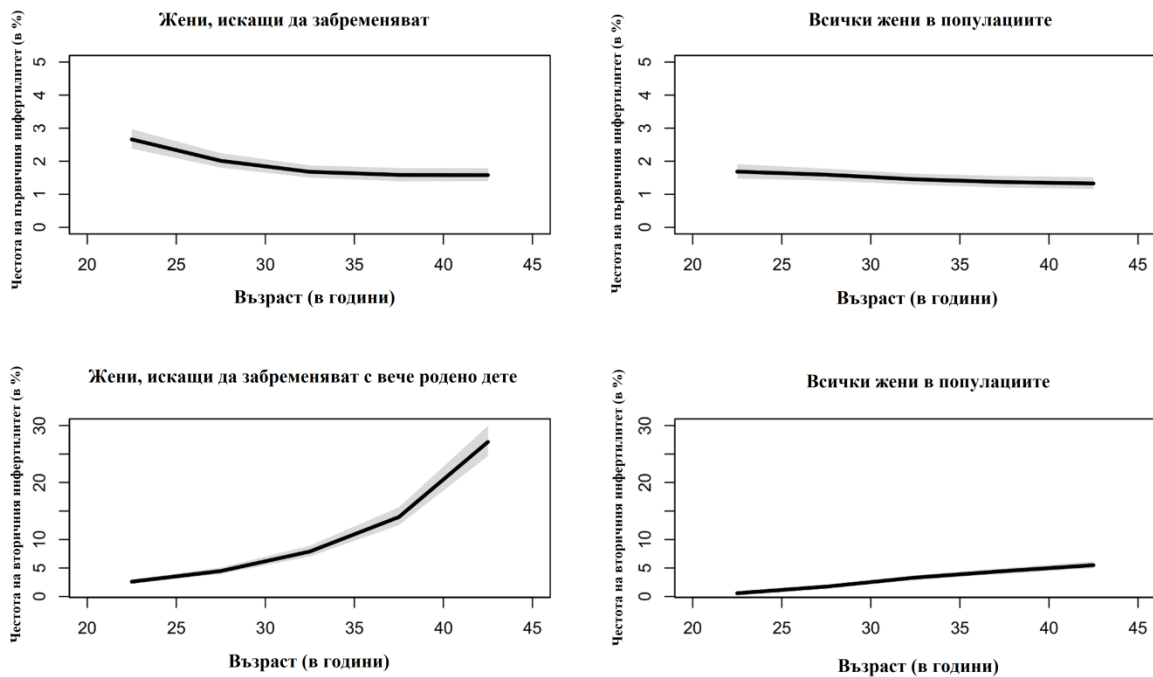
1. ART – assisted reproductive technology/technologies
2. CAT – catalase
3. CCs – cumulus cells
4. COHS – controlled ovarian (hyper)stimulation
5. DAPI – 4',6-diamino-2-phenylindol
6. FF(s) – follicular fluid(s)
7. FI – fertilization index
8. GLCs – granulosa-luteinized cells
9. GnRH – gonadotropin releasing hormone
10. HMG – human menopausal gonadotropin
11. IFN- γ – interferon gamma
12. ICSI – intracytoplasmic sperm injection
13. IVF-ET – in vitro fertilization and embryo transfer
14. LOX – lysyl oxidase
15. MEL – melatonin
16. MI / MII – metaphase I / II (oocyte)
17. MT / MTNR – melatonin receptor
18. NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
19. OD – optical density
20. PCOS – polycystic ovary syndrome
21. PGK1 – phosphoglycerate kinase 1
22. ROS – reactive oxygen species
23. SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
24. SOD – superoxide dismutase
25. TNF- α – tumour necrosis factor-alpha
26. TVS – transvaginal sonography
27. ZP – zona pellucida

3.2. На кирилица:

1. ВПО – външни полови органи
2. ГК – гранулозни клетки
3. ИАТ – Изпълнителна агенция по трансплантация
4. КОХС – контролирана овариална (хипер)стимулация
5. КОК – кумулусно-овоцитни комплекси
6. МЦ – менструален цикъл

1. Въведение

Безплодието при човека е сравнително често явление. По данни на СЗО, на базата на системно проучване на публикувани данни в 277 демографски и репродуктивно-медицински изследвания, честотата на първичния стерилитет измежду всички жени в репродуктивна възраст е около 2%, а на вторичния достига до 10.5%.⁽¹⁾ В тази популация се включват и жени, които не са искали и не искат да забременяват. Когато се фокусираме върху популацията на искащите да имат дете – процентите са значително по-високи и са силно зависими от възрастта на жената (Фиг. 1)



Фиг. 1 Честота на първичния и вторичния инфертилитет (глобално) по възраст⁽¹⁾

През последните няколко десетилетия средната възраст за раждане на първо дете нараства, особено в добре развитите страни. По данни на Централното разузнавателно управление на САЩ (от 2014-2015 г.), в редица развити страни, тя е около и над 30 г. (Япония, Германия, Австралия и др., включително България)⁽²⁾. От посоченото става ясно, че проблемът с човешкото безплодие е значим. У нас няма добре извършени проучвания по въпроса, но се счита, че двойките с проблемно забременяване са около

12-14% от тези в репродуктивна възраст, респ. по груби предположения се посочват цифри в интервала от 120 до 250 хиляди двойки.

Немалка част от двойките с репродуктивни проблеми биват подлагани на асистирана репродукция. По данни на Изпълнителната агенция по трансплантация (ИАТ), през 2017 г. са взети репродуктивни клетки (като от мъже, така и от жени) на 22,258 лица, като е работено с 55,416 овоцита и 17,670 единици семенна течност, а са създадени 45,377 предимплантационни ембриона ⁽³⁾, което, впрочем, поставя България на едно от водещите места в Европа по брой процедури на един милион население.

Така или иначе, успеваемостта на методите за асистирана репродукция е относително ниска – в рамките на 8-12% за инсеминациите и 15-35% за ин витро методиките, като тя е силно зависима от редица фактори, но най-вече от възрастта на жените и овариалния им резерв. Редица други негативни фактори са: наличието на предходни оперативни интервенции върху яйчниците, ендометриозата, тазово-възпалителната болест, хипотрофичния ендометриум, някои генетични фактори (напр. вродените тромбофилии), както и редица имунологични състояния, имащи отношение към фоликуло- и овогенезата и/или към имплантацията.

Имунологично обусловеното безплодие е силно дискутабилна област през последните 2-3 десетилетия. Редица изследвания в тази насока сочат, че имунната система играе съществена роля в редица процеси от физиологията на яйчника (фоликулогенеза, овогенеза, овулация, оформяне и функциониране на жълтото тяло, овариалната онкогенеза и др.). Ето защо считаме, че проучвания в тази насока при жени с безплодие биха довели да по-добро разбиране на тези процеси, а също и до по-добра прогноза за успеваемостта на методите за асистирана репродукция и до възможност за тяхното оптимизиране.

2. Мотиви, цел и задачи

Дисертационният труд е мотивиран от разбирането за ключовото значение на интрафоликуларните междуклетъчни сигнални взаимодействия, формиращи потенциала на яйчниковия фоликул и качеството на зрелия овоцит, който е обект на процедурите за ин витро оплождане. *Основна цел* е проучването на потенциални молекулярно-генетични и имунологични биомаркери при жени с безплодие което би довело до по-добро разбиране на тези процеси, а също и до по-добра прогноза за успеваемостта на методите за асистирана репродукция и до възможност за тяхното оптимизиране.

Една от хипотезите, подложени на верифициране, е свързана с допускането, че GLCs на преовулаторните фоликули могат да представляват важен източник на таргетни молекули при случаи на имунологично безплодие при инфертилни жени. За проучване на тази хипотеза бяха проведени изследвания върху фенотипни характеристики на GLCs и състава на фоликулната течност от преовулаторни фоликули, имащи отношение към наличието на анти-GLC антитела при безплодни пациенти, участващи в програма за асистирана репродукция чрез ин витро оплождане.

Основна задача поставена в дисертационния труд беше свързана с проучването на корелативни зависимости между наличието на анти-гранулозни антитела, честотата (%) на апоптоичните гранулоза-лутеинизирани клетки и нивата на TNF- α и IFN- γ във фоликулни течности на инфертилни жени. Проведен беше корелационен анализ на наблюдаваните промени с резултатите от контролираните овариални стимулации (брой добити овоцити) и от процедурите за фертилизация ин витро при тези жени по отношение на фертизационен индекс, респ. броя и качеството на получените ембриони за вътрематочен трансфер.

Друга задача беше фокусирана върху верифициране на тезата, че матурационната компетентност на развиващия се овоцит зависи от генетичния профил на заобикалящите го гранулозни и кумулусни клетки. В тази връзка беше проведен сравнителен експресионен анализ на генните транскрипти за някои важни протеини в кумулусните клетки, добити от овоцит-кумулусни комплекси при пациенти с първичен и вторичен стерилитет, подходящи за ICSI процедура.

В изпълнение на поставените основни задачи в съответствие с главната цел на дисертационния труд бяха определени и следните експериментални задачи:

1. Подбор и разпределение на пациенти по фактор на безплодие.
2. Провеждане на контролирана овариална хиперстимулация (COHS) по подходящ протокол, добив на овоцити, стандартно ин витро оплождане или интраовоцитно инжектиране на сперматозоиди (ICSI), култивиране на предимплантационни ембриони и извършване на вътрематочен ембриотрансфер.
3. Обработка на фоликуларни течности и изолиране на гранулозни и кумулусни клетки; подготовка на антигени за ELISA и имуноблотинг.
4. Изследване наличието на анти-GLC антитела във фоликуларни течности и серуми от пациенти и контроли.
5. Провеждане на корелационни анализи на отговора към COHS, фертилизационния индекс и наличието на анти-GLC антитела.
6. Изследване на зависимостта между активността на антиоксидантните ензими супероксид-дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT) и степента на апоптоза в GLCs.
7. Изследване на зависимостта между наличието на анти-GLC антитела (AGA), апоптоза на GLCs и нива на цитокините TNF- α и IFN- γ във фоликулни течности на инферилини жени.
8. Изследване на нивото на цитокини във фоликулна течност и апоптозата на GLCs при жени с овариален фактор за безплодие, подложени на контролирана овариална хиперстимулация и ин витро оплождане.
9. Изследване на потенциални генни биомаркери за предикция качеството на овоцитите.
10. Установяване наличието на функционални рецептори за мелатонин в клетъчни култури от GLC.
11. Изследване ефекта на мелатонин върху експресията на P450 ароматаза.

3. Материали и методи

3.1. Пациенти и контроли

В проучването бяха включени 101 жени (пациентска група) със средна възраст 31.9 +/- 4.5 г. (22 – 42 г.), участващи в програмата за асистирана репродукция на Медицински център „РепроБиоМед“ – София, с цел извършване на контролирана овариална хиперстимулация (КОХС) и ин витро оплождане (IVF - класическо или чрез интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди, ICSI) и последващ интраутеринен трансфер на ембриони (ЕТ). Контролната група се състои от 33 фертилни жени на средна възраст 31.5 +/- 5.8 г. (19 – 42 г.), а за изследване експресията на мелатониновите рецептори (MT1, MT2), α -tubulin и P450arom под *in vitro* въздействието на мелатонин, бяха ползвани FFs на три здрави, фертилни донорки на овоцити.

В изследваната пациентска група бяха включвани жени с безплодие, налагащо извършване на асистирана репродукция чрез ин витро оплождане (табл. 1), на възраст до 42 г. включително, с изходни (на ден 1 – 3^{ти} от менструалния цикъл преди програмирането с контрацептив или гестаген) нива на FSH и LH < 12.5 mIU/ml и липса на антрални фоликули при трансвагинално сонографско изследване (TVS) > 10 mm.

Табл. 1. Разпределение на пациентите по фактор за безплодие; в групата на комбинираните фактори са включени жени, при които има повече от един фактор налагащ АРТ чрез IVF-ЕТ (овариален и/или мъжки и/или тубарен)

Фактор за безплодие	Средна възраст	Брой жени
Тубарен фактор	30 (22 – 40)	30
Овариален фактор	32 (24 – 39)	16
Мъжки фактор	30 (19 - 38)	17
Комбинирани фактори	33 (24 - 42)	38
	31.9	101

За жени с овариален фактор бяха приемани всички с реализиран LUF syndrome (luteinized unruptured follicle syndrome), ановулация, намален яйчников резерв (на база нивата на FSH 1-3 ден от МЦ), анамнеза за предишен лош отговор към стимулация,

както и такива с предходна хирургична интервенция върху яйчниците поради овариални кисти.

Пациентите бяха разделени на подгрупи според:

- Овариалния отговор към КОХС – такива с по-малко от пет фоликула <15 mm в деня на фоликулната пункция и/или с 3 и по-малко извадени овоците (poor responders) (n = 22); и пациенти с повече от пет фоликула < 15 mm в деня на фоликулната пункция и/или с 4 и повече извадени овоците (good responders) (n = 79);
- Фертилизационния индекс (FI) – нисък при <50% оплодени овоцити (n = 31) и висок –при >50% оплодени овоцити (n = 70).

Серум и фоликуларна течност (макроскопски неконтаминирана с кръв) бяха взети от всеки един пациент в деня на фоликулната пункция след подписано информирано съгласие. Контролните серуми (n = 33) бяха взети от здрави, фертилни жени с нормален менструален цикъл на средна възраст 31.5 +/- 5.8 г. (19 – 42 г.). Одобрение за това проучване бе взето от болнична етична комисия.

3.2. Използвани методи

3.2.1. Протокол за контролирана овариална хиперстимулация

Контролирана овариална стимулация бе проведена по къс протокол с човешки менопаузален гонадотропин (HMG) и/или рекомбинантен фоликулостимулиращ хормон (recFSH) и GnRH агонист до деня на тригериране (резумпция на мейозата), за което бе ползван човешки уринарен хорион гонадотропин 35-36 часа преди извършване на пункцията на фоликулите под ехографски контрол.

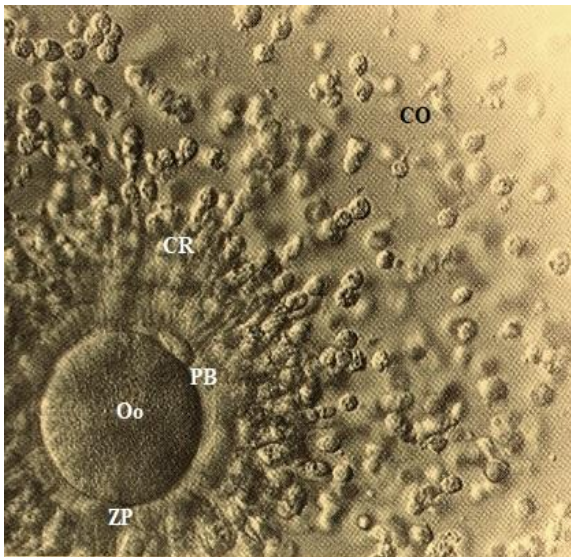
3.2.2. Пункция и аспирация на фоликули

Самата фоликулна пункция бе осъществявана по стандартен начин – след премедикация/седирание и дезинфекция на ВПО и влагалището бе поставяна локална парацервикална анестезия с 10 ml 1% разтвор на Lidocain и под постоянен трансвагинален сонографски контрол се пунктираха всички видими фоликули с

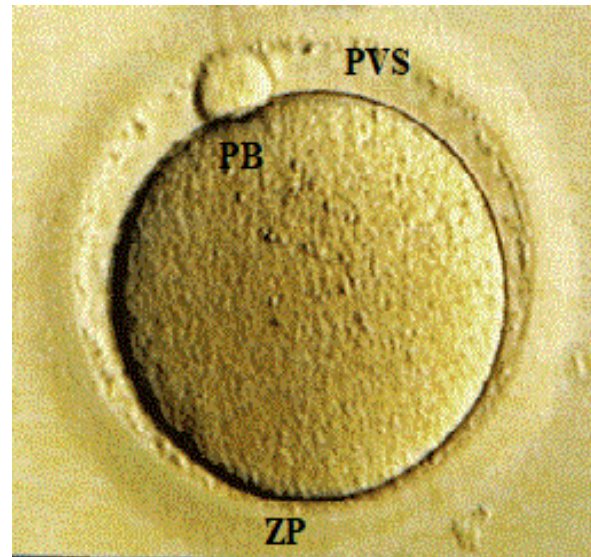
размери над 10 мм. Аспирацията на фоликулите се осъществяваше с помощта на 17G / 330 mm пункционни игли и аспирационна помпа при отрицателно налягане от 180-200 mmHg. Аспиратирте се събираха в 10 ml полистиренови епруветки с обло дъно.

3.2.3. Идентифициране на кумулусно-овоцитни комплекси

Огледът на аспиратите за кумулусно-овоцитни комплекси (КОК) се провеждаше в ламинарен бокс (при чистота на въздуха от grade A), върху термостатиран плот (на 37 °C) с помощта на стерео микроскоп при увеличение от 10-40 x. Идентифицираните КОК (Фиг. 8) се прехвърляха в петри с 6-7 ml промивна среда, буферирана с HEPES. Кумулусната маса бе редуцирана механично чрез орязване с помощта на 27 G игли, ползвани като скалпел. Изрязаните кумулусни маси бяха събирани индивидуално от всяка жени и всеки овоцит. Фоликуларни течности, видимо неконтаминирани с кръв бяха събирани от всяка жена и ползвани, както е описано по-долу.



Фиг. 8 Кумулусно-овоцитен комплекс (КОК): видими са *zona pellucida* (ZP), ооплазмата (Oo), полярното тяло (PB), *corona radiata* (CR) и диспергираните клетки на *cumulus oophorus* (CO) – зрял МП овоцити (стерео микроскопия, 40x).



Фиг. 9 Зрял МП овоцит: видими са *zona pellucida* (ZP), ооплазмата, полярното тяло (PB), перивителинното пространство (PVS) (след обработка с хиалуронидаза (80 IU / ml); инвертна микроскопия, 200x).

3.2.4. Ин витро фертилизация (класическа IVF)

След разпределение на КОК (по 1 - 3) и инициална култивация за 3-5 часа при 37 °C, 5.5% CO₂, всяко кладенче бе инсеминирано с около 100,000 сперматозоида / овоцит / ml от предварително приготвена суспензия на сперматозоиди (т.е. с по около 70,000 – 200,000 сперматозоида). Самата суспензия бе приготвяна чрез градиентно сепариране в Percoll (Top layer – 40%, Bottom layer – 80%) за 15-20 минути при 300 g, последвано от двукратно измиване с прясна промивна среда (Flushing medium, FertiPro, Belgium) и центрофугиране за 5 мин при 300 g. Получения след второто центрофугиране пелет бе надслояван с прясна IVF среда и оставян в инкубатор при 37 °C, 5.5% CO₂ за т.нар. swim-up. Финалната суспензия бе стандартизирана до 5-10 x 10⁶/ml.

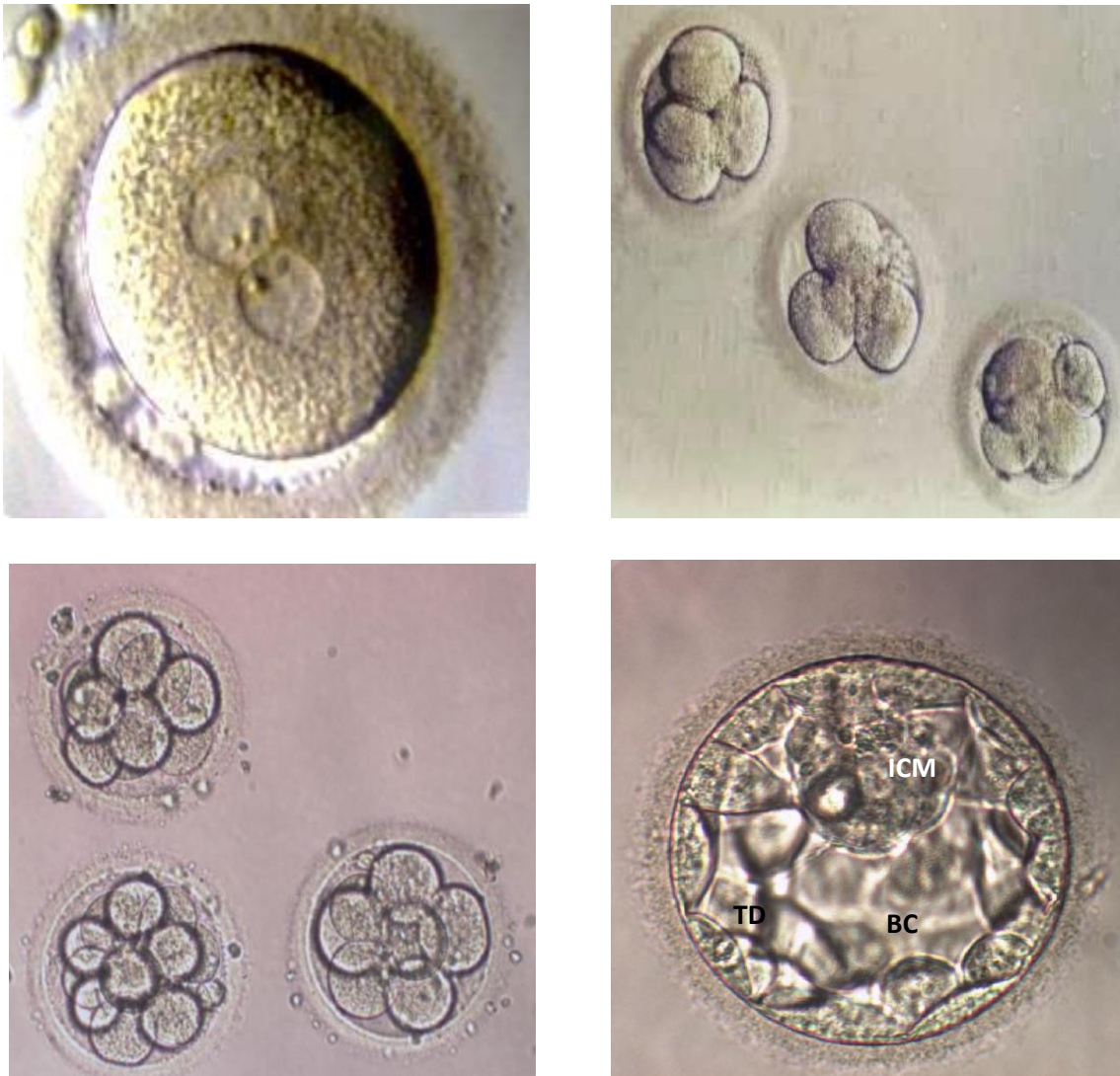
3.2.5. Интраовоцитно инжектиране на сперматозоиди (ICSI)

ICSI с помощта на микроманипулационна техника под инвертно микроскопиране бе извършвано след инициалното инкубиране на КОК за 3-4 часа и денудация на овоцитите с хиалуронидаза (80 IU / ml) и серийно пипетиране през калибрирани пастърови пипети с намалаващ лумен от 250 µm до 140 µm (стрипинг пипети) до чиста *zona pellucida* (Фиг. 9). Получените метафаза-II овоцити бяха разпределяни в 10-15 µl капки Flushing среда (с HEPES), разположени около централна капка 7% PVP (15-20 µl, 7% поливинил пиролidon), под минерално олио. В капката с PVP бе добавяна суспензия от сперматозоиди в обем максимум до 1-2 µl. Самото ICSI бе извършвано по обичаен начин, с единични имобилизирани сперматозоиди с помощта на държаща (Holding pipette, 30°) и инжекционна (Injection pipette, 30°, with spike) пипета.

3.2.6. Култивиране, оценка на фертилизацията и развитието

Оплодените чрез класическо IVF или чрез ICSI овоцити се култивираха в IVF среда за 18-20 часа, след което се оценяваше фертилизацията – наличие на два пронуклеуса (2 PN) (Фиг. 12 А). Всички овоцити с 2 PN бяха идентифицирани и премествани в свежа хранителна среда и култивирани до ден 3 или 5, в зависимост от броя и развитието им (Фиг. 12 В – 12 D). В деня на ембриотрансфера (ET) бяха

оценявани по скорова система ⁽⁴⁾, като за ЕТ се избираха (по възможност) само ембриони с високо качество и се трансферираха в маточната кухина с помощта на ембрио-катетър. Броят на върнатите ембриони бе съобразяван с желанието на пациентите, тяхната възраст и поредност на процедурата (но максимум до 3 ембриона).



Фиг. 12 Предимплантационни ембриони в различен стадий на развитие:
(инвертно микрокопиране, 200 / 300 x)

- A: Ден 1: зигота с два пронуклеуса (2 PN);
- B: Ден 2: четириклетъчни ембриони (10-15% фрагментация на средния ембрион);
- C: Ден 3: ембриони на стадий 8-10 клетки;
- D: Ден 5: Ранна бластоциста – различават се ясно вътрешната клетъчна маса (ICM), трофктодермата (ТВ) и бластоцела (BC)

За оплодени овоцити в контекста на настоящите проучвания, респ. за изчисляване на ферилизационния индекс се считаха всички овоцити с поне 2 PN.

$$FI = FO / AO * 100 \text{ (в проценти),}$$

(където FI – фертилизационен индекс, FO – оплодени овоцити, AO – всички овоцити)

За ембриони с високо качество се приемаха тези със характеристиката посочена в таблица 2.

Табл. 2. Характеристики на ембрионите с високо качество според деня от развитието им

	Ден 2	Ден 3	Ден 5
Развитие	2 - 6 бластомера	6 - 12 бластомера	От компактизация до експандирала бластоциста
Фрагментация	< 15%	< 25%	-
Бластомери	Четен брой, еднакви	Четен брой, еднакви	Пълна компактизация или добре оформени ICM и трофектодерма
Цитоплазма	Светла, слабо гранулирана	Светла, слабо гранулирана	-

3.2.7. Обработка на фоликуларни течности и изолиране на гранулозни и кумулусни клетки

Събраните фоликуларни течности (FFs), видимо (макроскопски) неконтаминирани с кръв, бяха събирани индивидуално от всеки пациент и центрофугирани за 10 min при 200×g. Полученият пелет бе ресуспендиран в HAM's F10, надслоен върху HISTOPAQUE-1077 и повторно центрофугиран за 30 min при 300 × g, за да бъдат сепарирани гранулозните клетки от еритроцитите. GLCs бяха взети от интерфазата и промити с PBS (pH 7.2) и замразени на -20 °C. Останалите FFs бяха разпределени в контейнери и замразени на -20 °C и -80 °C за по-нататъшна употреба.

Кумулусните клетки (CCs) бяха изолирани от индивидуални кумулусно-овоцитни комплекси от всяка една жена, разпределени съобразно зрелостта на овоцита

(незрели – на стадий герминативно мехурче - G.V. или метафаза 1 - MI; зрели – метафаза 2 (MII) овоцити). Клетките бяха фиксирани и обработени след това по подобие на GLCs.

3.2.8. Подготовка на антигени за ELISA и имуноблотинг

Размразени GLCs, получени от поне 15 жени бяха събрани, промити в PBS (pH 7.2) и белтъчната съставка бе екстрахирана с 1% NONIDET (NP-40) / 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) в PBS (pH 7.2) за 2 ч. при 4 °C с вортексиране на 10 мин. Неразтворимият материал бе пелетиран чрез центрофугиране за 10 мин. при 10 000 x g на 4 °C. Концентрацията на белтъка от супернатанта бе определена по метода на Lowry⁽⁵⁾ и ползвана за антиген при ензим-свързания имуносорбентен анализ (ELISA).

За получаване на цялоклетъчен (whole-cell) лизат за имуноблотинг, прясно изолираните GLCs от поне три различни пациентки, бяха промити в Tris-буфериран физиологичен разтвор (TBS, pH 8.0) и клетъчната виталност бе определена чрез оцветяване с трипаново синьо. Концентрацията бе коригирана до 24×10^3 живи клетки на милилитър, след което се добави буфер (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 0.025% bromophenol blue; 5% β -mercaptoethanol) за натриев додецил сулфат-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE). Разтворът бе нагрят за 7 мин. на 100 °C и полученият клетъчен (whole-cell) лизат се центрофугира за 10 мин. при 10 000 x g на 4 °C, като се отдели супернатанта.

3.2.9. Морфологична оценка на апоптозата

Установяването на апоптоза в GLCs бе извършена според методиката описана от Dineva *et al.*, 2004.⁽⁶⁾

Фиксираните клетки бяха пермеабилizирани с 0.1% Triton X-100 в PBS, промити с PBS и оцветени с DAPI (0.1 μ g/ml в PBS) за 30 min. След измиването клетките бяха включени с Mowiol. Морфологичните характеристики на апоптозата като хроматинова кондензация и/или ядрена фрагментация бяха идентифицирани и изброени в случайно избрани полета измежду 800 клетки; изчислен бе процентът на апоптозни клетки.

3.2.10. Количествено определяне на цитокини

Human TNF- α и Human IFN- γ kits бяха използвани за измерване на съответните цитокини във фоликулните течности (FFs) на изследваните инфертилни жени, съгласно протоколите на производителя.

Накратко, Human IFN- γ , TNF- α стандарти, в серийни разреждания, както и неразредени FFs проби (100 μ l/well), бяха накапвани в 96 кладенчови плаки, покрити с anti-human TNF- α и anti-human IFN- γ моноклонални антитела и инкубирани през нощта при 4 °C. След промиване (5 \times 2 min), се пристъпи към инкубация с биотин конюгирани anti-TNF- α и anti-IFN- γ моноклонални антитела (60 min при стайна температура), последвано от инкубация със стрептавидин конюгирана пероксидаза (30 min при стайна температура). Цветната реакция бе иницирана с TMB субстрат (15 min при стайна температура) и прекъсната с стоп-разтвор според инструкциите.

Оптичестката плътност бе установена при 450 nm с помощта на microplate Reader. Оптичестките плътности, получени за съответните разреждания на стандартите, бяха използвани за изграждане на стандартна крива, от която бяха изчислени концентрациите на human TNF- α и human IFN- γ във FFs в pg/ml. Чувствителността на метода бе 4 pg/ml както за human TNF- α , така и за human IFN- γ .

3.2.11. ELISA при FFs и серуми

Наличието на anti-GLC антитела (AGA) във FFs и серуми на пациенти и контроли бяха количествено определени чрез ELISA. Подходящите концентрации на антиген, серум и anti-human Ig conjugate бяха определени чрез титруване в серийни разреждания предварително.

Накратко, плаките бяха покрити с GLCs антиген (0.5 μ g/well) и инкубирани през нощта при 4 °C и след това блокирани (0.1% Tween-20 в PBS) за 1 ч. при стайна температура. Фоликулните течности бяха разредени 1:50 в промивен буфер и след инкубация за 1 час, плаките бяха измивани трикратно, след което бе добавен anti-human immunoglobulin peroxidase conjugate разреден 1:7500. Плаките се инкубираха за 1 час на стайна температура. Кладенчетата бяха измити трикратно, след което проявяването на

пероксидазата бе извършено с добавяне на пероксидазен субстрат (0.05M цитратно-фосфатен буфер, pH 5.0 + 0.0004 g/ml o-phenylenediamine (OPD)); оптичката плътност (OD) без измерена с помощта на ELISA plate reader при 492 nm.

3.2.12. SDS-PAGE и Western blotting

Цялостен-GLC лизат (20 µg) бе сепариран в 12% SDS-PAGE и прехвърлен върху нитроцелулозна мембрана (0.45 µm pore size). Мембраната бе нарязана на ленти и блокирана с blocking buffer (BB) (5% обезмаслено сухо мляко, 0.05% Tween-20 в TBS (pH 8.0)) за една нощ. Оптималната концентрация на серум и второ антитяло бе определена чрез титриране в серийни разреждания. Серумните проби (на пациенти и контроли) бяха инкубирани с мембранните ленти при разреждане 1:400 в BB за 2 часа на стайна температура с разклащане.

Блотовете се измиха трикратно по 10 минути в промивен буфер (0.1% Tween-20 в TBS, pH = 8.0) преди да бъдат инкубирани за 1 час с второто антитяло – кози анти-човешки поливалентен имуноглобулин (α,γ,μ-верига специфичен) конюгиран към алкална фосфатаза (AP) разрежена 1 : 15 000 в BB. Мембраните се промива пак трикратно за по 10 минути в промивен буфер и двукратно по 5 минути в TBS (pH 8.0). Специфичната реакция бе визуализирана чрез алкално-фосфатазен субстрат (AP substrate) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) / nitro blue tetrazolium (NBT). Контроли само с второ антитяло бяха използвани за определяне на фоновата плътност, недължаща се на серумните проби.

Лизатите от кумулусни клетки бяха пуснати в 12% SDS-PAGE гел. Разделените протеини се трансферираха на polyvinylidene fluoride (PVDF) ова мембрана за 45 min на 80–90 V. Блокирани бяха за през нощта с 3% skim-milk-PBS (pH 7.2) при стайна температура и на другия ден се инкубираха с anti-NFκB (1 : 500) антитяло за 2 часа на стайна температура. Измиха се трикратно (по 5 минути) с Tween 20-PBS, pH 7.4, след което се инкубираха за 1 час с анти-миши ALEXA 488 конюгирани антитела. Блотовете се визуализираха с помощта на Ethan DIGE флуоресцентен скенер.

3.2.13. Количествен RT-PCR

Използвани бяха Fastlane Cell RT-PCR Kit и RT-PCR Cyclor. Обратнотранскриптазна полимеразна верижна реакция в реално време бе ползвана за определяне на експресията на лизил оксидазата (LOX) в човешки кумулусни клетки и количествена оценка при пациенти и здрави донори. За позитивна контрола бе ползван PGK1, чиято експресия е доказана в кумулусни клетки. Екстракцията на РНК бе извършена с помощта на Fastlane Cell RT-PCR; 500 ng/реакция бяха ползвани при обратна транскрипция към cDNA с помощта на QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit. Праймерите бяха дизайнвани, ползвайки следните секвенции:

- LOX – fw: 5'- cgg cgg agg aaa act gtc-3';
LOX-re: 5'- tga gca gca ccc tgt gat ca-3';
- PGK1-fw: 5'-att agc cga gcc agc caa aat ag-3';
PGK1-re: 5'- tca tca aaa acc cac cag cct tct-3'

и бяха произведени от Biomers (Germany).

3.2.14. Изследване за супероксид дисмутаза (SOD assay)

Човешки GLCs бяха суспендирани в 150 µl леден фосфатен буфер (5 mM калиев фосфат, pH 7.0, 5 mM EDTA, 10% глицерол, 25 mM фенилметилсулфонил флуорид) и деградирани чрез соникация върху лед (трикратно по 90 сек.). GLCs бяха центрофугирани при 12 000 × g, за 10 min на 4 °C, след което се измери общата активност на SOD в супернатанта чрез nitro-blue tetrazolium (NBT) редукиционен метод според Beauchamp и Fridovich ⁽⁷⁾ (реакционна смес: 56 µM (NBT), 0.01 M метионин, 1.17 µM рибофлавин, 20 µM NaCN и 0.05 M фосфатен буфер, pH 7.8).

Супероксидът бе измерен посредством нарастването на абсорбцията при 560 nm на 30 °C след 6 минутна инкубация от началото на илюминацията. Една единица SOD активност бе дефинирана като количеството ензим нужно за потискане на NBT редукицията с 50% (A560) и бе изразена в единици на милиграм протеин (U/mg protein).

3.2.15. Изследване за каталаза (CAT assay)

Активността на каталазата бе определена чрез мониториране на декомпозицията на 8 mM H₂O₂ при 240 nm. ⁽⁸⁾ Една единица активност е отговорна за декомпозицията на 1 μmol H₂O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹ при 25 °C и pH 7.0. Специфичната активност се изразява в U (mg protein)⁻¹. Количеството на белтъка се определя по метода на Lowry и сътр. ⁽⁵⁾ с използване на говежди серум албумин като стандарт.

3.2.16. Имунофлуоресцентен анализ на специфични клетъчно-експресирани молекули

За имунофлуоресцентен анализ на специфични клетъчни протеини GLC бяха изолирани от фоликуларни течности (FFs) от овоцитни донорки, видимо (макроскопски) неконтаминирани с кръв, чрез Ficoll-Paque Plus gradient medium в присъствието на 0.1 % хиалуронидаза. Изолираните GLCs бяха подложени на 48 часова култивация в DMEM/Ham's F12 medium с добавка на 10% говежди серум (fetal calf serum - FCS) на 37°C и 5% CO₂ в отсъствието или присъствието на мелатонин в 10 nM крайна концентрация.

SDS-PAGE и Western blot анализ бе извършен след вече описаната методика за получаване на GLC лизат, измерване на протеина и стандартизиране. Пробите бяха инкубирани с първични антитела за MEL-1A-R (goat, sc-13179), MEL-1B-R (goat, sc-13174) and P450arom (rabbit, sc-30086) и mouse anti-human α-tubulin antibody (sc-5286). Последва вторична инкубация с антитела за anti-goat, anti-rabbit и anti-mouse IgG-HRP.

Имунофлуоресцентно белязване беше извършвано след фиксация на клетките в края на експеримента с 4% PAF/PBS последвана от или без пермеабилзация с 0.1% Triton X-100/PBS. За визуализация на рецепторите за мелатонин, тубулин-алфа и ароматаза бяха използвани специфичните антитела, цитирани по-горе и използвани за имуноблотовете. Рецепторите за мелатонин са визуализирани посредством реакция с второ антитяло (donkey anti-goat IgG) конюгирано с флуорохром (Cy3); алфа-тубулин беше визуализиран посредством второ антитяло anti-mouse IgG, конюгирано с Alexa

647, ензимът ароматаза посредством второ анти тяло anti-mouse IgG, конюгирано със Cy2. Ядрата бяха контрастирани с DAPI (10 ug/ml) за 5 мин. Предметните стъкла бяха измити и поставени в глицерол: PBS разтвор (1: 9, pH 8.5). Негативните контроли бяха обработени със заместващ блокиращ буфер (1,5% BSA/ PBS) вместо първо анти тяло. Имунофлуоресцентният сигнал беше наблюдаван на конфокален микроскоп (Leica) и анализиран с помощта на Leica Application Suite Advanced Fluorescence software.

3.2.17. Статистически анализ

При ELISA, всички проби (пациенти и контроли) бяха изследвани четирикратно (quadruplicates) и най-малко половината от пациентските и половината контролите бяха изследвани във всяка от плаките с цел подобряване на репродуцируемостта между плаките. Контрола само с второто анти тяло, без поставен серум, бе използвана във всяка плака с цел определяне на фоновата OD недължаща се на серума. Така получената фонова OD бе изваждана от получената при изследване на серуми от пациенти и контроли.

Статистическия анализ се извърши с помощта на компютърен софтуер Statistica, ver.6.0, с използване на дескриптивна статистика и едностранен ANOVA с Newman-Keul's post hoc test. Резултатите бяха представяни като средна стойност +/- SD и статистически значима разлика бе приета при $P < 0.05$.

4. Резултати и дискусия

4.1. Изследване наличието на Anti-GLC антитела в серум на инфертилни жени

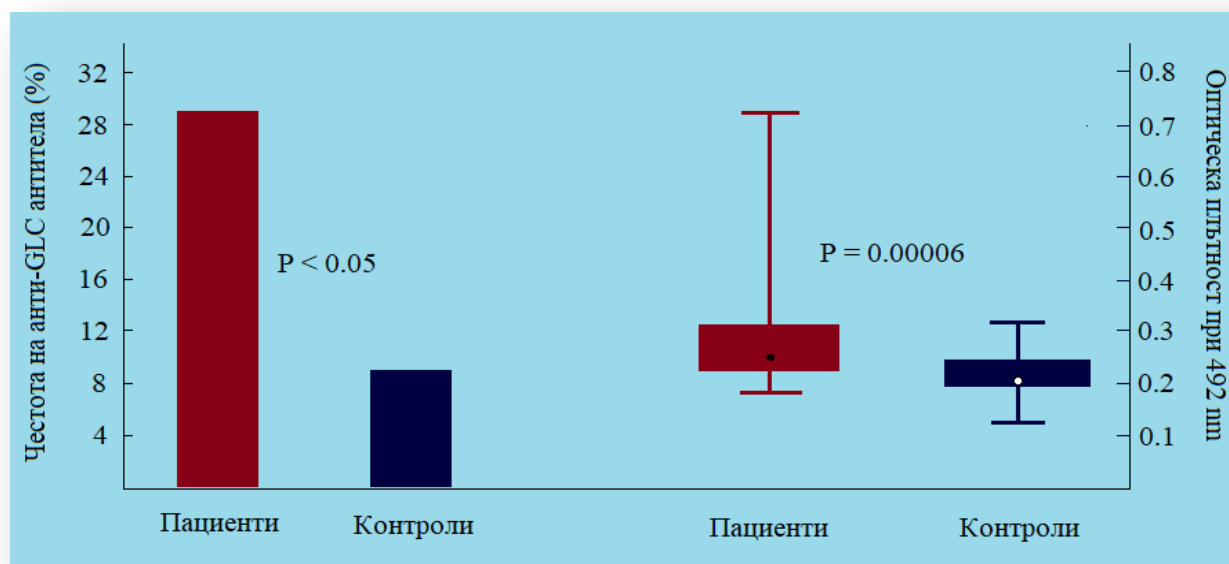
Резултатите от изследванията за anti-GLC антитела в серумни проби чрез ELISA са показани на табл. 3. На базата на граничната стойност (cut-off value) от 2 стандартни отклонения (2 S.D.) над средната стойност при контролите, честота на позитивните за anti-GLC антитела при инфертилните жени бе 28.7% (29/101) в сравнение с 9.1% (3/33) при фертилните контроли $P < 0.05$ (Фиг. 13).

Табл. 3. Честота на анти-GLC антитела в серуми на пациенти и контроли

Характеристики	Групи	
	Инфертилни пациенти (n = 101)	Фертилни контроли (n = 33)
Възраст ^a	31.9 ± 4.5	31.3 ± 5.8
Оптическа плътност ^a	0.280 ± 0.085	0.219 ± 0.036
Позитивни ^b	28.7 % (28/101)	9.1 % (3/33)
Негативни ^b	71.3 % (73/101)	90.0 % (30/33)

^a Средна ± SD

^b 2 SD cut-off



Фиг. 13 Сравнение наличието на анти-GLC антитела при пациенти и контроли. Данните са представени като box-plot диаграма по отношение оптичестките плътности с медиана (кръгче), размаха (отсечка) и кватили 25-75 % (правоъгълник); с прекъсната линия е означена граничната стойност от 2 SD над средната стойност при контролите. Показана е и статистическата значимост.

Данните за връзката между наличието на анти-GLC антитела и отговора към КОХС, респ. фертилизационния индекс са показани в табл. 4.

Както се и очаква т. нар. *low responders* са със статистически значимо по-висока средна възраст и при тях при КОХС броят на пунктираните фоликули и изолираните овоцити е по-нисък. Няма данни обаче, отговорът към КОХС да е в зависимост от наличието или липсата на анти-GLC антитела (табл.4 , фиг.14А).

Табл. 4 Сравнение между подгрупите по отношение на отговора към КОХС и FI

Характеристика	Подгрупи		Р-стойност
	С добър отговор (n = 79)	Със слаб отговор (n = 22)	
Възраст	31.7 ± 4.4	34.2 ± 5.0	0.0246 ^a
Брой фоликули	9.9 ± 4.3	4.4 ± 1.7	0.0001 ^a
Брой овоцити	8.1 ± 3.5	2.9 ± 1.3	0.0001 ^a
Оптическа плътност	0.279 ± 0.079	0.287 ± 0.103	0.685 ^b
Положителни	29.1 % (23/79)	22.7 % (5 /22)	-
Отрицателни	70.9 % (56 /79)	77.3 % (17/22)	-
	Висок ФИ (n = 70)	Нисък ФИ (n = 31)	
Възраст	32.1 ± 4.7	32.4 ± 4.6	0.8089 ^b
Брой оплодени овоцити	4.7 ± 2.5	2.7 ± 2.0	0.0002 ^a
% оплодени овоцити	70 ± 14.9	33.9 ± 21.4	0.0001 ^a
Оптическа плътност	0.264 ± 0.073	0.317 ± 0.099	0.003 ^a
% положителни	15.7 (11/70)	54.8 (17/31)	-
% отрицателни	84.3 (59/70)	45.2 (14/31)	-

^a Статистически значима разлика между подгрупите (P < 0.05)

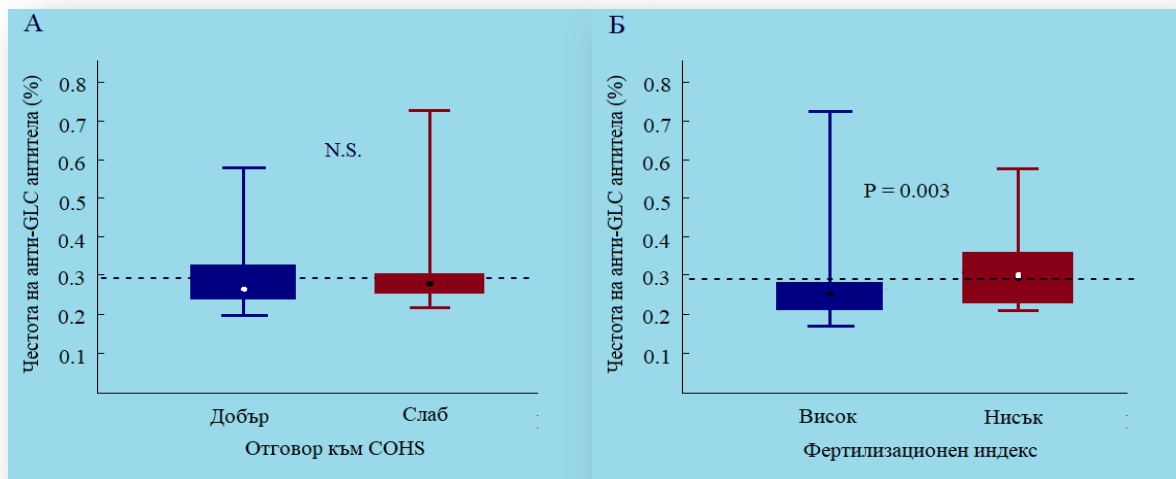
^b Без статистически значима разлика между подгрупите

От друга страна, по отношение на пациентите с висок (n = 70) и нисък (n = 31) фертилизационен индекс, няма статистическа зависимост по отношение на средната възраст, но е налице статистически значима разлика по отношение на наличието на анти-GLC антитела, като в групата с нисък ФИ те се откриват в 54.8 % (17/31), а при тези с висок ФИ само в 15.7% (11/70) от случаите (P = 0.003, табл. 4). Бе установено, че жените позитивни за анти-GLC антитела имат по-нисък ФИ от негативните за анти-GLC (табл. 4, фиг. 14Б).

По отношение на изхода след направен ембриотрансфер, бе открито, че 35.7% (10/28) от позитивните за анти-GLC пациентки позитивираха тест за бременност, последван и от ултразвуково потвърждение на клинична бременност (гестационен сак), но 5 от тези 10 жени реализираха спонтанен аборт през първия триместър, като до

термин доносиха 17.85% (5/28) в сравнение с 32.87% (24/73 доносени бременности) в групата негативни за анти-GLC антитела.

Общо взето изглежда, че наличието на анти-GLC антитела негативно повлиява не толкова количествено (отговора към КОХС), колкото качествено фоликулогенезата при КОХС (по-нисък FI, респ. шанс за доносена бременност).



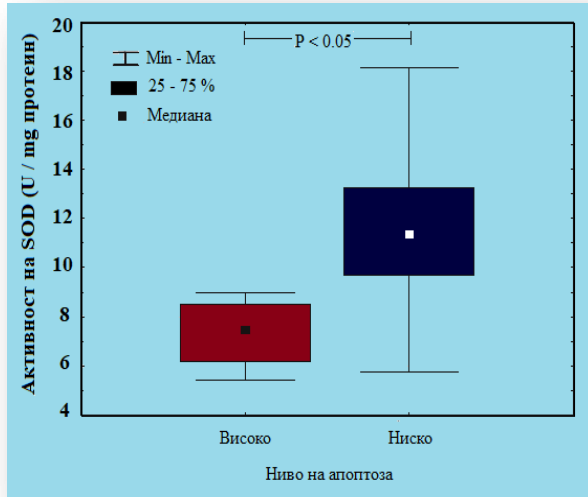
Фиг. 14. Box-plot диаграма, сравняваща анти-GLC антителата в зависимост от (А) отговора към КОХС и (Б) фертилизационния индекс (ФИ). Показани са медианата (кръгче), размаха (отсечка), и квантилите – 25-75% (правоъгълник).

4.2. Зависимост между активността на антиоксидантните ензими супероксид-дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT) и степента на апоптоза в GLCs

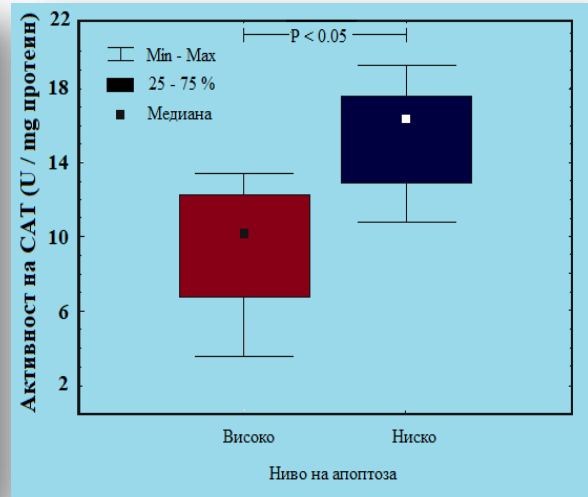
Използвайки 10% честота на апоптозни GLC за cut-off стойност, изследваната част от пациентската група (n = 42) бе разделена на две подгрупи: с висока степен на апоптоза = 14.64 % ± 1.45% (n = 14) и с ниска степен на апоптоза = 5.89% ± 3.00% (n = 28) на гранулоза лутеинизираните клетки.

Връзката между вътреклетъчната SOD активност и нивото на апоптоза бе изследвано, като се установи, че в ниско-апоптозната подгрупа нивото на SOD активността (средна ± STD) е значимо по-висока (11.358 ± 2.454 U/mg) в сравнение с тази във високо-апоптозната подгрупа (7.836 ± 1.559 U/mg) (Фиг. 15; P < 0.05).

Изследвана също бе и връзката между вътреклетъчната САТ активност и нивото на апоптоза и бе установено, че в ниско-апоптозната подгрупа нивото на САТ активността (средна \pm std) е значимо по-висока (15.391 ± 2.590 U/mg) в сравнение с тази във високо-апоптозната подгрупа (9.470 ± 2.934 U/mg) (Фиг. 16; $P < 0.05$).



Фиг. 15. Сравнение между SOD активността в GLC в подгрупите с ниско и високо ниво на апоптоза



Фиг. 16. Сравнение между САТ активността в GLC в подгрупите с ниско и високо ниво на апоптоза

По отношение значението на вътреклетъчната активност на антиоксидантните ензими SOD и САТ за резултатите от проведена процедура по контролирана овариална стимулация, последвана от ин витро фертилизация и трансфер на ембриони, бе установено, че е налице значима позитивна зависимост между активността на SOD и броя на добитите ($r = 0.451$) и броя на оплодените ($r = 0.431$) овоцити (Табл. 5, $P < 0.05$); не бе установена подобна връзка по отношение на САТ (Табл. 5, $P > 0.05$). Установи се, също така, че е налице негативна сигнификантна връзка между нивото на апоптоза в GLC по отношение, както на добитите овоцити ($r = -0.453$), така и по отношение на оплодените ($r = -0.433$) (Табл. 5, $P < 0.05$).

4.3. Апоптозата на човешките GLCs и кумулусни клетки (CCs) като възможен прогностичен индикатор за успеваемостта след IVF

Проучена бе честотата на апоптоичните тела (apoptotic bodies) в пристенни (мурални) GLCs и CCs от фоликуларни аспирати на пациенти в програма за IVF. Бе установена значително по-висока честота на апоптоза в CCs от фоликули с незрели

Табл. 5. Връзка между антиоксидантната ензимна активност и апоптозата в GLC и отговора към КОХС и резултатите от IVF.

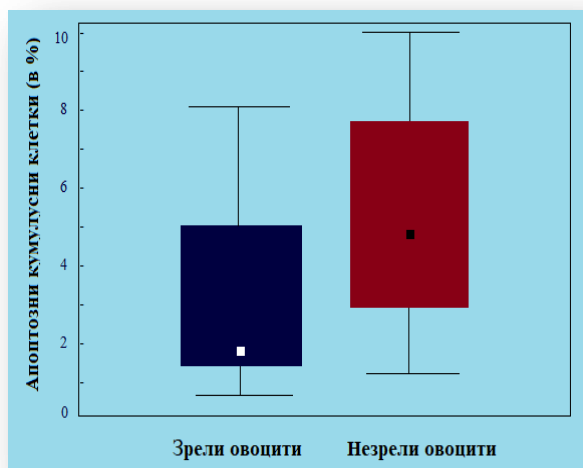
	Аспирирани фоликули	Изолирани овоцити	Оплодени овоцити
SOD активност в GLCs	R* = 0.281 P** > 0.05	R = 0.451 P < 0.05	R = 0.431 P < 0.05
CAT активност в GLCs	R = 0.042 P > 0.05	R = 0.158 P > 0.05	R = 0.192 P > 0.05
Апоптоза в GLCs	R = - 0.164 P > 0.05	R = - 0.453 P < 0.05	R = - 0.433 P < 0.05

* R – коефициент на корелация

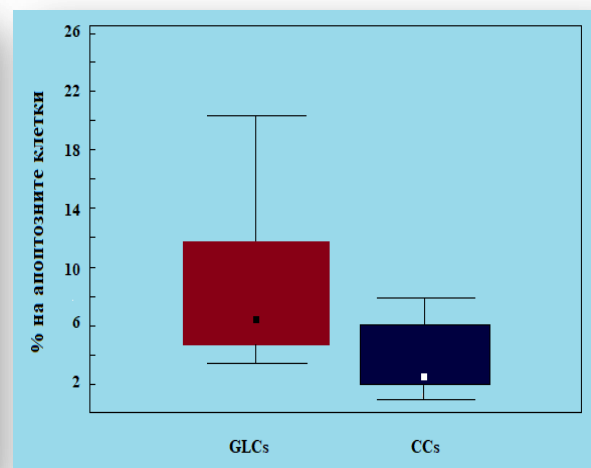
** P-стойност

овоцити (5.375 ± 0.29) в сравнение с такива със зрели овоцити (3.187 ± 0.29 ; $P < 0.05$) (Фиг. 17). Честотата на апоптоичните тела бе по-висока в муралните GLCs в сравнение с тази в CCs при един и същи пациент (8.377 ± 0.001 vs. 3.188 ± 0.001 ; $P < 0.05$) (Фиг. 18).

При разглеждане на връзката между честотата на апоптозата в муралните GLCs и броя преовулаторни фоликули, броя на добитите при фоликулна пункция овоцити и оплодените при ин витро фертилизация овоцити, се откри негативна корелация, демонстрирана в табл. 6.



Фиг. 17. Box-plot диаграма демонстрираща връзката между честотата на апоптозата в CCs и зрелостта на овоцитите. Значимо по-висока честота на апоптоза на CCs от фоликули с незрели овоцити ($P < 0.05$).



Фиг. 18. Box-plot диаграма сравняваща нивото на апоптозата в GLCs и CCs. Нивото на апоптоза при муралните GLC е значимо по-високо от това при CCs ($P < 0.05$).

От данните в табл. 6 е видно, че негативната корелация между % апоптозни GLCs и резултатите от КОХС и ин витро фертилизацията е най-ясно изразена по отношение на броя преовулаторните фоликули за пункция. По-малкото налични фоликули детерминира и по-малкото добити овоцити и получени зиготи. Изглежда, че апоптозата в гранулозните клетки на антралните фоликули е лимитиращ фактор по отношение успеваемостта на процедурите за асистирана репродукция (КОХС с последащо ин витро оплождане и ембриотрансфер).

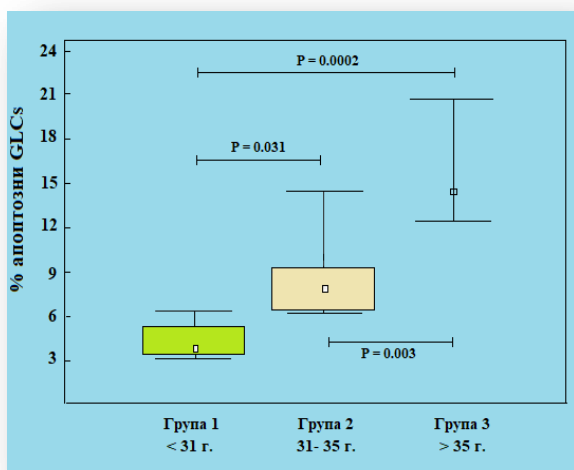
Табл. 6. Връзка между нивото на апоптозата в GLCs/CCs и резултатите от КОХС и IVF.

	Брой фоликули	Брой овоцити	Брой оплодени овоцити
% апоптозни GLCs	R* = - 0.6643 P** = 0.005	R = - 0.5685 P = 0.022	R = - 0.5953 P = 0.015
% апоптозни CCs	R = - 0.3311 P = 0.210	R = - 0.2938 P = 0.269	R = - 0.5953 P = 0.064

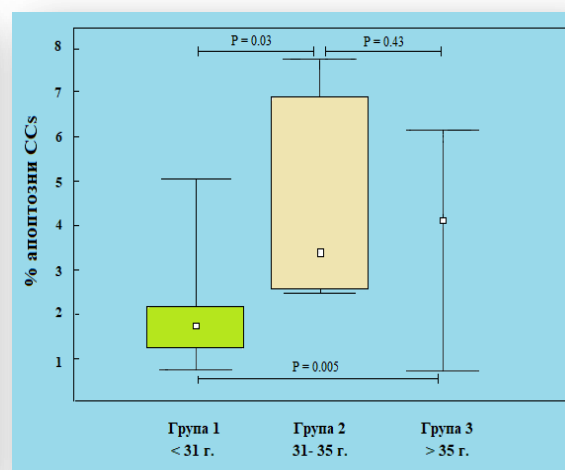
* R – коефициент на корелация

** P-стойност

Интерсно е да се отбележи, че подобна негативна корелация по отношение на кумулусните клетки не бе установена. Важно е да се отбележи, че бе намерено прогресивно нарастване на нивото на апоптоза с нарастване на възрастта на пациентите и при двата типа проучвани кетъчни типа (GLCs and CCs) (Фиг. 19 и 20).



Фиг. 19. Ниво на апоптоза при GLCs в зависимост от възрастта на пациентите



Фиг. 20. Ниво на апоптоза при CCs в зависимост от възрастта на пациентите

4.4. Корелация между анти-GLC антитела (AGA), апоптоза на GLCs и нива на цитокините TNF- α и IFN- γ във фоликулни течности на инферилни жени

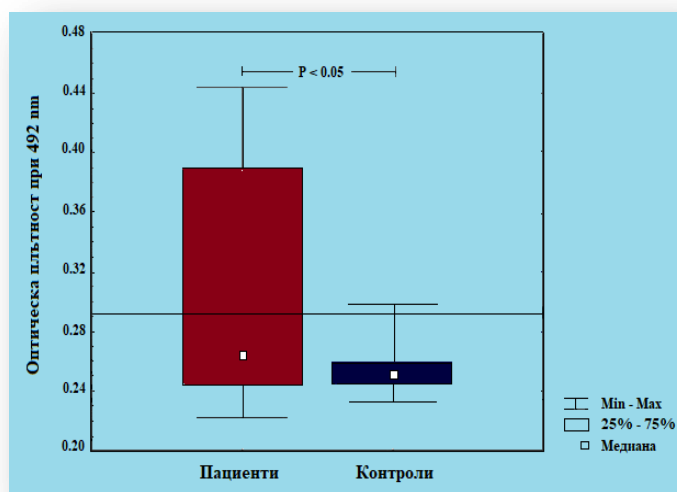
Фоликулни течности от 18 жени (пациентска подгрупа с **овариален фактор за безплодие**) и 10 жени (контролна група без овариален фактор) бяха тествани за AGA чрез индиректна ELISA с помощта на NP-40 GLCs лизат като антиген. На базата на cut-off стойност от + 2STD над средната стойност на контролите, се установи наличие на AGA в 33.33% (6/18) в пациентската група и в 10.0% (1/10) при контролите (табл. 7).

Табл. 7. Честота на AGA в пациентска и контролна група

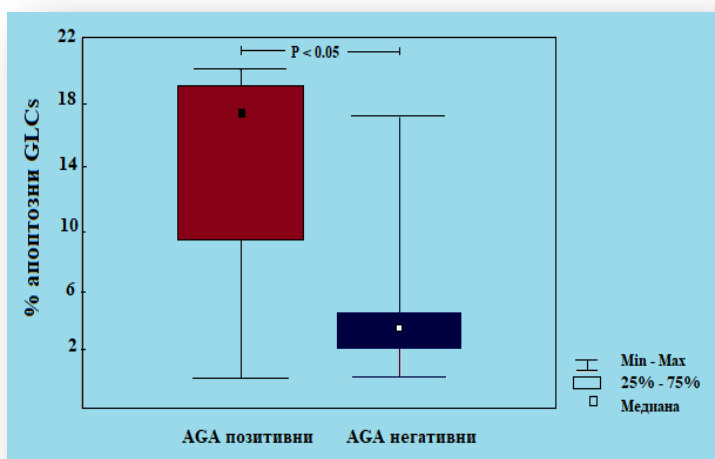
	Пациентска група (n = 18)	Контролна група (n = 10)
Възраст	32.44 \pm 2.71	31.25 \pm 2.58
Позитивни за AGA	33.33 % (6/18)	10.0 % (1/10)
Негативни за AGA	66.67% (12/18)	90.0% (9/10)
AGA имунореактивност	0.305 \pm 0.076	0.253 \pm 0.019

AGA имунореактивността бе значимо по-висока в пациентската група в сравнение с контролната (0.305 \pm 0.076 vs. 0.253 \pm 0.019, P < 0.05, Табл. 7, Фиг. 21).

Фиг. 21. Сравнение наличието на анти-GLC антитела (AGA) при пациенти и контроли. Данните са представени като box-plot диаграма по отношение оптичките плътности с медиана (кръгче), размаха (отсечка) и квантили 25-75 % (правоъгълник); с непрекъсната линия е означена граничната стойност от 2 SD над средната стойност при контролите. Показана е и статистическата значимост.



Статистически значимо нарастване на % на апоптозните GLCs бе открито при AGA-позитивните пациенти в сравнение с AGA-негативните (P < 0.05, Табл. 8, Фиг. 22).



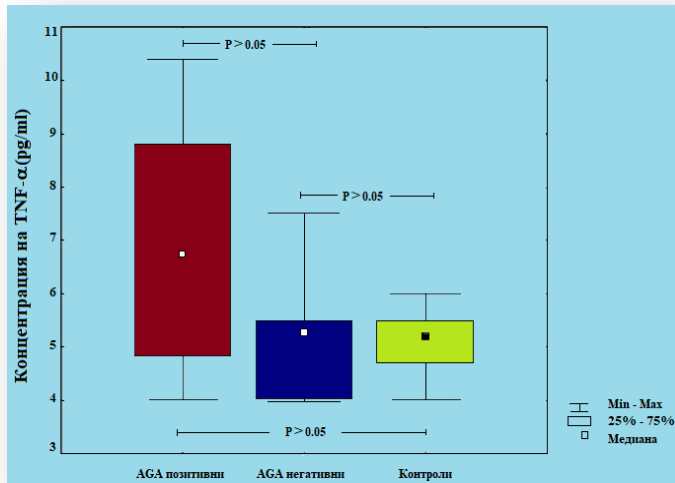
Фиг. 22. Box-plot диаграма, сравняваща % на апоптозните GLC при пациенти позитивни и негативни за AGA

При наличие на овариален фактор за безплодие, от една страна е налице сигнификантно нарастване на честотата на анти-GLC антителата във фоликуларните течности (което се свързва с по-лош фертилизационен индекс), а от друга е налице нарастване на % на апоптозните клетки при анти-GLC позитивните пациенти, което допълнително утежнява ситуацията (поради по-малкото добити и оплодени овоцити в тези случаи). Предходни оперативни интервенции, LUF синдром, яйчникова ендометриоза, POF и др. се явяват изключително неблагоприятни анамнестични фактори по отношение на прогнозата за успех след асистирана репродукция.

Табл. 8. Процент на апоптозните GLCs и нива на TNF- α и IFN- γ във фоликуларни течности при AGA-позитивни и AGA-негативни пациенти

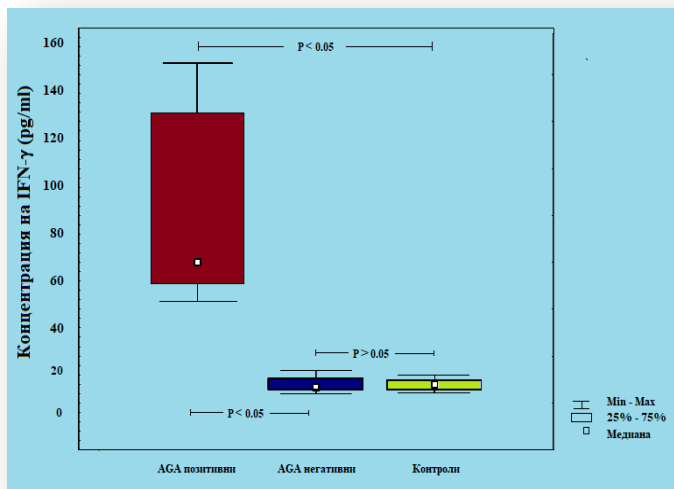
	Апоптозни GLC	TNF- α (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Позитивни за AGA	13.51% \pm 7.78%	6.92 \pm 2.52	80.05 \pm 42.36
Негативни за AGA	4.37% \pm 0.91%	5.10 \pm 1.15	7.93 \pm 3.60
Контроли	-	5.12 \pm 0.61	7.61 \pm 2.46

Изследването на нивата на TNF- α и IFN- γ във фоликуларни течности установи, че те бяха по-високи при позитивните за AGA жени в сравнение с негативните и контролите, но статистическа значимост бе открита само по отношение на IFN- γ ($P < 0.05$, Табл. 8, Фиг. 23 и Фиг. 24)



Фиг. 23. Нива на TNF- α във фоликулни течности на пациенти (AGA позитивни и негативни) и контроли. TNF- α е увеличено при AGA позитивните, но без да достига статистическа значимост ($P > 0.05$)

Както се и очакваше, не се откриват значими разлики в нивата на TNF- α и IFN- γ във фоликулните течности на AGA негативните пациенти с овариален фактор за безплодие спрямо здравите контроли (овоцитни донори) ($P > 0.05$, фиг. 23 и 24).



Фиг. 24. Нива на IFN- γ във фоликулни течности на пациенти (AGA позитивни и негативни) и контроли. IFN- γ е увеличено при AGA позитивните, като е налице статистическа значимост ($P < 0.05$)

Изглежда, че при наличие на овариален фактор за безплодие и позитивен тест за анти-GLC антитела, може да се очаква значимо съвместно нарастване нивата на IFN- γ и на % на апоптозните GLCs и в по-малка степен на TNF- α .

Като цяло, може да се приеме, че наличието на AGA антитела е съпроводено с повишение на процента на апоптозни GLCs ($R = 0.696$) и с активация на имунната система, демонстрирана с повишение на нивата на цитокините TNF- α ($R = 0.456$) и IFN- γ ($R = 0.812$) (табл. 9).

Табл. 9. Резултати от корелационния анализ на връзката между AGA и процента на апоптозните GLCs, TNF- α и IFN- γ във фоликулни течности на инфертилни жени.

	Коефициент на корелация (R)	Статистическа значимост (P)
AGA спрямо % апоптозни GLCs	R = 0.696	P < 0.05
AGA спрямо TNF- α	R = 0.456	P > 0.05
AGA спрямо IFN- γ	R = 0.812	P < 0.05
% апоптозни GLCs спрямо TNF- α	R = 0.462	P > 0.05
% апоптозни GLCs спрямо IFN- γ	R = 0.547	P < 0.05
TNF- α спрямо IFN- γ	R = 0.726	P < 0.05

4.5. Фоликуларни цитокини и апоптоза на човешки GLCs – значение при жени с овариален фактор за безплодие, подложени на контролирана повариална хиперстимулация и ин витро оплождане.

На табл. 10 са показани общите характеристики на изследваната субпопулация жени (с овариален фактор) по отношение на възраст, отговор към КОХС и степен на

Табл. 10. Характеристика на пациентите по отношение на възраст, отговор към КОХС (добър > 3 овоцита, лош \leq 3 овоцита) и степен на фертилизация (оплодени овоцити и ФИ).

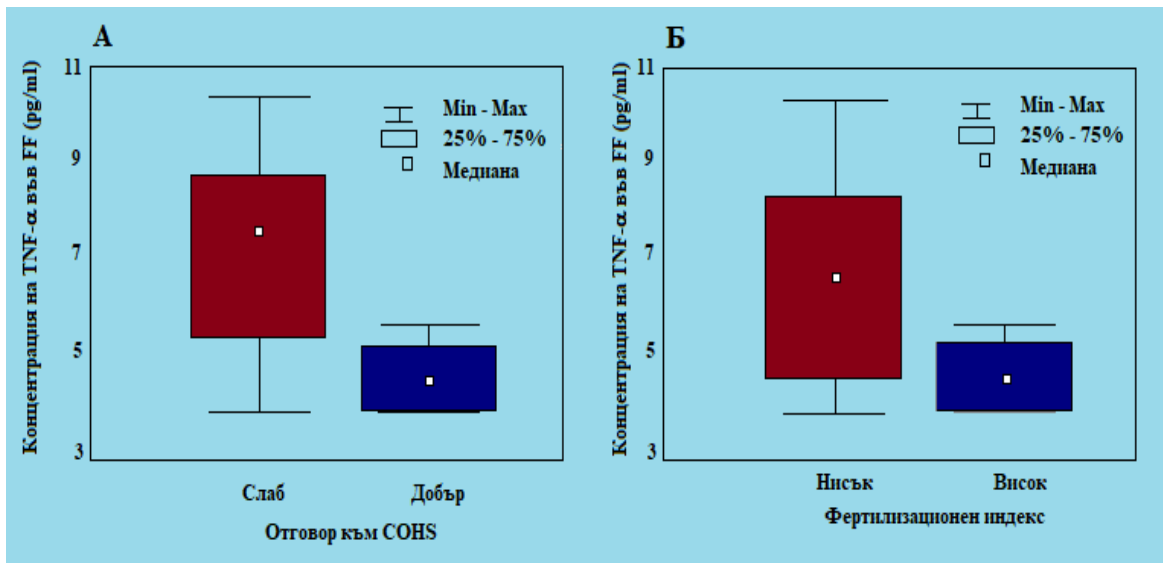
	Отговор към КОХС		P
	<i>Добър отговор (n=10)</i>	<i>Лош отговор (n=8)</i>	
Възраст	32.0 \pm 2.49	33.33 \pm 3.14	P > 0.05
Аспирирани фоликули	12.33 \pm 3.11	5.0 \pm 0.89	P < 0.05
Изолирани овоцити	9.42 \pm 2.68	2.0 \pm 1.14	P < 0.05
	Фертилизация		P
	<i>Висок ФИ (n=10)</i>	<i>Нисък ФИ (n=8)</i>	
Възраст	31.6 \pm 2.55	33.5 \pm 2.67	P > 0.05
Оплодени овоцити	7.9 \pm 2.42	1.0 \pm 1.07	P < 0.05
Фертизационен индекс	78.3% \pm 17.12%	22.36% \pm 19.76%	P < 0.05

фертилизация на извадените овоцити, като не се наблюдава разлика във възрастта между отделните групи, така че резултатите по отношение на отговора към КОХС и фертилизационния индекс да не се дължат на възрастовите промени в яйчниците. Както вече бе посочено по-горе, наличието на АГА антитела е съпроводено с повишение на процента на апоптозни GLCs и с повишение на нивата на цитокините TNF- α и IFN- γ (вж. табл. 9). Разглеждайки концентрациите на TNF- α и IFN- γ и процента на апоптозни клетки при инфертилните жени за IVF с добър и лош отговор от една страна и с нисък и висок фертилизационен индекс от друга, бе установено, че е налице статистически значима разлика по отношение на изследваните показатели между групите (табл. 11, фиг. 25-27)

Табл. 11. Зависимост между концентрациите на TNF- α и IFN- γ и процента на апоптозни клетки при инфертилните жени за IVF и отговора към КОХС (добър > 3 овоцита, лош \leq 3 овоцита) и степента на фертилизация (оплодени овоцити и ФИ).

	Отговор към КОХС		P
	Добър отговор (n=10)	Лош отговор (n=8)	
Концентрация на TNF- α (pg/ml)	4.73 \pm 0.67	7.37 \pm 2.30	P < 0.05
Концентрация на IFN- γ (pg/ml)	10.16 \pm 21.0	74.06 \pm 50.19	P < 0.05
Апоптозни GLCs	2.15% \pm 1.63%	16.33% \pm 4.17%	P < 0.05
	Фертилизация		P
	Висок ФИ (n=10)	Нисък ФИ (n=8)	
Концентрация на TNF- α (pg/ml)	4.74 \pm 0.67	6.69 \pm 2.34	P < 0.05
Концентрация на IFN- γ (pg/ml)	10.53 \pm 14.04	57.63 \pm 52.24	P < 0.05
Апоптозни GLCs	3.12% \pm 1.47%	12.78% \pm 7.55%	P < 0.05

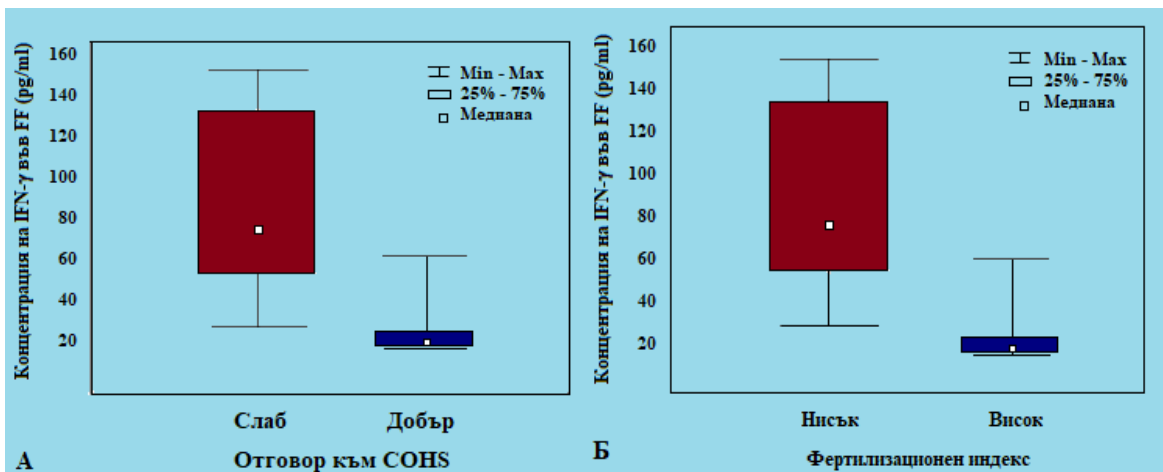
При жени с добър отговор към КОХС нивата на TNF- α и IFN- γ са значимо по-ниски, както и нивата на апоптоза в гранулозо-лутеиновите клетки. Подобна зависимост е налице и по отношение на фертилизационния индекс – ниският ФИ корелира с по-високите нива на TNF- α и IFN- γ и на нивата на апоптоза в GLCs.



Фиг. 25. Концентрации на TNF- α във фоликулни течности на жени за ин витро оплождане:

А. с добър (добър > 3 овоцита) и лош (лош \leq 3 овоцита) отговор към КОХС ($P < 0.05$)

Б. с нисък ($\leq 50\%$) и с висок ($>50\%$) фертилизационен индекс (ФИ) ($P < 0.05$)

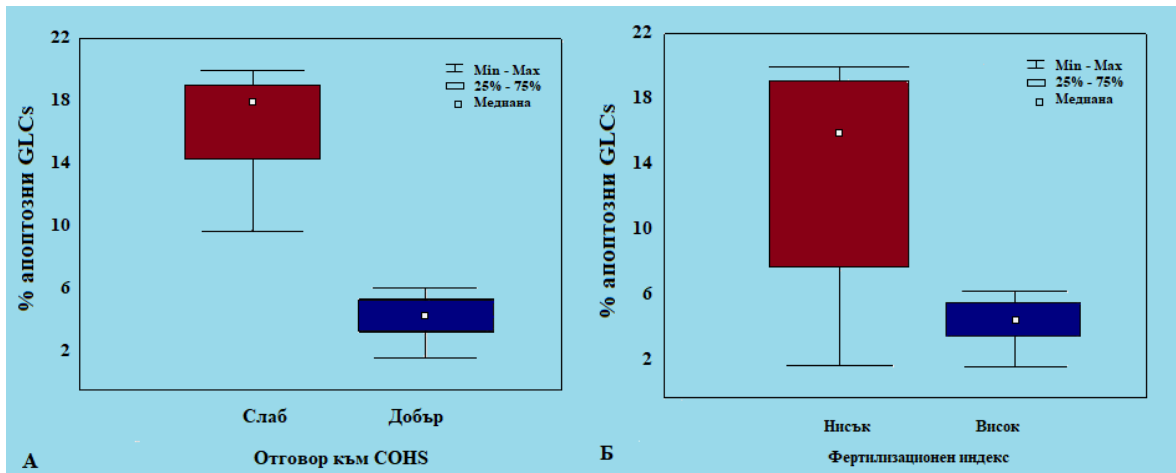


Фиг. 26. Концентрации на IFN- γ във фоликулни течности на жени за ин витро оплождане:

А. с добър (добър > 3 овоцита) и лош (лош \leq 3 овоцита) отговор към КОХС ($P < 0.05$)

Б. с нисък ($\leq 50\%$) и с висок ($>50\%$) фертилизационен индекс (ФИ) ($P < 0.05$)

При инфертилни жени с наличие на анти-овариални (анти-GLC) антитела, както и очаквахме, бе наблюдавано повишение на нивата на цитокините TNF- α и IFN- γ , заедно с нарастване на % на апотозните GLCs, което пък е вероятната причина, както за по-лошия отговор към яйчниковата стимулация, така и за по-лошите резултати след ин витро фертилизацията (с по-нисък ФИ и по-лоши шансове за постигане на бременност).



Фиг. 27. % апоптозни GLCs във фоликулни течности на жени за ин витро оплождане:

А. с добър (добър > 3 овоцита) и лош (лош ≤ 3 овоцита) отговор към КОХС (P < 0.05)

Б. с нисък (≤ 50%) и с висок (>50%) фертилизационен индекс (ФИ) (P < 0.05)

4.6. Изследване на потенциални генни биомаркери за предикция качеството на овоцитите

Както вече бе посочено, качеството на получените след КОХС овоцити, респ. предимплантационни ембриони е от ключова важност по отношение успеваемостта на проведената асистирана репродукция, а все още морфологичните (микроскопските) критерии са практически единствени по отношение оценка качеството на овоцитите. В настоящата работа проучихме и възможната роля на гени и протеини, нивата на експресия на които в кумулусните клетки на инфертилни жени, имат отношение към регулацията на процесите на развитие, съзряване и оплождане на човешките яйцеклетки, а промените в експресията им може да доведе до нарушаване на оплодителната компетентност на овоцитите.

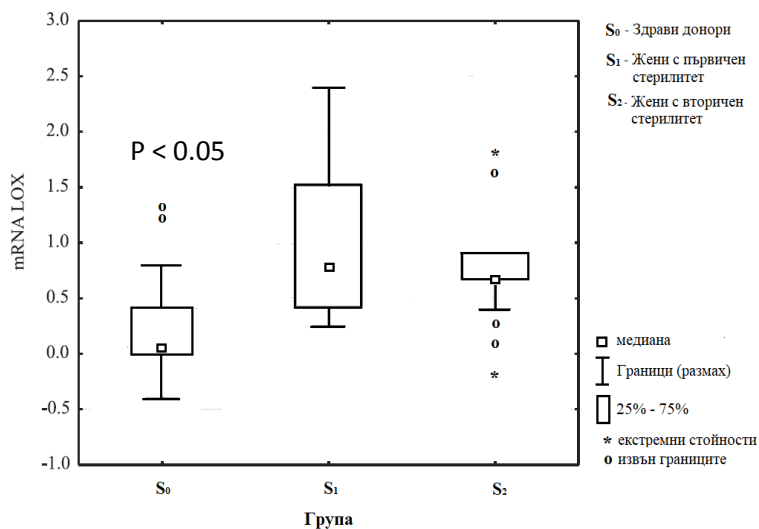
Обект на нашия интерес бяха лизил оксидаза (LOX), фосфоглицерат киназа 1 (PGK1) и ядрен фактор *kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB) известни с тяхната роля при възпалителните процеси, фиброзата, цистогенезата в поликистозата на яйчника при плъхове и др.

Изследвани бяха кумулусни проби, взети при ICSI процедури от жени с овариален или тубарен стерилитет (n = 39) и такива, взети от здрави донорки на овоцити (n = 9) или здрави инфертилни жени с мъжки фактор за безплодие (n = 7).

Трите групи бяха означени като S_0 , S_1 и S_2 (S_0 – здрави донори, S_1 – жени с първичен и S_2 – жени с вторичен стерилитет).

Установи се, че LOX mRNA е ъпрегулиран при жени с първичен или вторичен стерилитет. LOX gene mRNA беше амплифицирана и нивата ѝ бяха изразени като нарастване в пъти спрямо тези, експресирани при овоцитните донори, като по този начин се избягна нуждата от количествено калибриране.

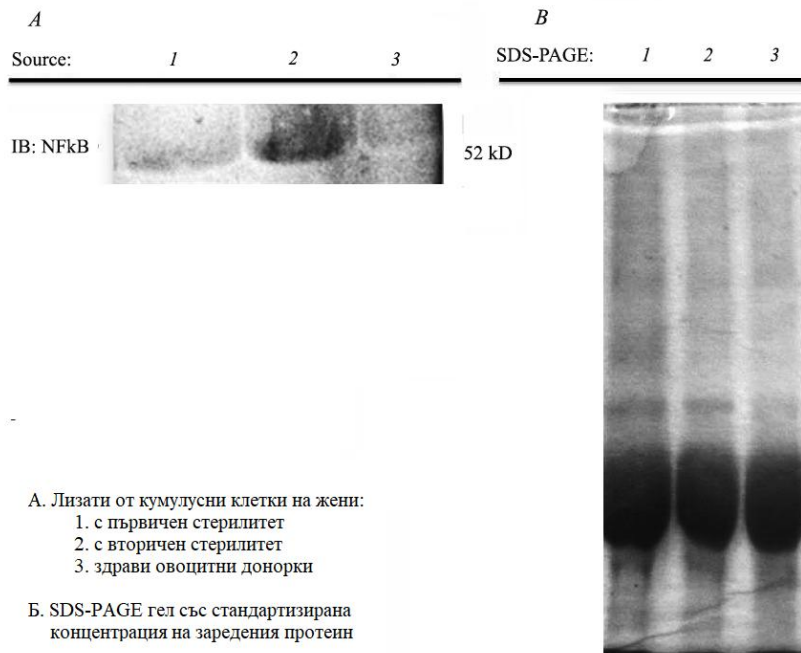
Статистическият анализ чрез ANOVA ясно показва сигнификантно повишени LOX нива в групите S_1 и S_2 , в сравнение със здравите контроли (S_0), като бе наблюдавано повишение на транскрипционната експресия от 1.2 x в групата на жените с първичен стерилитет (S_1 спрямо S_0 - фиг. 28).



Фиг. 28. Експресия на mRNA LOX транскрипта при различните групи жени (S_0 , S_1 и S_2). Разликите между жените с първичен стерилитет (S_1) и здравите контроли (S_0) е сигнификантна ($P < 0.05$).

Установи се, също така, че NF-kB е активиран при всички жени с репродуктивни проблеми в сравнение с нормалните контроли. Имуноблотингът с anti-NF-kB антитяло показва повишени нива на активен NF-kB при жените със стерилитет, докато при здравите контроли не се установи NF-kB да навлиза в ядрото и не бе регистриран.

Експресията се оказва по-силна при жени с вторичен стерилитет в сравнение с тези с първичен (Фиг. 29)



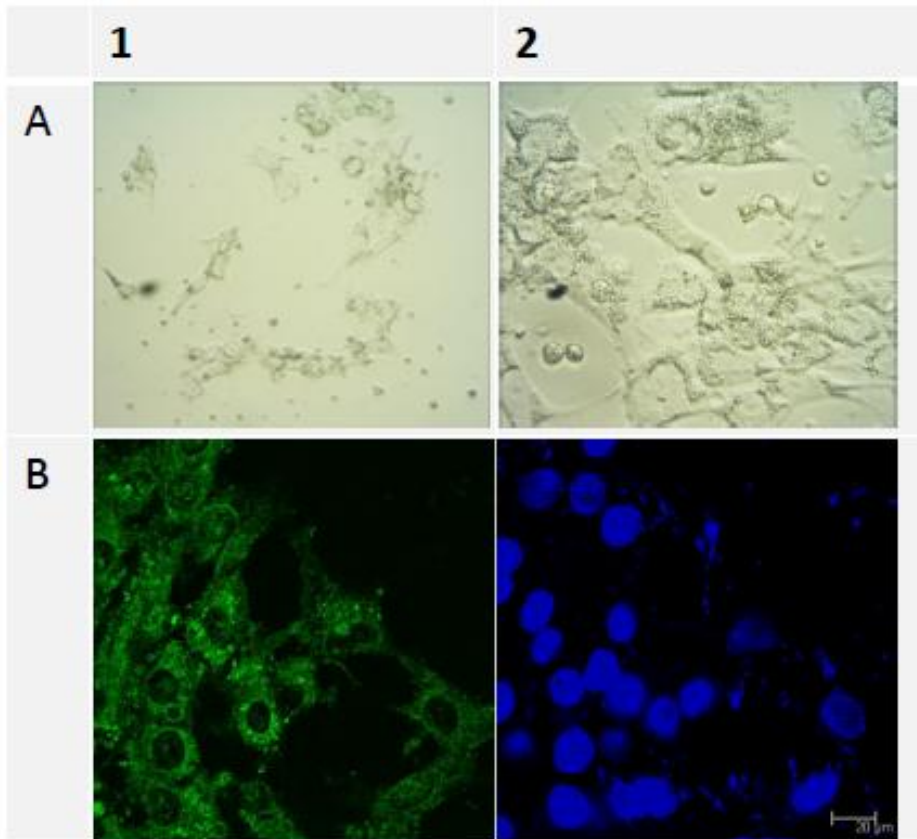
Фиг. 29. А.) Western-blot на кумулусни лизати (от овоцитните кумулуси на жени в програма за асистирана репродукция чрез ICSI), нормализирани по отношение на протеиновата концентрация. IB: специфични антитела (anti-human NFκB, anti-human BCL-2); вторично антитяло: миши anti-human Alexa-488 конюгирано антитяло. Имунодетекция чрез флуоресцентна емисия при 450 nm.

Б.) 1D SDS-PAGE гел, оцветен с Coomassie® (ICI) брилянтно синьо.

4.7. Изследване въздействието на мелатонин *in vitro* върху ъпрегулацията на MT₁ и MT₂ рецепторите и модулацията на експресията на алфа-модулин и P450 в човешки GLCs

След изолиране от фоликуларните пунктати, култивираните клетки се проявиха с добра адхезивност, разпространение и междуклетъчни контакти, както и с вакуолизирана цитоплазма и множество секреторни гранули. Последните се белязаха демонстративно за P450 α гом, както типичните лутеинизирани гранулозни клетки (Фиг. 30)

Протеиновата експресия на MT₁ и MT₂ рецептори бе установена с SDS-PAGE и последващ Western blot анализ с помощта на специфични антитела, както в нетретираните, така и в третираните с мелатонин проби (Фиг. 31 А). Третираните с мелатонин клетки (след нормализиране срещу алфа-тубулин) показаха по-висока експресия и на двата рецептора – с 30% за MT₁ и с повече от 40% за MT₂ в сравнение с нетретираните контроли (Фиг. 31, В и С).



Фиг. 30. Първична култура на GLC.

1. 24 часа след посяване;

2. 48 часа след посяване;

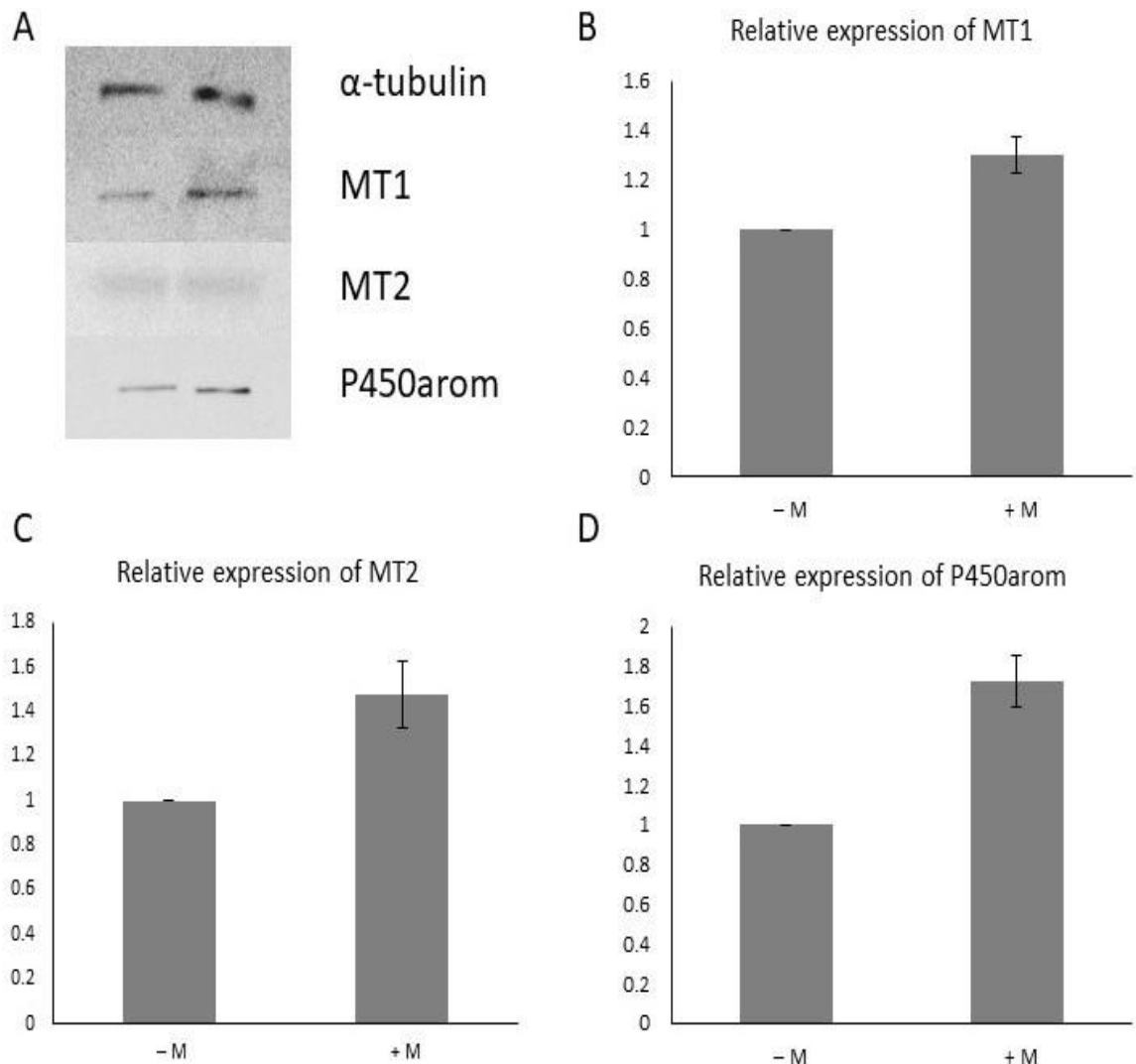
A. Образ от фазово-контрастна микроскопия (20x);

B₁. Конфокална имуно-флуоресценция за P450 scc (Cy2, 63x);

B₂. Насрещно оцветяване на клетъчните ядра с DAPI (63x).

Анализът на експресията на P450arom, също така показва по-високи стойности в GLC, треирани ин витро с MEL в сравнение с нетретираните контроли (Фиг. 31, D).

Специфичното имуно-флуоресцентно оцветяване за MT₁ и MT₂ в култивираните GLC показва положителна реакция и за двата рецептора във всички изследвани проби (Фиг. 32, MR). При MT₁ бе характерна интензивната цитоплазмена мембранна експресия в непосредствена близост с ядрото, локализация наподобяваща апарата на Голджи и ендоплазматичния ретикулум; при MT₂ сигналът бе значително по-слаб и показва по-дифузно и по-дискретно перинуклеоларно разпределение.

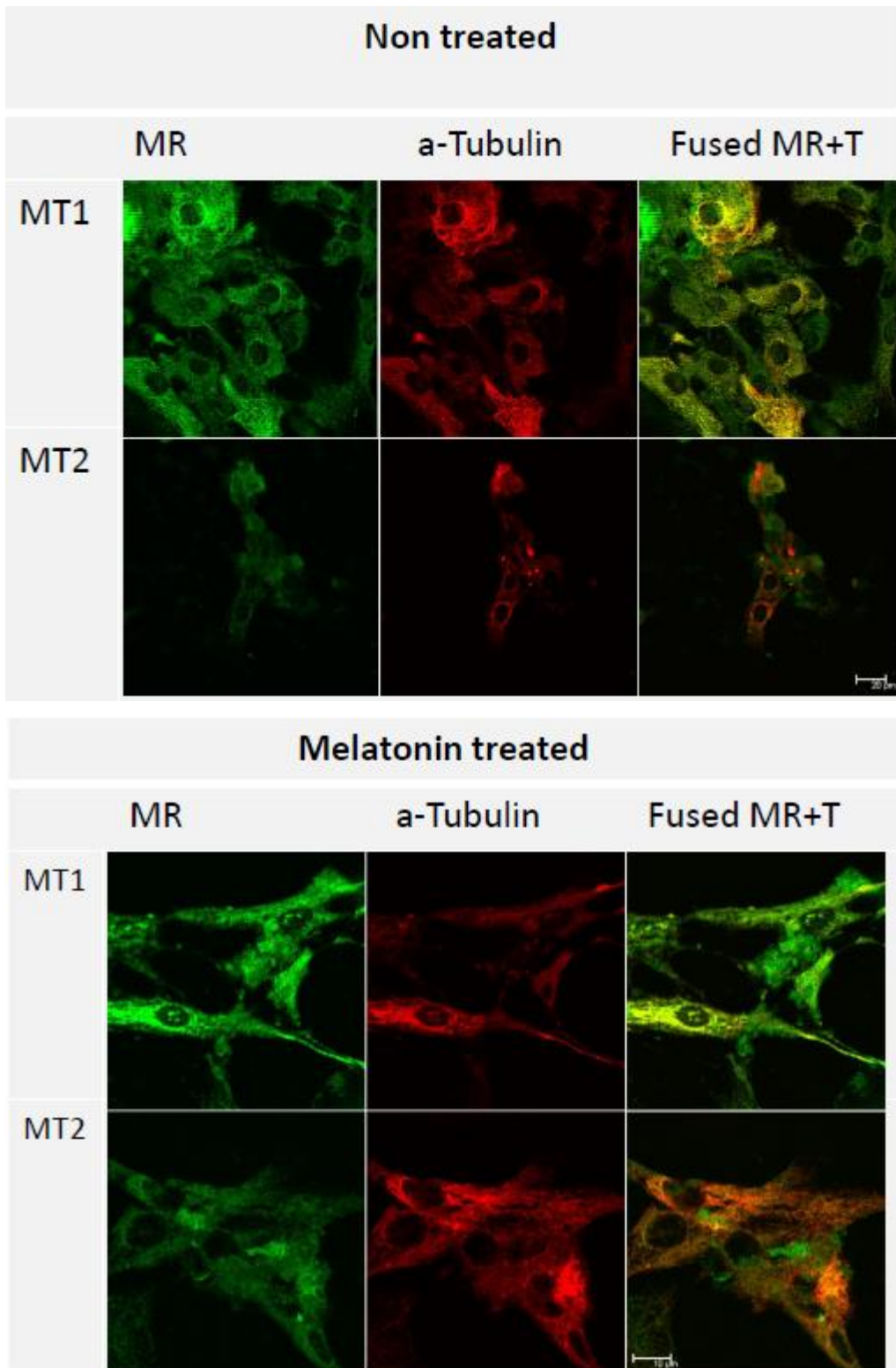


Фиг. 31. Експресия на:

A. MT₁, MT₂ и P450arom в нетретирани (-M) и третирани (+M) човешки GLC (Western blot);
B, C, D. Сравнителен денситометричен анализ (n=3, p<0.01)

Инкубацията на култивираните клетки с 10 nM MEL за 48 часа доведе до интензифициране на сигнала и по-широко цитоплазмено разпространение и при двата рецептора – по-дифузно за MT₂, в контраст с по-интензивното филаментарно оцветяване за MT₁.

По-отношение на *alpha-tubulin* се наблюдава, също така, по-силен имунофлуоресцентен сигнал при третираниите с MEL GLCs в сравнение с нетретираниите контроли (Фиг. 32, *alpha-Tubulin*). Двойното белязване показва значително припокриване на



Фиг. 32. Имуно-флуоресцентан визуализация на: мелатониновите рецептори (MR, в зелено, Cy3) и алфа-тубулин (α -Tubulin, в червено, Alexa 647) в нетретирани и третирани с MEL GLCs. Двойно имуно-флуоресцентно белазане за MT₁/MT₂ и α -Tubulin (Fused MR+T) при нетретирани и третирани с MEL култури GLC. Смесеното ицветяване цели да покаже ко-локализацията на MR и α -Tubulin – в жълто (63x, Leica CM)

сигналите за MT₁ с тези на *alpha-tubulin* – в перинуклеарната цитоплазма, както при третираните, така и при нетретираните контроли, резултиращо в жълтеникаво оцветяване на припокриващите се образи. По-слабата експресия на MT₂ нарастна след третирането с MEL от дискретно перинуклеарно към по-дифузно и по-периферно цитоплазмено заедно с повишената ко-локализация на алфа-тубулиновия сигнал.

4.8. Обсъждане

Наличието на анти-овариални антитела при жени в програми за ин витро оплождане са докладвани с честота от 21 – 58% според редица автори ^{(9), (10), (11), (12)} в зависимост от ползваните антигени и методите за детекция на анти-овариалните антитела, а също и според критериите за селекция на случаите. Резултатите от настоящите проучвания сочат, че наличието на антитела срещу GLC антигени е по-често при инфертилни жени, подложени на асистирана репродукция чрез IVF-ET, отколкото при нормални менструиращи жени на същата възраст. Това дава основание да се приеме, *че детекцията на anti-GLC антитела може да бъде индикатор за тяхната роля като имунологична причина за безплодие.*

Важна е и идентификацията на възможни GLC антигени за антитела от серуми на инфертилни жени, които не се срещат при фертилни контроли. В нашите изследвания, изолирани човешки GLCs от жени в програма за ин витро оплождане, бяха ползвани за пръв път като антиген при тестиране за анти-овариални антитела чрез ELISA и имуоблотинг. В хода на настоящите проучвания открихме, че GLC протеини с ММ от 70–80, 47 и 37 kDa са потенциалните таргети за anti-GLC антитела в пациентските серуми. В частност, протеинът с ММ = 37 kDa е от особен интерес ⁽¹³⁾.

Установи се, че честота на позитивните за anti-GLC антитела при инфертилните жени е значително по-голяма в сравнение с тази при фертилните контроли. Тъй като антителата срещу GLC могат да бъдат считани за част хетерогенната група на анти-овариалните антитела, налице е значително разнообразие от антигени, ползвани в различните проучвания, което прави трудно сравняването на нашите с вече докладвани данни. В допълнение, при настоящите проучвания установихме, че 15/28 проби позитивни за AGA са също така положителни и за anti-ZP антитела.

При имунохистохимични изследвания са докладвани честоти на мембранните анти-гранулозни антитела от порядъка на 17.5 – 66.7% при жени за IVF-ET⁽¹¹⁾. От настоящите изследвания е видно, че **наличието на анти-GLC антитела не влияе особено на яйчниковия отговор към КОХС, но определено повлиява фертилизацията**. Някои автори, обаче, откриват АОА само при т.нар. *poor responders*, но не и при тези с нормален отговор⁽¹⁴⁾. Донякъде това може да се дължи и на различното разбиране за добър и лош отговор към овариалната стимулация. Luborski *et al.* (2000) посочват, че при всички случаи стандартната КОХС при т.нар. *poor (low) responders* се очаква да бъде много по-непридвидима при жени с наличие на АОА, а също така, че в някои случаи хормоналната стимулация може да преодолее автоимунната реакция и да бъдат рекрутвани и „здрави“ фоликули⁽¹⁵⁾. Това може и да обясни липсата на статистическа значимост в нашите проучвания по отношение зависимостта между наличието на АГА и отговора към КОХС.

Повишената честота на АГА при пациенти с нисък фертилизационен индекс при IVF предполага негативно повлияване на фертилизационния потенциал на овоцитите от anti-GLC антителата, подобно на anti-ZP антителата^{(16), (17), (18), (19), (20)}. Установихме, че в присъствие на АГА само 5 от 28 жени (17.6%) са имали успешна бременност, докато при негативните за АГА успешните са 24 от 73 (32.9%). **Предполагаме, че освен фертилизацията, anti-GLC антителата може би засягат и функционалността на жълтото тяло.**

Предвид негативния ефект на АГА върху фертилизационния потенциал на овоцитите, би било важно да се потърси начин за третиране на подобни случаи преди и/или в хода на КОХС. За съжаление, за момента няма обещаващо лечение, което да доведе до по-добри резултати от процедурите за ин витро оплождане при позитивни за АГА жени. Липсват скорошни данни за употребата на кортикостероиди при жени със суспекция за автоимунна генеза на овариален фактор за стерилитет. По-стари данни сочат, че като цяло употребата на кортикостероиди при такива пациенти (най-вече с PCOS и съпътстващ хиперандрогенизъм) нямат положителен ефект, независимо, че е налице стимулиране на секрецията на естрогени и гестагени от фоликуларната гранулоза^{(21), (22)}. Интересно е да се разбере, какъв би бил потенциалния ефект на кортикостероидите и в какви дози по отношение на серумните и фоликуларните нива

на AGA. Що се касае до интравенозното приложение на имуноглобулини (IvIG), най-често в дози от порядъка на 250-500 mg/kg, се знае, че е налице позитивен ефект по отношение на жени с хабитуални аборти и рекурентен неуспех след IVF (RIF – repeated implantation failure), най-вече при наличие на антифосфолипидни антитела и/или повишена концентрация на НК-клетки⁽²³⁾. За момента няма данни някой да е проучвал приложението на IvIG при жени с AGA.

Преовулаторните фоликули съдържат субпопулации от гранулозни клетки, в т.ч. мурални и кумулусни клетки. Муралната гранулоза секретира разнообразни растежни фактори, които повлияват паракринно/автокринно фоликула и овоцита, и експресира гени, важни за процеса на руптура на фоликула. Кумулусните клетки, бидейки в непосредствена близост с овоцита по време на растежа и овулацията, вероятно медиират съзряването и оплождането на яйцеклетката, която от своя страна регулира кумулусните процеси чрез секреторни фактори⁽²⁴⁾. Очевидно, фоликулната течност представлява уникална микросреда, съдържаща редица про- и анти-апоптозни фактори, растежни фактори и други медиатори от ключово значение за овоцитния растеж, съзряване и оплодителна компетентност, от една страна, и за двупосочната комуникация овоцит-гранулоза, от друга. В този смисъл, нейното състояние повлиява качеството на овоцитите, особено при жени с безплодие, подложени на КОХС за ин витро оплождане.

Редица публикации докладват връзката между честотата на апоптозата на човешките мурални гранулозни клетки и успеваемостта след IVF^{(25), (26)}. Нашите проучвания подкрепят тези констатации и откриват **сигнификантна негативна корелация между нивото на апоптоза в муралните GLCs и броя на преовулаторните фоликули, броя на извадените с пункция и оплодените чрез IVF овоцити** при пациенти в стимулирани цикли. Нещо повече, става ясно, че нивата на апоптозата в мурални GLCs са по-високи в сравнение с тези при кумулусните клетки (CCs) при един и същ пациент. Установи се по-висока степен на апоптоза в CCs от фоликули с незрели спрямо тези със зрели овоцити, което се потвърждава и от данните на Host *et al.*⁽²⁴⁾ Изглежда, че **степенна на апоптоза при GLCs и CCs може да бъде предиктор по отношение капацитета за развитие на овоцитите**^{(27), (28), (29)}.

Налице е **възрастово зависимо нарастване наличието на апоптозни тела в муралните GLCs и CCs**, свързано с намален брой на добитите овоцити и по-нисък фертилизационен индекс в настоящото проучване, което потвърждава някои наши предварителни резултати и тези на други автори ^{(6), (30)}.

В яйчника, имунната система допринася за регулация на гонадната функция, а резидентните левкоцити потенциално могат да играят ролята на *in situ* модулатор чрез секрецията на редица разтворими фактори, вкл. многобройни видове цитокини ⁽³¹⁾. Макрофагите са ангажирани в отстраняването на дебриса от апоптозните клетки и отделят цитокини и растежни фактори, за които се знае, че регулират множество функционални аспекти на гранулоза-лутеиновите клетки.

Изследвани са човешки GLCs от пациенти за IVF, стимулирани с гонадотропни хормони, като отговора им към про-апоптозни фактори и нивата на апоптоза са разглеждани като възможни индикатори за изхода от IVF процедурите ^{(25), (27)}. От друга страна, апоптозо-медиирани промени на някои клетъчни протеини (като източник на вътреклетъчни авто-антигени) са асоциирани с автоимунитет ⁽³²⁾.

Резултатите, получени от настоящите проучвания, показват **значимо повишение на процента на апоптозните GLCs в AGA-позитивни, в сравнение с AGA-негативни пациенти**. Това предполага, че абнормално повишена GLCs апоптоза и/или промяна във функцията на макрофагите, променено съотношение CD4+/CD8+, както и неправилната експресия върху гранулозните клетки на антигени от клас II на МНС ⁽³³⁾, могат да доведат до поява на автореактивност към тези клетки, подобно на някои добре познати автоимунни състояния (напр. при SLE) ^{(34) (35)}.

Известно е, че редица цитокини, между които TNF- α и IFN- γ могат да бъдат открити в човешки фоликулни течности ^{(36), (37)}. Публикуваните данни по отношение значението на концентрациите на TNF- α и IFN- γ във FFs за броя на преовулаторните фоликули, извадените при фоликулна пункция и оплодените чрез ин витро фертилизация овоцити, не са еднозначни. Според някои автори няма сигнификантна връзка между TNF- α и IFN- γ и зрелостта на овоцитите, а също и по отношение на фертилизационния индекс и успеваемостта на ин витро процедурите ^{(38), (39), (40)}.

В настоящата работа, наличието на AGA във фоликулни течности и повишения % на апоптозни GLCs беше съпроводено с повишение нивата на TNF- α и IFN- γ ; налице бе **сигнификантна корелация между наличието на AGA, % на апоптозните GLCs и повишените нива на IFN- γ** . В яйчника, TNF- α и особено IFN- γ са способни да индуцират апоптоза, тъй като тези цитокини повишават Fas антигенната експресия в GLCs, респ. повишават Fas-медираната клетъчна смърт⁽⁴¹⁾. Така например, Anti-human Fas моноклонални антитела значимо индуцират клетъчна смърт в претретиранни с IFN- γ клетъчни култури^{(41), (42)}.

В допълнение, IFN- γ може да индуцира експресията върху гранулозните клетки на някои антигени от клас II на МНС и да усилва имунологичния отговор⁽³³⁾. В тази връзка, автоимунната реакция спрямо гранулозните клетки вероятно се тригерира от повишената апоптоза на GLCs и/или от експресията на аберантни антигени от клас II на МНС върху гранулозните клетки, което се дължи на повишената продукция на IFN- γ .

Предполагаме, че повишението на нивата на про-апоптозните фактори във FFs могат да повлияят двупосочната комуникация между овоцита и заобикалящата го гранулоза чрез индуциране на апоптоза в GLCs и по този начин да бъде повлиян шансът за бременност при една ин витро процедура, особено при жени с предхождащ овариален фактор за безплодие. При такива пациентки, резултатите, които получихме, показват **сигнификантно по-високи концентрации на TNF- α и IFN- γ във FFs на пациентките с лош отговор към КОХС и при тези с нисък фертилизационен индекс**. Тези данни са в съзвучие с данните от други проучвания, при които се установява, че TNF- α има негативен ефект върху броя на аспирираните фоликули и добитите яйцеклетки⁽⁴³⁾, върху качеството на овоцитите⁽³⁸⁾, като фертилизацията може да бъде потисната в следствие условията на хронично възпаление.

Качеството на овоцитите и тяхната фертилизационна компетентност зависят от интрафоликуларната продукция на реактивни кислородни видове (ROS) и от собствените антиоксидантни системи. В този смисъл, SOD и CAT играят централна роля в антиоксидантната защита в яйчника и заедно могат да неутрализират супрафизиологичните нива на ROS.

В предходни ⁽²⁹⁾, както и в настоящите проучвания установихме, че **ниските нива на апоптоза в човешки GLCs корелират с повишена активност на SOD и CAT, а също така, че това е свързано с по-добри резултати след КОХС (повече получени овоцити) и ин витро фертилизация (по-висок фертизационен индекс)**. Тези данни потвърждават редица проучвания, в които оксидативният стрес в гранулозните клетки се свързва с намалена фертилизация на овоцитите при ин витро оплождане и по-ниско качество на получените ембриони ⁽⁴⁴⁾, респ. повишеното ниво и активност на SOD се асоциират с по-добро качество на овоцитите и по-добро ембрионално развитие, повлияни, вероятно, от съотношението оксиданти/антиоксиданти.

Може да се приеме, че вътреклетъчната активност на **анти-оксидантните системи, в частност SOD и CAT**, както в GLCs, така и в cumulus-oophorus комплекса, ⁽⁴⁵⁾ и във FFs ⁽⁴⁶⁾, **могат да бъдат потенциални биомаркери за успеваемостта при IVF-ET.**

В клиничен аспект, до колко можем да въздействаме върху антиоксидантните интрафоликуларни системи чрез добавяне на антиоксиданти (витамин А, Е, С) и хормони (напр. мелатонин) към диетата или евентуално чрез модификация на стимулационната схема, за момента остава дискусабилно. В едно систематично проучване Agrawal *et al.* (2012) посочват, че пероралната суплементация с различни антиоксиданти, макар и обещаваща в някои случаи, няма съществена роля по отношение подобряване резултатите от ин витро оплождане като цяло; изглежда, че качеството на семенната течност при мъжете се подобрява в значително по-голяма степен при приложение на витамин С, витамин Е, ко-ензим Q₁₀ и мелатонин, в сравнение с качеството на получените овоцити при жените след приложение на същите препарати ⁽⁴⁷⁾. Единствено *по отношение на мелатонина, в редица публикации (цитирани и във въпросното проучване), се демонстрира положителната роля на пероралната употреба на мелатонин в доза 3 mg дневно с /без добавка на миоинозитол по отношение на зрелостта на получените овоцити, броя на ембрионите с високо качество и постигнатите клинични бременности* ^{(48), (49), (50)}. Няма единно мнение и по отношение избора на схема за стимулация – с GnRH агонист или с GnRH антагонист. Според Celik *et al.* (2012) стимулационния протокол с GnRH антагонист води до значително понижаване на нивата на глутатион пероксидазата в серума, до

повишаване нивото на SOD във фоликуларните течности, в които обаче се наблюдава и значимо покачване на азотния окис; като цяло авторите заключват, че схемите с GnRH антагонисти се свързват с повишение на интрафоликуларния оксидативен стрес ⁽⁵¹⁾. Други автори посочват, че по принцип овариалната стимулация (в сравнение с нестимулирани жени) снижава активността на SOD, като повишава концентрацията на малондиалдехид и SH-групите в серума, без оглед на ползвания GnRH аналог ⁽⁵²⁾. И в двете проучвания, обаче, авторите посочват, че независимо от всичко, при ползване на различни GnRH аналози, успеваемостта при ин витро оплождане е сходна – по отношение на качеството на овоцитите и ембрионите, а също и по отношение на клиничните бременности и спонтанните аборти ^{(51), (52)}.

Лизил оксидазата участва в процеси, свързани с диференциацията на гранулозните клетки ⁽⁵³⁾. TGF- β 1 и GDF-9 повишават LOX mRNA експресията в гранулозните клетки при плъхове (54). Ин витро GDF-1 индуцирания растеж на преантрални фоликули е съпроводен с повишена експресия на LOX mRNA в муралните гранулозни клетки ⁽⁴⁵⁾. Според Harlow *et al.* (54), докато в примордиалните и най-вече в преантралните фоликули GDF-9 увеличава екстремно LOX експресията, то в антралните фоликули, където е налице експресия на FSH рецепторите, фоликулостимулиращият хормон значително и дозо-зависимо намалява LOX експресията, атенюирайки ефекта на GDF-9. В този контекст, нивата на експресия на LOX mRNA и LOX се очаква да бъдат по-скоро намалени при жени в стимулация за ин витро оплождане. Изследванията на Jiang *et al.* (2010), както и на Harlow *et al.* (2003) върху гранулозни клетки при плъхове сочат, че LOX транскриптите са сигнификантно потиснати 48 часа след инжектиране с хорионгонадотропин в сравнение с нетретирани контроли ^{(54), (53)}. Нещо повече, ъпрегулацията на LOX в мурални GLCs при плъхове е 2.8 x по-висока във фоликули с овоцити с добър фертилизационен потенциал, спрямо такива с лош ⁽⁵³⁾.

В хода на настоящите проучвания **установихме точно обратния феномен** - LOX mRNA експресията е значимо по-силно изразена при жени с първичен и в много по-малка степен при тези вторичен стерилитет, подложени на процедура за ин витро оплождане, спрямо здрави овоцитни донорки или жени с мъжки фактор на безплодие.

Обяснението на тези резултати може да бъде намерено в няколко насоки. От една страна са възможни известни междувидови различия; от друга – в нашето проучване обект на изследване бяха кумулусните клетки (тъй като те непосредствено контактуват с овоцита), а от трета – наблюдаваните различия така или иначе са между стимулирани жени, като обичайната практика е, овоцитните донорки и тези с мъжки фактор за безплодие да бъдат хиперстимулирани в по-голяма степен, поради нуждата от повече овоцити за оплождане. Освен това, има данни от експериментални модели, че повишената експресия на LOX се свързва с блокиране на овоцитната матурация, вероятно чрез инхибиране на прогестерон-зависимата активация на MPF (maturation promoting factor) ⁽⁵⁵⁾.

NF-kB е друг потенциален генен биомаркер за предикция качеството на овоцитите. Установи се, че е активиран при всички жени с репродуктивни проблеми в сравнение с нормалните контроли. Този факт е лесно обясним, като се има предвид, че NF-kB е транскрипционен фактор, замесен в клетъчния отговор към бактериални и вирусни антигени, ROS и редица цитокини. Така например, при жени с ендометриоза, в перитонеалната течност освен активирани макрофаги, се открива и повишена активност на NF-kB, което от своя страна води до прогресия на заболяването, чрез транскрипция на гени, отговорни за синтеза на редица цитокини, растежни фактори, вазогенни фактори, адхезивни молекули и индуцируеми ензими като NO-синтетаза и циклооксигеназа ⁽⁵⁶⁾. Би било интересно неговото по-нататъшно изследване при жени с различни причини за безплодие, както и ползването му като предиктивен диагностичен тест при жени в програма за асистирана репродукция.

Ролята на мелатонина във фоликуларната стероидогенеза е комплексна и варира в зависимост клетъчния тип (фоликуларен / стромален), животинския вид, начина на третиране и дозата ^{(57), (58)}.

От данните в настоящото проучване е видно, че е налице стимулиране експресията на P450arom от мелатонин в наномоларни концентрации, кореспондиращи с тези във FFs. На пръв поглед *тази констатация е в противоречие с предишни изследвания*, показващи инхибиторния ефект върху експресията на P450arom в ракови клетки от карцином на млечната жлеза ⁽⁵⁹⁾. Нещо повече, неведнъж е констатирано, че MEL стимулира прогестероновата синтеза от гранулозните клетки,

но не проявява ефект върху нивата на естрогените^{(60), (61)}. Това може да бъде обяснено с някои други аспекти от функцията на гранулозните клетки в растящите фоликули. Скорошни проучвания демонстрират MEL стимулиране на бета-канениновия анти-апоптозен път и митохондриалната функция⁽⁶²⁾, които изглеждат са важни за FSH/cAMP стимулация на ароматазната активност в гранулозните клетки по време на фоликуларната диференциация⁽⁶³⁾.

Нашият възглед е, че *една от важните функции на MEL във фоликуларната течност е да регулира активността на андроген-конвертиращия ензим, а следователно и диференциацията и компетентността на гранулозните клетки*, обслужващи растящия овоцит. Това се подкрепя от наблюденията ни върху по-силния имуно-флуоресцентен сигнал за *alpha-tubulin* при третиранията с MEL GLCs в сравнение с нетретиранията контроли, както и от ко-локализацията на MT₁ и *alpha-tubulin* в перинуклеарната зона, където апарата на Голджи и микротубулите си взаимодействат при организиране на везикулите и транспорта между органелите.

Проучвания върху микротубулната полимеризация показват, че мелатониновите ефекти върху цитоскелета в наномоларни концентрации са медиирани от антагонизмът му към Ca²⁺/calmodulin⁽⁶⁴⁾. Този антагонизъм включва превенция на инхибицията на микротубулната организация чрез конкуренция за Ca²⁺, водещ до нарастване на размерите на микротубулите. Най-вероятно сигналната каскада включва модулация на мелатониновите рецептори, които се знае, че участват в процесите на микротубулна полимеризация и деполимеризация^{(65), (66), (67)}.

В обобщение, *възрегулацията на мелатониновите рецептори под въздействието на мелатонин в човешки GLCs и асоциираните с това диференциационни ефекти насочват към важната физиологична роля на пинеалния хормон в процесите на фоликулогенезата*, нещо което следва да бъде проучвано и в бъдеще.

5. Изводи

От резултатите на настоящата работа можем да направим следните изводи:

1. Потвърждава се хипотезата, че имунологични механизми, в частност анти-GLC антитела (и техните антигени) играят важна роля в случаи на безплодие при жени за асистирана репродукция чрез IVF.

2. Наличието на AGA при жени в програма за ин витро оплождане не повлиява значимо отговора към контролираната овариална стимулация, но е в негативна корелация с оплодителната компетентност (качеството) на получените овоцити.

3. Установена е позитивна корелация между наличието на AGA, нивото на апоптоза в GLCs и концентрацията на Th₁ цитокини във FFs на инфертилни жени, което позволява допускането за съществена роля на TNF- α и IFN- γ в програмираната клетъчна смърт на гранулозните клетки и генезата на авто-имунитет срещу GLCs.

4. Повишените нива на апоптоза и на TNF- α and IFN- γ водят до смутена фоликулогенеза с намален брой на качествените овоцити след COHS и слаба фертилизационна способност на овоцитите при ин витро оплождане, което води и до лоши резултати по отношение на получените бременности след проведената асистирана репродукция, особено при жени с овариален фактор за безплодие.

5. Високите нива на вътреклетъчните анти-оксиданти супероксид дисмутаза и каталаза се асоциират с ниски нива на апоптоза и с по-добри резултати след IVF-ET, което открива възможности за подобряване на резултатите чрез антиоксидантна терапия.

6. Предвид установената връзка между степента на апоптоза в мурални GLCs и CCs и броя на предовулаторните фоликули, броя на добитите и оплодени овоцити, може да се приеме, че установяването на нивото на апоптоза в GLCs/CCs е важен маркер, корелиращ с успеваемостта при IVF-ET.

7. Експресията на LOX в човешки кумулусни клетки предполага, че тя може да бъде важен индикатор за развитието на овоцитите и също да бъде потенциален биомаркер за тяхната фертилизационна компетентност, нещо което следва да бъде допълнително проучено.

8. При жени с репродуктивни проблеми, особено при тези с вторичен стерилитет е установена повишена експресия на транскрипционния фактор NF- κ B.

9. Човешките гранулозни клетки в клетъчна култура експресират рецептори за мелатонин MT₁ и MT₂.

10. Ин витро мелатонин в концентрация 10 nM повишава експресията на ароматаза P450 в клетъчни култури на гранулозо-лутеинни клетки, което е съпътствано от интензивни промени в експресията на алфа-тубулин и рецептора за мелатонин.

6. Авторска справка

6.1. Научни приноси:

1. При голям брой пациенти са изследвани фенотипни характеристики на гранулозо-лутеинни клетки и състава на фоликулната течност от преовулаторни фоликули, като са идентифицирани потенциални биомаркери за статуса на субфертилитет при жени, участващи в програма за асистирана репродукция чрез ин витро оплождане.

2. Установено е, че матurationната компетентност на развиващия се овоцит зависи от експресията на специфични генни продукти в заобикалящите го гранулозни и кумулусни клетки, които осигуряват адекватна антиоксидантна защита.

3. Важни диференциращи характеристики на гранулозо-лутеинните клетки, като експресията на P450 – ароматаза и динамиката на цитоскелетните промени зависят от наличието и активирането на рецептори за мелатонин тип MT₁ и MT₂.

6.2. Публикации, свързани с дисертацията:

1. **Nikolov G**, Georgiev G, Marinova E, Mourdjeva M, Konakchieva R. Up-regulation of MT1 and MT2 receptors by in-vitro melatonin and modulation of alpha-tubulin and aromatase P450 expression in human granulosa-lutein cells. *Compt Rend Bulg Acad Sci*, 2018 (accepted).

2. Dineva J, Vangelov I, Todorova K, Abrashev R, Gulenova D, **Nikolov G**, Angelova M, Ivanova M. Study on the relationship of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in granulosa luteinized cells with controlled ovarian hyperstimulation / in vitro fertilization outcome in infertile women. *Compt Rend Bulg Acad Sci*, 2012, 63 (2): 181 – 186;

3. Vangelov I, Dineva J, **Nikolov G**, Gulenova D, Ivanova M. Relationship among anti-granulosa luteinized cells antibodies, apoptosis of granulosa cells, levels of TNF- α and IFN- γ in follicular fluids of infertile women. *Compt Rend Bulg Acad Sci*, 2008, 61 (3): 341 – 348;

4. Dineva J, Vangelov I, **Nikolov G**, Gulenova D, Ivanova M. Apoptosis of human granulosa luteinized (GLCs) and cumulus cells as a possible indicator for IVF outcome. *Compt Rend Bulg Acad Sci*, 2006, 59 (7): 769 – 772;

5. Vangelov I, Dineva J, **Nikolov G**, Lolov S, Ivanova M. Antibodies against granulosa luteinized cells and their targets in women attending IVF program. *AJRI*, 2005; 53:106-112

6. Dineva J, **Nikolov G**, Vangelov I, Konakchieva R, Ivanova M. Apoptosis of human granulosa luteinized (GLCs) and cumulus cells (CCs) in relation to age of women. *Compt Rend Bulg Acad Sci*, 2004, 57 (8): 113-116

6.3. Участия в научни форуми:

1. **Nikolov G**. Plenary lecture: “Translational science in assisted reproduction”; presented at the 15th International Symposium for Immunology of Reproduction - 2018, Varna;

2. Vangelov I, Dineva J, **Nikolov G**, Ivanova M. Evolutionary conserved antigens are recognized by anti-granulosa cell IgG antibodies present in sera of infertile women. 2012, *AJRI*, 67 (suppl. 1): 23-60; presented at the 13th International Symposium for Immunology of Reproduction - 2012, Varna

3. Динева Ж., Вангелов И., Опрева М., Стефанова Цв., Гуленова Д., **Николов Г.**, Иванова М. „Връзка между фоликуларните концентрации на азотния оксид с концентрациите на серумните стероиди (естрадиол и прогестерон), апоптозата на гранулоза лутеинните клетки и с резултатите от СОН/IVF“; 11^{ти} Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и Хормоно-заместителна Терапия, 2010, Пловдив

4. Динева Ж., Вангелов И., Абрашев Р., Гуленова Д., **Николов Г.**, Чаушев Т., Стаменов Г., Ангелова М., Иванова М. „Връзка между активността на антиоксидантните ензими SOD/CAT във фоликулни течности (FFIs) и гранулоза лутеинни клетки (GLCs) с резултатите от СОН/IVF при инфертилни пациентки“; 11^{ти} Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и Хормоно-заместителна Терапия, 2010, Пловдив

5. **Nikolov G**, Plenary lecture: "Premature Ovarian Failure (POF), Poor Ovarian Response (POR) and Autoimmunity". ESHRE symposium on premature ovarian failure and poor ovarian response; 2007, Sofia

6. **Nikolov G**, Daneva T, Vangelov I *et al.*, P460: "Anti-granulosa luteinized cell antibodies in women attending IVF programme"; 2002, *Hum Reprod*, 17 (S1): i156; presented at the ESHRE annual meeting – 2002, Vienna.

7. Използвана литература:

1. **Mascarenhas M, Flaxman S et al.** National, regional and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *Plos Medicine Open Access*.

2. **CIA.** Mother's mean age at first birth. *The World Factbook*. [Online] <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2256.html>.

3. Данни от лечебните заведения по асистирана репродукция. *ИАТ - регистри и статистика*. [Online] <https://bgtransplant.bg/iat/registers%20and%20statistics.php>

4. **Medicine, ALPHA Scientists In Reproductive and Embryology, ESHRE SIG.** Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2011, Vol. 22, 6, pp. 632-646.
5. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, Vol. 1, 193, pp. 265–275.
6. **Dineva J, Nikolov G, Vangelov I, Konakchieva R, Ivanova M.** Apoptosis of human granulosa luteinized (GLCs) and cumulus cells (CCs) in relation to age of women. *Compt rend Acad bulg Sci*. 2004, Vol. 8, 57, pp. 113-116.
7. **Beauchamp C, Fridovich I.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971, Vol. 1, 44, pp. 276-287.
8. **Beers RF Jr., Sizer IW.** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*. 1952, Vol. 1, 195, pp. 133-140.
9. **Barbarino-Monnier P, Gobert B et al.** Antiovary antibodies, repeated attempts and outcome of an in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1991, 56, p. 928.
10. **Geva E, Fait G, Lerner-Geva L et al.** The possible role of antiovarian antibodies in repeated in vitro fertilization failures. *AJRI*. 1999, 42, pp. 292-296.
11. **Horejsi J, Martinek J, Novakova D, Madar J, Brandejska M.** Autoimmune antiovarian antibodies and their impact on the success of an IVF-ET program. *Ann NY Acad Sci*. 2000, 900, pp. 351-356.
12. **Gobert B, Barbarino-Monnier P, Guillet-May F, Bene MC, Faure GC.** Anti- ovary antibodies after attempts at human in vitro fertilization induced by follicular puncture rather than hormonal stimulation. *J Reprod Fert*. 1992, 96, pp. 213–218.
13. **Vangelov I, Nikolov G, Lolov S, Ivanova M.** Identification of putative targets for anti-granulosa luteinized cells antibodies (AGA) in women attending IVF programme. *Compt rend Acad bulg Sci*. 2004, Vol. 3, 57, pp. 93–96.
14. **Luborsky JL, Thiruppathi P, Rivnay B, Roussev R et al.** Evidence for different aetiologies of low estradiol response to FSH: age- related accelerated luteinization of follicles or presence of ovarian autoantibodies. *Hum Reprod*. 2002, 17, pp. 2641-2649.
15. **Luborsky J, Pong R.** Pregnancy outcome and ovarian antibodies in infertile patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *AJRI*. 2000, 44, pp. 261–265.
16. **Ivanova M, Vatev I, Mollova M, Nakov L .** Studies on the clinical significance of ZP antibodies in women undergoing assisted reproduction. *ART Androl*. 1994, 6, p. 57.
17. **Nikolov G, Daneva T et al.** Anti- granulosa luteinized cell antibodies in women attending an IVF programme. *Hum Reprod*. 2002, 17, p. 156.
18. **Ulcova-Galova Z, Mardesic T.** Does in vitro fertilization (IVF) influence the levels of sperm and zona pellucida (ZP) antibodies in infertile women? *AJRI*. 1996, 36, pp. 216–219.
19. **Hovav J, Almagor M et al.** Immunity to zona pellucida in women with low response to ovarian stimulation in unexplained infertility and after multiple IVF attempts. *Hum Reprod*. 1994, 9, pp. 643–645.

20. **Gobert B, Barbarino-Monnier P, Bene MC, Faure GC.** Ovary antibodies after IVF *Lancet* 335 (8691): 723. *Lancet.* 335, 1990, Vol. 8691, p. 723.
21. **Ben-Rafael Z, Benadiva CA, García CJ, Flickinger GL.** Cortisol stimulation of estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells is independent of follicle-stimulating hormone effects. *Fertil Steril.* 1988, Vol. 49, 5, pp. 813-816.
22. **Rein MS, Jackson KV, Sable DB, Thomas PP, Hornstein MD.** Dexamethasone during ovulation induction for in-vitro fertilization: a pilot study. *Hum Reprod.* 1996, Vol. 11, 2.
23. **Lee SK, Han AR.** Immune modulation of i.v. immunoglobulin in women with reproductive failure. *Reprod Med Biol.* 2018, 17, pp. 115–124.
24. **Host E, Mikkelsen AL, Lindeberg S, Smidt-Jensen S.** Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000, 79, pp. 936–940.
25. **Oosterhuis GJ, Michgelsen HW et al.** Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: A possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1998, 70, pp. 747–749.
26. **Suh C, Jee B, Choi Y et al.** Prognostic Implication of Apoptosis in Human Luteinized Granulosa Cells During IVF–ET. *J Assist Reprod Gen.* 2002, Vol. 5, 19, pp. 209-214.
27. **Nakahara K, Saito H, Saito T et al.** The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril.* 1997, Vol. 2, 68, pp. 312-317.
28. **Nakahara K, Hidekazu S, Takakazu S et al.** Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1997, 67, pp. 302-308.
29. **Dineva J, Vangelov I, Abrashev R, Gulenova D, Nikolov G, Angelova M, Ivanova M.** Survival role of intracellular superoxide dismutase (SOD) and catalase for human granulosa luteinized cells. A preliminary study. *Compt rend Acad bulg Sci.* 2010, Vol. 10, 63, pp. 1463-1470.
30. **Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M.** Effects of aging on ovarian fecundity in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet.* 2000, Vol. 3, 17, pp. 168-173.
31. **Andreanis CL, Payne DW et al.** Cytokine-mediated Regulation of Ovarian Function: TNF-alfa inhibits gonadotropin supported ovarian androgen biosynthesis. *J Biol Chem.* 1991, Vol. 11, 266, pp. 6761-6766.
32. **Cacciapaglia F, Spadaccio C, Chello M et al.** Apoptotic molecular mechanisms implicated in autoimmune diseases. *Eur Rev Med Pharmacoll Sci.* 2009, 13, pp. 23-40.
33. **Hill JA, Welch WR, Faris HM, Anderson DJ.** Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma: a potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* *Am J Obstet Gynecol,* 1990, Vol. 162, 2, pp. 534-540.
34. **Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A.** Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994, Vol. 179, 4, pp. 1317-1330.

35. **Gaipl US, Voll RE, Sheriff A et al.** Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005, Vol. 4, 4, pp. 189-194.
36. **Srivastava MD, Lippes J, Srivastava BI.** Cytokines of the human reproductive tract. *AJRI.* 1996, 36, pp. 157-166.
37. **Bili H, Tarlatzis BC, Daniilidis M.** Cytokines in the human ovary: Presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *JARG.* 1998, Vol. 15, 2, pp. 93–98.
38. **Lee KS, Joo BS et al.** Relationships between concentrations of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet.* 2000, Vol. 17, 4, pp. 222–228.
39. **Cerkiene Z, Eidukaite A, Usoniene A.** Follicular fluid levels of interleukin-10 and interferon-gamma do not predict outcome of assisted reproductive technologies. *AJRI.* 2008, Vol. 59, 2, pp. 118-126.
40. **al., Souter I et.** Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009, Vol. 91, S5, pp. 2012 - 2019.
41. **Quirk SM, Porter DA, Huber SC, Cowan RG.** Potentiation of Fas-Mediated Apoptosis of Murine Granulosa Cells by Interferon-g, Tumor Necrosis Factor-a and Cycloheximide. *Endocrinology.* 1998, Vol. 139, 12, pp. 4860–4869.
42. **Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP.** Fas Antigen-Mediated Apoptosis in Human Granulosa/luteal Cells. *Biol Reprod.* 1995, Vol. 52, 2, pp. 279-287.
43. **Souter I, Huang A et al.** Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009, Vol. 91, S5, pp. 2012-2019.
44. **Plessis SS, Makker K., Desai NR, Agarwal A.** Impact of oxidative stress on IVF. *Exp Rev Obst Gynecol.* 2008, Vol. 3, 4, pp. 539–554.
45. **Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H.** Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod.* 2009, 7, pp. 411–419.
46. **Pasqualotto EB, Lara LV et al.** The role of enzymatic antioxidants detected in the follicular fluid and semen of infertile couples undergoing assisted reproduction. *Hum Fertil (Camb.).* 2009, 12, pp. 166–171.
47. **Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS.** Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014, Vol. 112, 12.
48. **Tamura H, Nakamura Y et al.** Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol.* 2008, 25, pp. 291-303.
49. **Batioglu AS, Sahin U, Gurlek B, Ozturk N, Unsal E.** The efficacy of melatonin administration on oocyte quality. *Gynecol Endocrinol.* 2012, 28, pp. 91-93.
50. **Eryilmaz OG, Devran A.** Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. *J Assist Reprod Genet.* 2011, 28, pp. 815-820.

51. **Celik E, Celik O et al.** A comparative study on oxidative and antioxidative markers of serum and follicular fluid in GnRH agonist and antagonist cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012, Vol. 29, 11, pp. 1175–1183.
52. **Tulic L, VidaKovic S et al.** Oxidative Stress Markers in GnRH Agonist and Antagonist Protocols in IVF. *J Med Biochem.* 2017, Vol. 36, 2, pp. 163–170.
53. **Jiang J, Xiong H, Cao M, Xia X, Sirard M, Tsang BK.** Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence. *J Ov Res.* 2010, 3.
54. **Harlow CR, Rae M, Davidson L, Trackman PC, Hillier SG.** Lysyl oxidase gene expression and enzyme activity in the rat ovary: regulation by follicle-stimulating hormone, androgen, and transforming growth factor- β superfamily members in vitro. *Endocrinology.* 2003, 144, pp. 154-162.
55. **Di Donato A, Lacal JC et al.** Micro-injection of recombinant lysyl oxidase blocks oncogenic p21-Ha-Ras and progesterone effects on *Xenopus laevis* oocyte maturation. *FEBS Letters.* 1997, 419, pp. 1873-3468.
56. **al., Gupta et.** Oxidative stress and its role in endometriosis. [book auth.] Sallam H Rizk B. *Clinical Infertility and In Vitro Fertilization.* London : Jaypee Bros Medical Publishers, 2012, pp. 316-326.
57. **Woo MMM, Tai CJ, Kang SK et al.** Direct action of melatonin in human granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86, pp. 4789-4797.
58. **Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y, Amemiya A, Sumi Y.** Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5, pp. 402-408.
59. **Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ.** Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem.* 2010, 17, pp. 4462–4481.
60. **Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R, Janssen K, Smitz J.** Melatonin has dose dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicol.* 2006, 228, pp. 333-343.
61. **Tanavde VS, Maitra A.** In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. *Endocr Res.* 2003, 29, pp. 399-410.
62. **Jeong JK, Lee JH, Moon JH, Lee YJ, Park SY.** Melatonin-mediated β -catenin activation protects neuron cells against prion protein-induced neurotoxicity. *J Pineal Res.* 2014, 57, pp. 427-434.
63. **Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, et al.** Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires β -catenin. *PNAS.* 2006, 103, pp. 12435-12440.
64. **Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G.** Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res.* 1994, 17, pp. 55-62.
65. **G, Benítez-King.** Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006, 40, pp. 1-9.
66. **Jarzynka M, Deepshikh K et al.** Microtubules Modulate Melatonin Receptors Involved in Phase-shifting Circadian Activity Rhythms: in vitro and in vivo evidence. *J Pineal Res.* 2009, 46, pp. 161-171.
67. **Yan K, Popova JS, Moss A, et al.** Tubulin stimulates adenylyl cyclase activity in C6 glioma cells by bypassing the beta-adrenergic receptor: a potential mechanism of G protein activation. *J Neurochem.* 2001, 76, pp. 182-190.