МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

Антон Иванов Коларов

ЦИТОСКЕЛЕТНИ ПРОМЕНИ В МИШИ ОВОЦИТИ ПРИ МОДЕЛ НА ОСТЕОАРТРИТ И МОДУЛАЦИЯ ОТ РЕПРОДУКТИВНИ ХОРМОНИ

ДИСЕРТАЦИЯ
за присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Област на висше образование
4. „Природни науки, математика и информатика“
Професионално направление 4.3. „Биологически науки“
Докторска програма „Ембриология“

Научен ръководител:
Проф. Ралица Стефанова Живкова, д.б.

София, 2025

Изказвам сърдечна благодарност на научния си ръководител Проф. Ралица Стефанова Живкова за ценните напътствия и всестранната помощ.

Благодаря и на колегите от катедра Биология за подкрепата при разработването на този труд.

Списък на съкращенията

АМХ – анти-мюлеров хормон

БАБХ – Българската агенция по безопасност на храните

БАН – Българска академия на науките

ГДФ – гуанозин дифосфат

ГОХ – гонадотропин-освобождаващ хормон (*GnRH*)

ГТФ – гуанозин трифосфат

ЕРБОЖ – Експериментална развъдна база за опитни животни към БАН

ИБИР – Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“

КИОА – колагеназно-индуциран остеоартрит

ЛХ – лутеинизиращ хормон

ОА – остеоартрит

ФСХ – фоликуло-стимулиращ хормон

ХГ – хорионен гонадотропин

цАМФ – цикличен аденозин монофосфат

17β-HSD – 17*β*-хидростероид-дехидрогеназа

Akt – протеин киназа *B*

aMTOC – ацентриолен *MTOC*

ANOVA – еднофакторен дисперсионен анализ (*Analysis of Variance*)

APC/C – anaphase-promoting complex/cyclosome

Arp2/3 – actin-related protein 2/3 complex

BMP – bone morphogenetic protein

BRCA1 – breast cancer type 1

BSA – bovine serum albumin

Cdc42 – cell division cycle 42

CDK1 – cyclin-dependent kinase 1

CDK5RAP2 – CDK5 regulatory subunit-associated protein 2

CEP120 – centrosomal protein of 120 kDa

CEP152 – centrosomal protein of 125 kDa

CEP192 – centrosomal protein of 192 kDa

CEP63 – centrosomal protein of 63 kDa

CIP2A – cancerous inhibitor of protein phosphatase PP2A

COC – кумулус-овоцитен комплекс

CPC – chromosomal passenger complex

Cx37 – connexin 37

Cx43 –connexin 43

CYP19A1 – цитохром *P450* монооксигеназа (ароматаза)

Ect2 – eptithelial cell transforming 2 (ГТФ-натоварващ фактор)

Eg5 – kinesin family member 11 (*KIF11*)

Erα – естрогенен рецептор *α*

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуорохром за зелен цвят)

GDF9 – growth differentiation factor 9

GH – Games-Howell статистически пост-хок тест

GV – germinal vesicle; стадий с герминален везикул

GVBD – germinal vesicle breakdown

Haspin – histone H3-associated protein kinase

ICR – порода лабораторни мишки *Institute of Cancer Research*

IGF – insulin-like growth factor

IL-1 – интерлевкин 1

IL-6 – интерлевкин 6

INCENP – inner centromere protein

KIF2A – kinesin family member 2A

Kit – тирозин-киназен рецептор

Kit-лиганд – вид цитокин (*stem cell factor*; *SCF*)

KW – Kruskal-Wallis статистически тест

LSCM – лазерен сканиращ конфокален микроскоп

MCAK – mitotic centromere-associated kinesin

MCC – mitotic checkpoint complex

MMP-13 – *matrix metalloproteinase*-13

Mos – Moloney sarcoma oncogene

MPF – maturation/M phase promoting factor (*CDK1* с циклин *B1* или *B2*)

MTOC – microtubule-organizing center

mTOR – mammalian target of rapamycin

MW – Mann-Whitney статистически тест

MYLCK – myosin light chain kinase

N-WASP – neuronal Wiskott–Aldrich syndrome protein

NEDD1 – neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1

PBS – phosphate buffered saline

PCM – перицентриолен материал

PCNT – pericentrin

PGF2α – простагландин *F2α*

PGF2α – простагландин *F2α*

PI3K –phosphatidylinositol 3-kinase

Plk1 – polo-like kinase 1

Plk4 – polo-like kinase 4

Rab11a – ras-related protein Rab-11A

Rac – ras-related C3 botulinum toxin substrate

RAD21 – double-strand-break repair protein rad21 homolog

Ran – ras-related nuclear protein

RCC1 – regulator of chromosome condensation 1

RhoA – ras homolog family member A

SAC – spindle assembly checkpoint

SGO1 – shugoshin-1

SGO2 – shugoshin-2

Spire1/2 – spire type actin nucleation factor 1/2

TGF-β – transforming growth factor β

TLR4 – toll-like receptor 4

TNF-α – tumor necrosis factor α

Tpx2 – targeting protein for Xklp2

TRITC – tetramethylrhodamine-5/-6-isothiocyanate (флуорохром за червен цвят)

γ-TuRC – γ-tubulin ring complex

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията ... *3*

ВЪВЕДЕНИЕ ... *9*

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР ... *11*

1. Овогенеза при бозайниците ... **11**
1.1. Мейотично зреене на овоцитите ... 12
1.2. Специфики на мейотичните преобразувания при овогенезата ... 14

2. Преобразувания на овоцитния цитоскелет и хроматина по време на мейотичното зреене ... **16**
2.1. Моделната система при мишка – основа за изучаване на овогенезата на бозайниците ... 16
2.2. Образуване на мейотично делително вретено ... 17
2.3. Динамика на актиновия цитоскелет по време на мейотичното зреене на овоцити при бозайници ... 22

3. Фоликулогенеза и хормонални влияния върху нейния ход ... **32**
3.1. Роля на гонадотропините и яйчниковите стероидни хормони ... 33
3.2. Роля на нестероидни хормони, секретирани от яйчниците ... 38
3.3. Локални механизми на фоликулогенезата и овогенезата ... 39

4. Възпаление: остеоартрит и простагландини ... **43**
4.1. Остеоартрит при човек и миши модел на колагеназно-индуциран остеоартрит ... 43
4.2. Простагландин *F2α* като медиатор на възпалението по време на овогенезата ... 47

5. Заключение ... **50**

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ ... *52*

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ... *53*

1. Експериментални животни ... **53**
1.1. Групи за оценка на влиянието на КИОА, Е2 и ФСХ ... 53
1.2. Групи за оценка на влиянието на простагландин *F2α* ... 56

2. Хормонална овариална стимулация, изолиране и фиксиране на овоцитите за анализ ... **57**

3. Имунофлуоресцентно оцветяване на овоцитите ... **58**

4. Специфични консумативи и апаратура ... **59**

5. Изследване на овоцитите – епифлуоресценция и лазерна сканираща конфокална микроскопия ... **60**

6. Статистическа обработка на данните ... **60**

РЕЗУЛТАТИ ... *62*

1. Общ брой и разпределение на анализираните овоцити ... **62**

2. Микроскопски анализ на овоцитите ... **64**
2.1. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ ... 64
2.2. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на простагландин *F2α* ... 78

3. Статистически анализ на данните, получени за овоцитите при въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ ... **80**
3.1. Сравнение на групите при некомбинирани фактори ... 80
3.2. Сравнение при комбинирането на остеоартрит и Е2 ... 90
3.3. Сравнение при комбинирането на остеоартрит и ФСХ ... 103
3.4. Обобщение на резултатите при изследване на влиянието на остеоартрит, Е2 и ФСХ ... 114

ОБСЪЖДАНЕ ... *119*

1. Влияние на КИОА върху цитоскелета и хроматина на овоцитите 119

2. Влияние на третирането на животните с естрадиол върху цитоскелета и хроматина на овоцитите 127

3. Влияние на третирането на животните с ФСХ върху цитоскелета и хроматина на овоцитите..... 132

3.1. Наличие на овоцити след метафаза II при групите с ФСХ..... 138

4. Ефект на режима на прилагане на простагландин *F2α*..... 139

5. Заключение 142

ИЗВОДИ 143

ПРИНОСИ 144

ФИНАНСИРАНЕ..... 145

ПУБЛИКАЦИИ..... 145

ЛИТЕРАТУРА 146

ВЪВЕДЕНИЕ

Овогенезата на бозайниците е процес, в който са въвлечени прецизни механизми на координация между диференцирането на женските гамети и спецификата на ембрионалния, постембрионалния и репродуктивния период с техните хормонални флуктуации и контрол, клетъчни и молекулно-биологични взаимодействия. В хода на развитието през ранния ембрионален етап се оформят диплоидните предшественици на женските полови клетки (овогониите) и първичните овоцити започват мейоза. През феталния етап се осъществява арест на първичните овоцити през мейотичната профаза I и оформяне на примордиалните фоликули в яйчника, след което настъпва период на относителен предпубертетен покой с различна продължителност съобразно вида. Оста хипоталамус – хипофиза – овариум контролира развитието, репродукцията и стареенето при женските бозайници. Репродуктивният период, контролиран от тази ос, осигурява циклично възобновяване на мейозата, зреене на фоликулите и овулация на яйцеклетки, годни за оплождане. Гонадотропин-освобождаващият хормон на хипоталамуса контролира цикличните процеси в яйчника, като стимулира секреция на гонадотропни хормони от предния дял на хипофизата (фоликулостимулиращ и лутеинизиращ хормон). От своя страна яйчниковите хормони (главно естрадиол и прогестерон) модулират овариалната динамика и фоликулогенезата и предоставят обратна връзка към хипоталамуса. Въпреки наличието на видово-специфични детайли на овогенезата при бозайници, оста хипоталамус – хипофиза – яйчник е широко приложима при моделни животни за целите на репродуктивната биология. Разработени са прецизни схеми за овариална стимулация на множествена овулация и добив на яйцеклетки. Мишият модел е един от най-често използваните в изследвания на различни аспекти на мейозата и структурните особености на яйцеклетките.

Използването на миши модели обаче има по-широко приложение: споделяйки общи за бозайниците и човека характеристики, те страдат и от много заболявания, типични за хората. Създаването на миши модели на човешки заболявания позволява както изучаване на етиологията, патогенезата и

терапевтичното повлияване на заболяването, така и изследване на взаимодействията с други състояния. Миши модел на остеоартрит (колагеназно-индуциран остеоартрит) е използван в настоящото изследване за изясняване на ефекта от действието на репродуктивни хормони, насложени към патологията на остеоартрита, върху промените и преобразуванията на овоцитния цитоскелет (тубулинов и актинов) и хроматина на овулирани миши яйцеклетки.

Избраните хормонални въздействия съчетават влияние на естрадиол, фоликулостимулиращ хормон и простагландин *F2α*. Остеоартритът засяга предимно хора в относително напреднала възраст и е по-чест при жени, но симптоматиката му се проявява и при по-млади пациенти с повторяемо ставно натоварване – спортисти, инструментални музиканти и танцьори. Макар че доскоро е разглеждан като състояние на възпаление само на ангажираните стави, съществуват и данни за участие на системни фактори на възпалението. Така въпросът за евентуалното влияние на остеоартрита върху фоликулогенезата и овогенезата при пациентки в репродуктивна възраст добива значение. Въздействие при третиране с естрадиол и фоликулостимулиращ хормон на мишки с колагеназно-индуциран остеоартрит има отражение не само върху патогенезата на остеоартрита (което не е предмет на настоящото изследване), но и върху статуса на яйцеклетките. Промените в мейотичните вретена, компактизацията и подредбата на хромозомите в метафазни пластинки, както и оформянето на актинови шапки са изследвани при различни режими на въздействие на хормоните. За моделиране на влиянието на възпалението върху тези овоцитни структури е проведено третиране на овулираните яйцеклетки с възпалителния медиатор простагландин *F2α*, след което отново са оценени настъпилите промени в цитоскелета и хроматина. По този начин представеният труд предоставя данни на клетъчно ниво за механизмите, чрез които остеоартритът, а вероятно и други възпалителни състояния, въздействат върху овогенезата.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Овогенеза при бозайниците

Овогенезата при бозайниците може да се разглежда като паралел между мейотичните събития, съпътстващи зреенето на овоцитите, от една страна, и динамиката на хормоналния контрол през фоликулогенезата, който осигурява растежа на доминантни фоликули до преовулаторна фаза (Граафови фоликули), от друга. Сложна координация, включваща специфики на клетъчния цикъл през мейотичното зреене и контрол по оста хипоталамус – хипофиза – овариум на двата паралелни процеса, осигурява овулацията. Механизмите на тази координация са сложни и донякъде консервативни за овогенезата на гръбначните (Kanda, 2019).

Намножаването на овогониите (незрелите диплоидни предшественици на овоцитите) протича през ембриогенезата на бозайниците. Поради различната продължителност на вътреутробното развитие (при човек около 40 седмици, а при мишка приблизително 3 седмици) времето, през което овогониите се намножават чрез митоза, също е различно. През относително продължителната човешка бременност митотичните цикли на овогониите протичат до около 8 – 13 гестационна седмица, докато при мишка овогониите спират да се делят митотично в края на втората седмица от кратката им бременност.

Синхронно делящите се овогонии чрез непълна цитокинеза образуват групи от свързани чрез цитоплазмени мостчета клетки, наречени зародишни гнезда. Впоследствие соматични клетки (наричани на този етап прегранулозни) навлизат в зародишните гнезда, обграждат герминативните клетки и ги разделят. Прегранулозните клетки, заобиколили една герминативна клетка, изграждат около нея плосък епителен слой с тънка базална мембрана и така образуват примордиален фоликул. С това периодът на митотична активност във феталния яйчник затихва. Герминативните клетки в примордиалните фоликули навлизат в мейоза, а тези, които са останали извън фоликулите, търпят апоптоза. Краят на митотичните деления и началото на мейозата (и апоптозата, която съпътства

неуспешното образуване на примордиални фоликули) определя бъдещия овоцитен резерв на женския бозайник (Hadzhinesheva et al., 2018).

1.1. Мейотично зреене на овоцитите

Превръщането на овогониите в първични овоцити е свързано със започване на първото мейотично делене. Неговата профаза преминава своя лептотенен и зиготенен период с характерната за тях паралелна конюгация на хомоложните хромозоми, следвани от пахитен, през който протича хомоложната рекомбинация на мейозата (кросинговър) между хомолозите от бивалента. Скоро след това овогенезата, вместо да продължи с диплотен и диакинеза, както това става при сперматогенезата, навлиза в първи мейотичен арест – период на продължителен покой, наречен *dictyate*. Овоцитът е в т. нар. *GV* стадий и се отличава с наличието на ядро, традиционно наричано германинален везикул (*GV*) заради особеностите на хроматиновата си организация (Nikolova et al., 2012). Първият мейотичен арест настъпва около 20-25 седмица от феталния период при човек, но при мишка поради много по-кратката бременност обхваща последната седмица от бременността и дори първите дни след раждането. Потискането на *MPF* по време на мейотичния арест в профаза I е свързано с висока концентрация на цАМФ (цикличен аденозин монофосфат) в овоплазмата (Torkashvand et al., 2024)

Арестът в *dictyate* продължава до пубертета. С настъпването му, най-често на възраст 12-15 години при човека и около 20 – 25 дни при мишка, кохорти от първични овоцити възобновяват мейозата си при всеки репродуктивен цикъл (Hartshorne et al., 2009; Ismail et al., 2011). Възобновяването се основава на активация на *MPF* (*maturation/M phase promoting factor*), който представлява комплекс на циклин-зависимата киназа *CDK1* с циклин *B1* или *B2*. Под негов контрол настъпва реорганизация на хроматина и разпадане на ядрената обвивка. Периодът е кратък и се нарича разпадане на германинална везикул (*GV breakdown*, *GVBD*). С това профаза I е завършена.

Следват останалите фази на първото мейотично делене. Хроматинът на овоцита се кондензира допълнително и хромозомите се свързват с микротубули, подреждайки се в мейотично делително вретено в метафаза I. То мигрира към периферията на клетката. Не след дълго настъпва анафаза I и след това телофаза I и цитокинеза със силна асиметрия, при която се получават един голям вторичен овоцит и една малка нефункционална клетка с „излишния“ хаплоиден хромозомен набор – първо полярно телце. След цитокинезата в овоплазмата на вторичния овоцит остава хаплоиден брой хромозоми с по две хроматиди (другият хаплоиден набор е в полярното телце). В края на телофаза I няма ядрен стадий и интерфазата се пропуска, така че останалият в овоплазмата хаплоиден хромозомен набор, без да търпи съществена декондензация, се подрежда отново в делително вретено в периферията (George et al., 2006). Овоцитът започва второто си мейотично делене, но то спира в метафаза II, което е вторият мейотичен арест през овогенезата. С настъпването му вторичният овоцит е готов за овулация. Мейозата завършва само в случай на започнало оплождане, като проникналият сперматозоид ще стимулира яйцеклетката да премине през анафаза II и телофаза II и да отдели второ полярно телце. Така се осигурява нормален (неудвоен) хаплоиден хромозомен набор в цитоплазмата на бъдещата зигота, а второто полярно телце отстранява ненужния хаплоиден набор през второто делене на овоцитната мейоза.

Преобразуванията през овоцитното зреене са под контрола на набор от белтъци, регулиращи мейотичния клетъчен цикъл. Този контрол споделя редица основни механизми с контрола на митотичния цикъл – можем да си припомним, че циклин-зависимата киназа, чиято активност отговаря за прехода от *G2* в М-фаза, първоначално е открита в яйца от земноводни и поради способността си да предизвиква зреене при инжектиране в незрели овоцити е наречена *MPF* от *maturation-promoting factor*. Централна роля в регулацията на мейотичния цикъл като при митотичния цикъл имат комплексите на циклин зависимите кинази със съответни циклини и комплексът на убиквитин-лигазата *APC/C* (*anaphase-promoting complex/cyclosome*). Важен е също *MCC* (*mitotic checkpoint complex*), който отговаря за вретеновата контролна точка *SAC* (*spindle assembly checkpoint*) (Kim et al., 2023). Същевременно обаче въпреки сходствата в сигналните пътища

на мейозата и митозата контролът на мейотичния клетъчен цикъл изисква специфични молекули-участници и сложни механизми на взаимодействие на овоцитния цитоскелет с преустройствата на хроматина, които осигуряват редукцията на хромозомния набор. Освен разликите спрямо соматичните клетки деленето на овоцитите се различава и от това на сперматоцитите по наличието на прекъсвания, наречени арести, и на неравномерна цитокинеза.

1.2. Специфики на мейотичните преобразувания при овогенезата

Първото мейотично делене при овогенезата изисква продължителна и специфична профаза за осигуряване на генетично разнообразие в бъдещото поколение: протича хомоложна рекомбинация (кросинговър) между несестрински хроматиди от всяка хомоложна хромозомна двойка. Формирането на синаптонемален комплекс, който осигурява паралелната конюгация на хомолозите, е необходимо условие за правилното му протичане. Протеклият кросинговър, освен като източник на генетични варианти, има и ключова роля за поддържането на бивалентите, тъй като в местата на хомоложна ДНК рекомбинация двата хомолога остават свързани физически чрез хиазми при подредбата си в мейотичната метафаза I и до настъпването на анафаза I. Това е необходимо условие, за да се получат овоцити от II-ри ред без анеуплоидии след първото мейотично делене (Zickler, 2020).

За подредбата на бивалентите по екватора на мейотичното вретено при мейоза I е необходима необичайна кохезия на сестринските хроматиди и организация на кинетохорите. За да се изтегли цял хомолог към полюса през мейотичната анафаза I (а не отделна хроматида, както е при митотичната анафаза), е нужно кинетохорите на двете хроматиди на хомолога да са еднакво ориентирани, за да се свържат с микротубули от един и същи полюс на вретеното. Мейотичен кохезин *Rec8* замества обичайния компонент на кохезиновия комплекс *RAD21*, като така се осигурява нужната моно-ориентация на кинетохора на всеки хомолог. В центромерния район на хромозомите се разполагат белтъци, наречени шугошини – *SGO1* (*shugoshin-1*) и мейотичният *SGO2* (*shugoshin-2*). Те

упражняват протективно действие върху кохезините, предпазвайки ги от протеазната активност на активираната сепараза, и така предотвратяват преждевременното разделяне на хроматидите (Y. Liu et al., 2024; Q. Sun et al., 2023).

Анафаза I започва с разграждане на кохезините по дължината на хромозомните рамена и хиазмите, като центромерните региони са предпазени от шугошините. След разпадането на хиазмите мейотичното вретено разделя хомолозите. Така се осъществява случайната сегрегация на хромозомите и се обособяват два хаплоидни набора (по един за вторичния овоцит и прилежащото му първо полярно телце) с все още удвоено количество ДНК, но с различно съотношение и комбинации между майчините и бащините хромозоми. След кросинговъра това е второто важно събитие, което допринася за генетичното разнообразие в поколението. При второто мейотично делене хромозомните кинетохори са вече би-ориентирани, т.е. свързани с микротубули от срещуположните полюси на вретеното. През анафаза II се разделят сестринските хроматиди, за да оставят нормален (нереплициран) хаплоиден набор в яйцеклетката и да отстранят излишния набор в състава на второто полярно телце. Важна задача на мейотичното зреене на овоцита е да запази максимално обема на цитоплазмата, за да обезпечи бъдещата зигота с необходимите овоплазмени фактори и транскрипти. Това се постига чрез асиметрично разпределение на цитоплазмата между овоцита и неговите полярни телца при цитокинезата на двете мейотични деления. Събитията след овоцитния арест в метафаза II обаче са зависими от това дали ще настъпи опложданe на овулираната яйцеклетка.

Основната роля на двуполюсното делително вретено е правилното разпределение на генетичния материал в двете дъщерни клетки. При сперматоцитите то се образува с помощта на две центрозоми с центриоли, както е при митоза. За овоцита образуването на мейотично делително вретено представалява по-голямо предизвикателство. Още през първата мейотична профаза, към момента на ареста в *dictyate*, центриолите на овоцита се разпадат (Hadzhinesheva et al., 2018). Липсата им налага да се използва друг подход за

образуването на вретено – чрез множество ацентриолни микротубулни организатори и набор от белтъци, асоциирани с микротубулните организатори или със самите микротубули, в тясно взаимодействие с хроматина след разпадането на герминалния везикул (Simerly et al., 2018).

2. Преобразувания на овоцитния цитоскелет и хроматина по време на мейотичното зреене

2.1. Моделната система при мишка – основа за изучаване на овогенезата на бозайниците

Репродуктивната биология дължи развитието си главно на изследвания при мишки – от първите си крачки в асистираната репродукция на бозайниците и през периода на бурното си развитие през втората половина на 20-ти век (Biggers, 2012; Fowler & Edwards, 1957) до съвременни модели на дефицити и патология, свързани с етиологията и генетиката на репродуктивни проблеми при човека (Danfeng et al., 2023; Fei & Zhou, 2022; Ishikawa-Yamauchi et al., 2024). Изследванията в моделна система имат решаващо предимство при изучаване на овогенезата, оплождането и ембриогенезата, тъй като тези събития при плацентните бозайници протичат в тялото на женската. Разработена е и стандартизирана методология за овариална стимулация при мишка, за да се гарантира добив на овулирани яйцеклетки за целите на репродуктивни изследвания. Работата с моделна миша система предоставя голяма група синхронно овулирани овоцити, което е подходящо както за изучаване на параметри на получените яйцеклетки с оглед на техния потенциал за бъдещо развитие, така и за добив на паралелно развиващи се ембриони за различни изследвания (Biggers, 2012; Fowler & Edwards, 1957).

Сравнителни изследвания на овогенезата в миши и приматен модел неизбежно отчитат разлики в динамиката на цитоскелетните и хроматиновите промени в хода на мейозата (Ishikawa-Yamauchi et al., 2024), но все повече се

очертава тенденцията да се разработват миши модели на заболявания при човека, за да се изучават техни параметри и да се търсят подходи в решаването на клиничния проблем при човека. Благоприятно стечение на обстоятелства е относително близкото еволюционно родство между гризачи и примати (Живкова, 2021). Настоящото изследване се основава на миши модел на остеоартрит, в който да се осветли ефектът върху овогенезата на локални и системни механизми на възпалителния процес, съпътстващ това заболяване. Изследването би имало потенциално значение за пациентки с остеоартрит в репродуктивна възраст.

2.2. Образуване на мейотично делително вретено

Микротубулните нишки, които формират митотичното делително вретено, започват изграждането си от центрозомите. В животинската клетка центрозомата е главният микротубулен организатор (*microtubule-organizing center*, *MTOC*). Тя съдържа двойка центриоли, заобиколени от перицентриолен материал (*PCM*), който включва гама-тубулиновия пръстенен комплекс *γ-TuRC* (*γ-tubulin ring complex*), отговорен за образуването (нуклеацията) на нови микротубули. Откъм *PCM* се намира бавнорастящият край на микротубулите (минус край), а бързорастящият е насочен към хромозомите. В началото на митозата има две центрозоми, които се разполагат от двете страни на ядрото и така се залага образуването на двуполюсното митотично вретено. При зреенето на мъжките гамети центрозомите и техните центриоли се запазват в клетките, но при овогенезата на повечето многоклетъчни животни центриолите се разграждат преди образуването на мейотичното вретено (Gruss, 2018; Simerly et al., 2018). Липсата на канонични центрозоми с центриоли спомага за асиметричното разделяне на цитоплазмата, като намалява разстоянието между единия полюс на мейотичното вретено и кортекса. Астралните микротубули, които закотвят полюсите на вретеното към кортекса при митотичните клетки, не се образуват по време на мейотичното зреене на овоцитите заради липсата на центрозоми. Същевременно обаче тази липса изисква различен подход за сглобяване на делителното вретено при овоцитната мейоза.

2.2.1. Нуклеация на микротубули без центрозоми

Един от добре изучените механизми за алтернативен път на нуклеация на микротубулите е чрез *Ran*-ГТФ. *Ran* (съкратено от *Ras-related nuclear protein*) е малка ГТФаза, която участва в ядрено-цитоплазмения транспорт на макромолекули и регулацията на различни биохимични процеси, свързани с ядрото (Clarke and Zhang, 2008). Ran съществува в две форми – активна и неактивна в зависимост от това дали е свързан с ГТФ или ГДФ. Съответно белтъкът се активира при замяна на свързания ГДФ с ГТФ. Тази замяна се извършва от комплекса *RCC1* (*regulator of chromosome condensation 1*), който е свързан с хроматина (Jing & Kwok, 2022). Като натоварва *Ran* с ГТФ, *RCC1* създава около хромозомите концентрационен градиент на *Ran*-ГТФ (т.е. активната форма), който активира локално група фактори на сглобяване на вретеното. Сред последните най-важен е *Tpx2*, който в комплекс с протеин киназата *Aurora A* активира микротубулния нуклеационен комплекс *γ-TuRC* и улеснява организирането му във вретенови полюси (Alfaro-Aco et al., 2017).

Ролята на *Ran*-ГТФ градиента около хроматина за формирането на микротубули е известна както при човешки, така и при миши овоцити (Dumont et al., 2007; Holubcová et al., 2015). Има данни, че в миши овоцити липсата на *Ran*-ГТФ градиент не инхибира изцяло образуването на вретено при доминантно негативни или постоянно експресиращи активен *Ran* мутанти (Dumont et al., 2007), докато в човешки овоцити експресията на доминантно негативен мутантен *Ran* белтък (*T24N*, „заключен“ в неактивната си форма *Ran*-ГДФ) води до липса на вретено (Holubcová et al., 2015). Сравнителните изследвания при мишка и човек предполагат висока еволюционна консервативност и очертават ключовото значение на *Ran* за всички етапи от формирането и функцията на мейотичното вретено при бозайниците, въпреки възможни адаптивни разлики при различните видове (Drutovic et al., 2020). Това включва и образуването на специфичните за мишите овоцити множество ацентриолни *MTOC*.

Друг белтъчен комплекс, важен за индуцираната от хроматина организация на мейотичното вретено, е *CPC* (*chromosomal passenger complex*). Той включва белтъците *INCENP* (*inner centromere protein*), *Borealin*, *Survivin* и протеин киназата *Aurora B*. Комплексът образува градиент от активна *Aurora B* близо до хроматина. Тя фосфорилира и инактивира редица фактори, които дестабилизират микротубулите, например *MCAK* (*mitotic centromere-associated kinesin*) (Carmena et al., 2012). Така *CPC* участва в изграждането и динамиката на вретеното. Загубата на *INCENP* води до неподреждане на хромозомите и последващи грешки при разделянето им (Sharif et al., 2010). От друга страна, липсата на функция на *MCAK* води до арест в метафаза I, проблеми с образуването на двуполюсно вретено и подреждането на хромозомите (Vogt et al., 2010).

Трети представител на семейството на Aurora киназите, важен за изграждането на мейотичното вретено, е *Aurora C*. За разлика от *Aurora A* и *B*, които участват и в митозата на соматичните клетки, *Aurora C* се експресира изключително в гаметоцитите . Негативното повлияване върху нейните функции разстройва регулацията на мейотичното вретено и води до арест в метафаза I (Balboula & Schindler, 2014). Протеин киназата *Aurora C* се регулира от друга киназа, наречена *Haspin*, като пътят спомага за групирането и стабилизирането на ацентриолни *MTOC* в миши овоцити (Balboula et al., 2016). Има данни за анеуплоидия при човек, свързана с полиморфизми в гените на *Aurora B* и *Aurora C* (Nguyen et al., 2017).

2.2.2. Ацентриолни MTOC при формирането на вретено в миши овоцити

Каноничните центрозоми в митотичните клетки съдържат двойка центриоли, заобиколени от перицентриолните белтъци перицентрин (*PCNT*), *NEDD1* (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1*), *CEP120* (*centrosomal protein of 120 kDa*), *CEP152* (*centrosomal protein of 125 kDa*), *CEP192* (*centrosomal protein of 192 kDa*) и *CDK5RAP2* (*CDK5 regulatory subunit-associated protein 2*) (Conduit et al., 2015). Тези компоненти на *PCM* са от ключово значение

за свързването на микротубулния нуклеационен комплекс *γ-TuRC* (Kollman et al., 2011).

Специфичните за мишите овоцити ацентриолни *MTOC* (*aMTOC*) са открити за пръв през 70-те години на XX-ти век. Много от съдържащите се в тях белтъци са сходни с тези на митотичните центрозоми, например *γ*-тубулин, *CEP192* и *CEP152*. Динамиката на тези компоненти обаче в някои отношения се различава от известната за центрозомите на соматичните клетки, което вероятно отразява спецификата на овоцитното мейотично вретено (Lee et al., 2018).

По време на зреенето на мишите овоцити ацентриолните MTOC претърпяват пространствена реорганизация. На стадий *GV* те се разполагат в клъстери около герминалния везикул. След *GVBD* те се фрагментират до по-малки центрове, от които прорастват микротубулите. По-късно множеството фрагментирани центрове се групират в двата полюса на вретеното с помощта на микротубулните моторни белтъци кинезин-5A (*KIF5A*) и динеин (Clift & Schuh, 2015; Maro et al., 1985; Schuh & Ellenberg, 2007).

В соматичните клетки *CEP192* е един от главните белтъци на *PCM*, който служи като платформа за свързване с други *PCM*-белтъци като *CEP152*, *CEP63* (centrosomal protein of 63 kDa) и киназите *Plk4* (*polo-like kinase 4*) и *Plk1* (*polo-like kinase 1*), (Joukov et al., 2014; Meng et al., 2015). В миши овоцити перицентрин и CEP192 присъстват в ацентриолните *MTOC* през цялото време на зреенето. Премахването на *CEP192* чрез интерфериращи РНК-и блокира формирането на *aMTOC*, забавя образуването на вретено и води до неподреждане на хромозомите (Lee et al., 2018). Подобни ефекти се наблюдават и при индуцирана липса на перицентрин (Baumann et al., 2017), което доказва ролята на *aMTOC* за правилната сегрегация на хромозомите.

Динамиката на ацентриолните *MTOC* по време на овоцитното зреене се изразява в прилягане на компонентите им към външната ядрена мембрана през *GV*-стадия, фрагментирането им след *GVBD* (Lee et al., 2018) и събирането им в полюсите на вретеното (Clift & Schuh, 2015; Schuh & Ellenberg, 2007). Докато перицентринът и *CEP192* колокализират през цялото време на мейотичното

зреене в ацентриолния *MTOC*, *CEP152* присъства само през *GV*-стадия. Той не се открива след *GVBD*, което има връзка с фрагментирането на ацентриолния *MTOC*; потискането на експресията на *CEP152* води до преждевременно фрагментиране на ацентриолните *MTOC* (Lee et al., 2018). Инхибирането на *CDK1* води до задържане на *CEP152* в микротубулните организатори след *GVBD*-стадия, което показва ролята ѝ в регулацията на тези процеси. В соматичните клетки натрупването на *CEP152* зависи от *Plk4*, но в миши овоцити не е установена такава връзка. Това показва разлика между *PCM* в ацентриолния *MTOC* и центрозомите, където *Plk4* е важна и за дупликацията на центриолите.

Белтъкът *CIP2A* е компонент на ацентриолния *MTOC*, който по време на мейотичното зреене има функцията да свърже *Plk1* и *Aurora A* киназата. Противоположно на *CEP152*, по време на *GV*-стадия *CIP2A* се свързва с хромозомите и не присъства в ацентриолния *MTOC*, а се появява там едва след разпадането на герминалния везикул. Липсата на *CIP2A* води до изчезването на ацентриолния *MTOC*, което показва важната му роля за структурата и поддържането на микротубулните организатори в мишите овоцити. Има хипотеза, че *CIP2A* заменя *CEP152* в комплекса с *CEP192* при динамиката на ацентриолния *MTOC* в прехода от *GV* към *GVBD*. Премахването на *CIP2A* на етап *GV* нарушава сглобяването на *MTOC* и формирането на биполярно мейотично вретено и причинява арест в метафаза I (Wang et al., 2017). Съвременни изследвания показват, че *CIP2A* изпълнява и друга функция през мейотичното зреене на овоцитите: участва в репарацията на получените при кросинговъра двойноверижни скъсвания в ДНК чрез ос на регулация *BRCA1–Plk1–CIP2A*. Установено е, че при потиснат кросинговър *CIP2A* не се свързва с хромозомите, а експерименталното премахване на *CIP2A* води до фрагментация на хромозомите в резултат на нерепарирани двойноверижни скъсвания (Lee & Oh, 2025).

Протеин киназата *Plk1* има ключова роля в клетъчния цикъл и организацията на вретеното в овоцити след възобновяване на мейозата (*GVBD*), прехода към анафаза I и регулацията на ацентриолния *MTOC* (Clift & Schuh, 2015; Lee et al., 2018; Maro et al., 1985). Инхибирането на *Plk1* в миши овоцити спира

фрагментацията на ацентриолния *MTOC* след *GVBD* (Clift & Schuh, 2015) и вероятно води до недостатъчното им количество (Lee et al., 2018; Solc et al., 2015). В митотични клетки *Plk1* фосфорилира *CEP192*, който присъства и в ацентриолния *MTOC* (Meng et al., 2015). Взаимодействието между *Plk1*, *Aurora A* киназата и *CEP192* помага за натрупването на *γ-TuRC* в *aMTOC*.

В допълнение към значението на киназите за регулацията на ацентриолните микротубулни организационни центрове трябва да се добави и действието на моторните белтъци. Динеинът, който осъществява движение към „минус"-края на микротубулите, участва във фрагментирането на ацентриолния *MTOC* след *GVBD* (Clift & Schuh, 2015). Кинезин-*5A* участва в реорганизацията на ацентриолния *MTOC* и образуването на два полюса на вретеното; съответно инхибирането му блокира тези процеси (Schuh & Ellenberg, 2007).

2.3. Динамика на актиновия цитоскелет по време на мейотичното зреене на овоцити при бозайници

За да извърши асиметричните мейотични деления, овоцитът има нужда от високо специализиран цитоскелет. Към гореописаната специфика на тубулиновия цитоскелет (липсата на класически центрозоми и астрални микротубули на вретеното) трябва да се добави и особената организация на актиновия цитоскелет. Ролята на актина в овоцитите е свързана с множество процеси: образуване на микровили, везикулен транспорт към клетъчната мембрана, центриране на герминалния везикул (*GV*, т.е. ядрото) преди разпадането на ядрената обвивка (*GVBD*), миграция на мейотичното вретено по време на мейоза I, закотвяне на вретеното към овоцитния кортекс по време на ареста през метафаза II, подпомагане на микротубулите при подреждането и разделянето на хромозомите и извършване на цитокинезата за отделяне на полярните телца.

2.3.1. Актин-зависим транспорт на везикули

Овоцитите имат сравнително плътен актинов кортекс, който стои под оолемата и стабилизира повърхността на овоцита. Също така в овоплазмата се наблюдава динамична мрежа от актинови филаменти (Azoury et al., 2008; Schuh & Ellenberg, 2008).

Актиновата мрежа в цитоплазмата на овоцита се образува чрез нуклеация от взаимодействието на формин-2 със *Spire1* и *Spire2* (*Spire1/2*). Актин-свързващият белтък формин-2 е част от семейството на *Rho*-ГТФаза-независимите формини и сглобява прави актинови филаменти. Формин-2 има нужда от *Spire1/2* за ефективната елонгация на микрофиламентите (Montaville et al., 2014); неговата липса води до невъзможност за изграждане на цитоплазмената актинова мрежа (Azoury et al., 2008; Schuh & Ellenberg, 2008).

Комплексите от формин и *Spire1/2* не са случайно разпръснати в овоплазмата, а са съсредоточени в близост до периферията на овоцита върху везикули, покрити с *Rab11a* – регулатор на везикулния транспорт. Самите везикули служат като места за нуклеация на актина, като събират овоплазмени нуклеационни фактори и организират върху себе нуклеационните комплекси. Загубата на функция на *Rab11a* води до увеличен брой свободни нуклеационни комплекси в цитоплазмата и съответно уплътняване на актиновия цитоскелет (Holubcová et al., 2013).

Rab11a-везикулите регулират динамиката на актиновата мрежа, като свързват миозин-*Vb*, който движи везикулите по актиновите филаменти. Инхибирането на миозин-Vb спира движението на везикули към периферията на овоцита и актиновата мрежа остава статична. Везикулният транспорт към кортекса се подпомага и от полимеризацията на актинови филаменти върху оолемата (Holubcová et al., 2013; Pfender et al., 2011). Чрез мрежата от актинови филаменти и свързани с тях везикули се създава поток, който транспортира цитоплазмена маса от центъра към кортекса (Schuh, 2011). *Spire*-факторът за нуклеация на актиновите микрофиламенти се свързва с *Rab11a*-позитивната мембрана на везикулите, а към тях се присъединява и моторен протеин от

семейството на миозините. Така се образува комплекс миозин-*Vb/Spire/Rab11a*, с чиято помощ везикулите могат да се транспортират на дълги разстояния до кортекса на овоцита (Yao et al., 2024).

Мрежата от фибриларен актин и везикули позволява везикулен транспорт на големи разстояния, за което нормално в клетката са отговорни микротубулите (Schuh, 2011). Това става възможно благодарение на насочен поток, задвижен от акто-миозиновия цитоскелет в овоплазмата (Lu & Gelfand, 2023). Кортикалните гранули също се възползват от така създадения поток: след като бъдат образувани в централната част на овоцита, те взаимодействат с *Rab11a*-везикулите и мигрират по актиновата мрежа към клетъчния кортекс, за да се разположат под оолемата на зрялата овулирана яйцеклетка и да бъдат готови за екзоцитоза в случай на оплождане (Cheeseman et al., 2016).

2.3.2. Роля на актина в създаване на овоплазмена асиметрия при мейоза

При различните видове бозайници позицията на герминалния везикул, т.е. ядрото на първичния овоцит в *dictyate*, варира: при някои (мишки, плъхове, кучета, домашни котки и полярни лисици) ядрото е предимно централно разположено, докато при други (човек, говедо, прасе) то по-често се разполага периферно. И в двата случая обаче, при *GVBD* и възобновяването на мейозата ядрото трябва да е вече позиционирано в центъра на клетката, като това е свързано с успеха на овоцитното зреене. При мишите овоцити това позициониране се осигурява от механичен градиент, медииран от *F*-актин и зависим от актин-свързващ белтък формин-2. При определена мутация на актина ядрото на яйцеклетката не се придвижва към центъра, а след микроинжектиране на нормален актин в овоплазмата централното позициониране се възстановява (Al Jord et al., 2022; Almonacid et al., 2019). Има данни, че гореспоменатият цитоплазмен поток, основан на взаимодействието на микрофиламентите с *Rab11a*-везикули, подпомага позиционирането ядрото в центъра. Концентрацията на везикулите при овоцити в профаза I е по-висока в периферията и намалява към центъра, което прави цитоплазмата в централната област по-флуидна и избутва

ядрото към нея. Инхибирането на актин-свързания моторен белтък миозин-*Vb* блокира центрирането на ядрото (Almonacid et al., 2015).

Възниква въпросът каква функция изпълнява центрирането на овоцитното ядро в края на профаза I, още повече че през метафаза I предстои изтегляне на хромозомите към периферията. Неотдавнашни изследвания установяват напълно променена транскрипционна динамика в овоцити-нокаути по формин 2 (които освен това се отличават с липса на *F*-актин и нецентрирано ядро). Това показва, че от централното позициониране на ядрото зависят количеството и сплайсингът на майчини транскрипти в яйцеклетките. Освен това разполагането на ядрото в центъра предотвратява преждевременното взаимодействие на мейотичното вретено с регулаторния белтък *Cdc42*, разположен в кортекса и способен да наруши свързването на кинетохорите с микротубулите (Kincade et al., 2023).

Поради срединното разположение на ядрото по време на *GVBD* мейотичното вретено се формира в центъра на клетката. След това през метафаза I мигрира към оолемата, където ще се извърши разделянето на хромозомите.

При митоза позиционирането на вретеното зависи основно от астралните микротубули, които растат от центрозомите в полюсите и се свързват с кортекса, където се придърпват от моторния белтък динеин (Kotak & Gönczy, 2013; McNally, 2013). Астралните микротубули могат и да отдалечават вретенето от кортекса, като се удължават. Както обаче се спомена по-горе, овоцитите на повечето животни разграждат центриолите си в ранните етапи на овогенезата, което води до липса на канонични центрозоми при образуването на полюсите на вретеното и съответно на астрални микротубули (Schuh & Ellenberg, 2007). При мишки е установено, че миграцията на мейотичното вретено зависи от фибриларния актин. Нарушенията в динамиката на актиновия цитоскелет чрез актинови отрови (цитохалазин *D*) или блокиране на актинови нуклеационни фактори (формин-2, *Spire1/2*) спират процеса, докато деполимеризацията на микротубулите с нокодазол не оказва влияние (Azoury et al., 2008; Pfender et al., 2011; Schuh & Ellenberg, 2008).

Съществуват няколко механизма, чрез които актиновият цитоскелет премества мейотичното вретено към кортекса. Известно е, че миозин-2 се акумулира и активира в полюсите на вретеното и го транспортира по актиновата мрежа към периферията (Holubcová et al., 2013; Schuh & Ellenberg, 2008). Инхибирането на Ca^{2+}*/CaM*-зависимата протеин киназа MYLCK, която активира миозина, води до силно забавяне на събитието. В процеса участва и динамиката на самата мрежа, която е отговорна за трафика на везикулите към кортекса; при блокирането на миозин-*Vb*-зависимото ѝ движение миграцията на вретеното се проваля (Holubcová et al., 2013). Смята се, че свързаният с полюса миозин-2 се захваща за периферните актинови филаменти около вретеното и след това по тях се прехвърля към мрежата от актин и *Rab11a*-везикули. Възможно е релокацията да се подпомага и от флуидизирането на цитоплазмата пред вретеното от движещите се *Rab11a*-везикули към кортекса.

Описаният модел на миграция на мейотичното вретено се основава на изтегляне или придърпване към овоцитния кортекс, съгласувано с динамиката на актина. Съществуват обаче и данни за наличие на бутащи сили, които подпомагат миграцията на вретеното към кортекса (Li et al., 2008; Yi et al., 2013). В този случай нуклеацията и елонгацията на *F*-актин се стимулира отново от формин-2, но акумулирането му се извършва зад изоставащия (по-отдалечен от оолемата) полюс на мейотичното вретено, като го избутва периферно. Също така, след като започне придвижването на вретеното, в преместването му се включва и механизъм, медииран от актиновия нуклеационен комплекс *Arp2/3*. Той се акумулира в кортекса, към който се приближават хромозомите (S. C. Sun et al., 2011; Yi et al., 2013), а по-късно отговаря и за придържането на вретеното по време на ареста в метафаза II.

2.3.3. Хромозомите индуцират поляризиране на кортекса

Спрените в профаза I овоцити имат слой от равномерно разпределен кортикален актин, а цялата повърхност на клетъчната им мембрана е покрита с микровили. По време на миграцията на вретеното кортексът се поляризира.

Кортикалният актинов слой, разположен срещу приближаващото се вретено, се разширява и частично го обгръща, образувайки т. нар актинова шапка. Тя има значение и за закотвянето му през метафаза II. Микровилите в областта на актиновата шапка изчезват и мембраната се изглажда, за да се предотврати навлизането на сперматозоида в близост до хромозомите на овоцита и евентуалното взаимодействие на бащините хромозоми с мейотичното вретено. В останалите участъци на оолемата микровилите се запазват и впоследствие подпомагат свързването със сперматозоида и сливането на мембраните на двете гамети (Uraji et al., 2018).

Поляризирането на кортекса над мейотичното вретено зависи от наличието на ДНК в близост до него. Малката ГТФ-аза *Ran* в активната си форма *Ran*-ГТФ, освен че има ключово значение за организирането на вретеното около мейотичните хромозоми, предизвиква акумулиране и активация на *Arp2/3* в близко разположения кортекс (Yi et al., 2011). Не само хромозомите, а и инжектирани в близост до кортекса частици, покрити с ДНК, са способни да индуцират образуването на актинова шапка, като присъствието на мутантни варианти на *Ran* спира процеса (Deng et al., 2007). От друга страна, деактивацията на *Arp2/3* чрез инхибиране на пътя *Cdc42–N-WASP* води до загуба на шапката над вретеното (Dehapiot et al., 2013; Yi et al., 2011).

2.3.4. Закотвяне на вретеното по време на ареста в Метафаза II

След завършване на първото мейотично делене и отделянето на първото полярно телце микротубулите и хромозомите, които са останали в овоцита, се реорганизират отново в двуполюсно вретено (Peng et al., 2024). Овоцитът достига метафаза II и „застива“ в този стадий до оплождането, като вретеното стои захванато под актиновата шапка.

Позиционирането на вретеното при второто мейотично делене също зависи от актиновия цитоскелет. Освен за формирането и поддържането на актиновата шапка *Arp2/3*-комплексът е ключов и за задържането на вретеното в кортекса.

Arp2/3-зависимата нуклеация на актин създава поток от фибриларен актин, който започва от актиновата шапка и се разпространява радиално, движейки се по периферията на клетката, при което увлича цитозола. В противоположната страна на актиновата шапка се получава завихряне, в резултат на което потокът се извърта и се насочва обратно към вретеното. Смята се, че по този начин актиновият поток заедно с увлечената от него цитоплазмата притиска вретеното към кортекса. При инхибиране на *Arp2/3*-комплекса цитоплазменото движение се обръща по механизъм, който е зависим от моторния белтък миозин-II, и вретеното се премества към центъра на клетката. Регулирането на функциите на *Arp2/3* и миозин-II в актиновата шапка се извършва от *Ran*-ГТФ и контролираните от него ГТФази *Cdc42* и *Rac*, като загубата на функция на която и да е от тях води до откачане на вретеното през второто мейотично делене (Dehapiot et al., 2013; Yi et al., 2011).

Изследвания на хидродинамичните сили в овоплазмата на миши овоцити потвърждават ролята на актиновия поток в стабилизирането на периферната позиция на мейотичното вретено. Чрез основните принципи на динамиката на флуидите е установена зависимост на позиционирането на мейотичното вретено от неговия размера и ъгъла на приплъзването му при заемането на конкретна позиция в овоцитния кортекс, както и при завъртането му за цитокинеза II (Liao & Lauga, 2024).

2.3.5. Роля на микрофиламентите за отделянето на полярното телце и ротацията на вретеното

При животинските клетки актинът заедно с миозин участва в образуването на контрактилен (съкратителен) пръстен по време на цитокинеза. Той се изгражда след сегрегацията на двата хромозомни набора, прищъпва мембраната между двете дъщерни клетки и образува делителна бразда както при Митоза, така и при Мейоза. Контрактилният пръстен се изгражда в кортекса на екватора; разположението му се определя с участието на *Ran*-ГТФ и е съобразено с това на хромозомите (Beaudet et al., 2020).

Отделянето на полярното телце при първото мейотично делене се извършва след достигането на вретеното до кортекса и протичането на анафаза I, докато при Мейоза II процесът се активира след оплождането. Събитието се опосредства от акумулиране на актин и миозин-II в шапката. Първоначално те колокализират, а по-късно миозинът образува пръстен, заграждащ шапката (Wang et al., 2011). Формирането на контрактилния пръстен зависи от *Ran*, като за второто (макар и не за първото) мейотично делене са важни и *Cdc42* и *Mos* (Dehapiot et al., 2013).

В края на Мейоза I мембраната „пъпкува“ навън заедно с актиновата шапка и попадналия под тях хаплоиден хромозомен набор. Процесът е зависим от миозин-II и се подпомага от актиновите нуклеационни фактори *Arp2/3* (Sun et al., 2011), *Spire1/2* и формин-2 (Pfender et al., 2011). При цитокинезата след Мейоза II се образува делителна бразда в мембраната над средата (екватора) на анафазното вретено, като то се завърта. Ротацията изисква актин и миозин-II (Wang et al., 2011). След това мембраната се вдлъбва и от другата страна и обхваща половината от вретеното заедно с „излишния“ генетичен материал, отделяйки го във второ полярно телце чрез съкращение на актомиозиновия пръстен. Въпреки че хромозомите индуцират поляризирането на кортекса, за цитокинезата е важно и микротубулното вретено. Изграждането на актомиозиновия пръстен чрез полимеризация на актин върху формин, както и индуцирането на съкращението му се регулира от малката ГТФаза *RhoA*. Тя на свой ред се регулира от белтъка *Ect2*, който я активира, като заменя свързания с нея ГДФ с ГТФ (Liu, 2012).

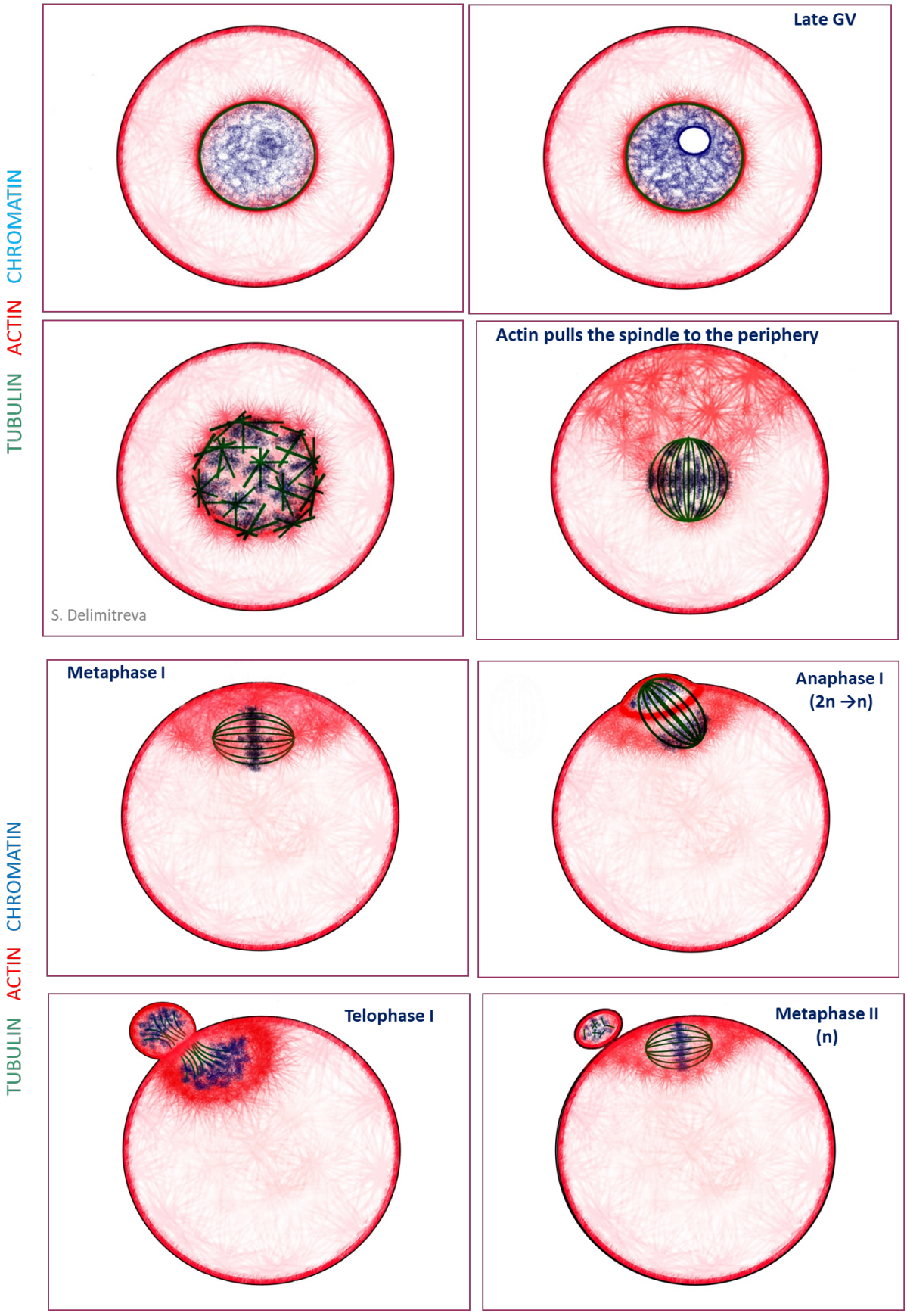
2.3.6. Участие на актиновите микрофиламенти в сегрегацията на хромозомите и поддържането им във вретеното

Макар че микротубулите безспорно са основният компонент на мейотичното вретено, с него се асоциират и микрофиламенти (Azoury et al., 2008; Mogessie & Schuh, 2017; Schuh & Ellenberg, 2008). Има данни, че F-актинът предпазва мишите овоцити от грешки при разделянето на хромозомите и анеуплоидии (Mogessie & Schuh, 2017). Инхибирането на полимеризацията на актина с цитохалазин *D* или с нокаут на гена за формин-2 ($Fmn^{-/-}$) води до неподредени хромозоми през метафаза

II и изоставащи хромозоми през анафаза I и II. Освен това добавянето на цитохалазин *D* в зрели овоцити с нормално вретено също нарушава подреждането на метафазната пластинка, което показва роля на актина в поддържането ѝ. Грешки в подреждането се получават и при увеличено количество F-актин във вретеното, т.е. правилното разделяне на хромозомите изисква прецизна регулация на актиновата мрежа (Mogessie & Schuh, 2017).

Макар да не участва пряко в мейотичното поведение на хромозомите, F-актинът помага за свързването им с вретеното, което е предпоставка за успешната им сегрегация. През *GVBD* в разпадащото се ядро се образува мрежа от актинови нишки, която държи хромозомите събрани, за да не се разпръснат по време на продължителното изграждане на вретеното (Harasimov et al., 2023). Освен това актинът улеснява формирането на кинетохорните микротубули. Присъствието на актин в мейотичното вретено спомага за по-здраво свързване на хромозомните кинетохори с микротубулите, а извличането му от вретеното забавя настъпването на анафазата (Mogessie & Schuh, 2017; Nikalayevich & Terret, 2023).

Можем да обобщим, че преобразуванията на цитоскелета и хроматина включват образуване на мейотично вретено през *GVBD*, подреждане на бивалентите на екватора му и миграция на вретеното през метафаза I, закотвянето му под оолемата с образуване на актинова шапка, сегрегация на хромозомите през анафаза I, отделяне на първо полярно телце след телофаза I, реконструиране на вретеното за второто мейотично делене и достигане на метафаза II. Тези процеси са показани на схемата (по-долу), която илюстрира взаимодействието на хроматина и цитоскелетните елементи през мейотичното зреене на овоцитите (Делимитрева, 2010):


CHROMATIN
ACTIN
TUBULIN
Late GV
Actin pulls the spindle to the periphery
S. Delimitreva
CHROMATIN
ACTIN
TUBULIN
Metaphase I
Anaphase I
(2n →n)
Telophase I
Metaphase II
(n)

3. Фоликулогенеза и хормонални влияния върху нейния ход

Репродуктивният цикъл в женските бозайници се контролира от циклични промени на физиологични фактори от оста хипоталамус – хипофиза – яйчници. Биологичният смисъл на тези взаимодействия е получаването на зрели овоцити, извършване на оплождането и подготвяне на матката за имплантиране на ембриона. Репродуктивният цикъл се прекъсва по време на бременност и кърмене, а освен това при много видове има сезонен характер. При човек женският репродуктивен цикъл е менструален, а при мишка – естрален. Въпреки особеностите на естралния и менструалния цикъл при различните видове бозайници физиологичните механизми за тяхната регулация остават сходни. Човешкият менструален цикъл се дели на три основни периода, свързани с функционални и морфологични промени в яйчниците и матката: менструален период (мензис), фоликулна фаза (пролиферативен период) и лутеална фаза (секреторен период). По време на фоликулната фаза епителните клетки в ендометриума на матката се делят усилено и затова този период се нарича пролиферативен, а по време на лутеалната фаза те се превръщат в крайно диференцирани секретиращи клетки, което характеризира секреторния период.

Чрез ритмичност, прецизен синхрон и обратна връзка по оста хипоталамус – хипофиза – яйчник се упражнява контрол над етапите на фоликулогенезата и мейотичните събития на овогенезата.

Гонадотропните хормони ФСХ (фоликуло-стимулиращ хормон) и ЛХ (лутеинизиращ хормон), секретирани от хипофизата, контролират развитието на фоликулите, яйчниковата стероидогенеза и овулацията. Нивата на ЛХ и ФСХ са относително ниски и постоянни по време на лутеалната фаза, но при настъпване на лутеална регресия се наблюдава малък пик на ФСХ. Тази концентрация на хормоните е важна за фоликулното зреене. При навлизане в фоликулната фаза активираните фоликули започват да нарастват бързо, като заедно с това се повишава синтезът на естрадиол и неговите нива в кръвта. Пикът на естрадиола е съпроводен с рязко покачване на секрецията на ЛХ и предизвикване на овулация. При ФСХ също се наблюдава покачване в периовулаторния период. Овулиралият

фоликул формира жълто тяло и започва да синтезира прогестерон, който подпомага подготовката на ендометриума за имплантация на ембриона.

Рязкото покачване на прогестерона и високата му концентрация са пряко свързани с функцията на жълтото тяло. При липса на оплождане настъпва трайно понижаване на ЛХ, регресия на жълтото тяло и съответно спад в секрецията на прогестерон. Ниското ниво на прогестерон отключва експресията на окситоцинови рецептори в ендометриума. Активацията на тези рецептори чрез пулсова секреция на окситоцин от неврохипофизата стимулира синтеза и освобождаването на простагландин $F2\alpha$ от епителните клетки на ендометриума. Една от функциите му е да стимулира дегенерацията на жълтото тяло (лутеолиза) и съответно действа като лутеолитичен фактор (Galvão et al., 2018). При наличие на бременност се секретират анти-лутеолитични фактори, които потискат експресията на окситоцинови рецептори в маточния епител и съответно се потиска и секрецията на простагландин $F2\alpha$. При човек ранната бременност се поддържа от хорионния гонадотропин (ХГ), който служи като лутеотропен фактор, т.е. поддържа функцията на жълтото тяло, като действа пряко върху клетките му. Хорионният гонадотропин е аналог на ЛХ и се свързва със същите рецептори. Произвежданият от жълтото тяло прогестерон задоволява нуждите на ранната бременност при бозайниците, а с образуването на плацента високото ниво прогестерон поддържа адекватно бременността до раждането и подготвя млечните жлези за лактацията. Краят на бременността се бележи от спад на нивото на прогестерон, който позволява настъпване на раждането (Yomogita et al., 2022).

3.1. Роля на гонадотропините и яйчниковите стероидни хормони

Цикличността на репродуктивния цикъл се дължи на промени в концентрацията на сигнали за комуникация с права и обратна връзка между хипоталамуса, хипофизата и яйчниците. Контрол върху репродуктивния цикъл по тази верига упражняват гонадотропин-освобождаващият хормон ГОХ (*gonadotropin-releasing hormone – GnRH*) в ролята на пулсов генератор, създаващ ритмични стимули, и гонадотропните хормони (гонадотропините) на хипофизата

като преки сигнали към гонадата. Гонадотропините са ФСХ и ЛХ. Те стимулират фоликулогенезата и стероидогенезата в яйчника, чиито продукти са основно естрадиол и прогестерон. Работата на хипоталамуса и хипофизата на свой ред е стриктно контролирана чрез обратна връзка от овариалните хормони, макар ГОХ-генерираната пулсова стимулация да се модулира по нервен път (Ferin, 2008).

Хипоталамусът, като част от междинния мозък, съдържа нервни центрове за поддържане на хомеостазата, поведението и репродукцията. Той извършва ендокринния контрол върху функциите на репродуктивната система. В него се намират групи от специализирани неврони, секретиращи гонадотропин-освобождаващия хормон (ГОХ, *GnRH*) в кръвоносна мрежа, която директно го доставя до предния дял на хипофизата (аденохипофизата). Този неврохормон контролира синтеза и секрецията на гонадотропините от гонадотропни клетки в аденохипофизата, които имат рецептор за него. Те на свой ред синтезират и секретират съответния гонадотропин (ФСХ или ЛХ) в зависимост от пулсовата честота на ГОХ от хипоталамуса. Високият интензитет на пулсовата честота стимулира секрецията на ЛХ, а ниският – ФСХ. От своя страна гонадотропините имат пряко влияние върху процесите в яйчниците.

Овариалният кортекс осъществява хормоналната секреция на яйчника, тъй като там се намират фоликулите, които представляват секреторните функционални единици на яйчника и в които се развиват зрелите овоцити. Медулата е богата на кръвоносни и лимфни съдове. Примордиалните фоликули на кортикалната зона на яйчника се образуват през ембриогенезата. Част от тях претърпяват апоптоза преди достигане на полова зрялост и тези, които остават, съставят овариалния резерв на женския бозайник (Hadzhinesheva et al., 2018).

През определен интервал от време се активира група от примордиални фоликули, които започват своето зреене. Така се стартира фоликулната фаза на репродуктивния цикъл. Всеки активиран фоликул се превръща от примордиален в първичен, като дотогава плоските му гранулозни клетки стават кубични. Те започват усилено да се делят и образуват няколко слоя около овоцита. В същото време върху базалната мембрана на зреещият фоликул се формира съединително-

тъканна обвивка, която се нарича тека. Такъв фоликул с многослойна стена от гранулозни клетки и тека се нарича вторичен и с него завършва преантралният етап от фоликулогенезата (Sánchez & Smitz, 2012; Williams & Erickson, 2000). Теката е изградена от външен и вътрешен тека-слой, в които навлизат множество кръвоносни съдове. През този период от фоликулното зреене нивата на ФСХ и ЛХ са базови (относително ниски), но достатъчни, за да подпомогнат по-нататъшното развитие на фоликулите. Клетките от вътрешния тека-слой имат ендокринна функция и под въздействието на ЛХ от аденохипофизата синтезират и секретират андрогени. Те повишават чувствителността на гранулозните клетки към ФСХ, стимулирайки експресията на техните ФСХ-рецепторни гени. ФСХ е отговорен за пролиферацията и диференциацията на гранулозните клетки (Sen et al., 2014).

Фоликулът продължава да увеличава размера си и в него се образува празнина с течност, наречена антрум, с което той става антрален (третичен). Антрумът нараства и разделя гранулозните клетки на две групи с различна функция. Клетките в периферията на антралния фоликул се диференцират в пристенни гранулозни клетки, а тези, които заобикалят овоцита и пряко контактуват с него – в кумулусни клетки. Чрез ФСХ в пристенните клетки се активира ензимът ароматаза (*CYP19A1*), който метаболизира андрогените, получени от тека-клетките, в естрогени. Някои фоликули успяват по-бързо да напреднат в развитието си до късни антрални фоликули и стават доминантни. Те се характеризират с по-висока активност на ароматазата и по-висока секреция на естрогени, отколкото на андрогени, за разлика от изоставащите фоликули. В крайна сметка изоставащите фоликули търпят атрезия, докато доминантните продължават да нарастват и стават преовулаторни (Граафови) фоликули. ФСХ и естрогените стимулират експресията на рецепторите за ЛХ в пристенните гранулозни клетки на преовулаторните фоликули, което ще ги подготви за адекватна реакция при индуцирането на овулация чрез пик на ЛХ от аденохипофизата (Couse et al., 2005; Hunzicker-Dunn & Mayo, 2015).

Основният естроген е естрадиолът, който е ключов яйчников фактор за регулацията на репродуктивния цикъл. Ефектът му върху секрецията на ЛХ и

ФСХ, като сигнал за обратна връзка от яйчниците, зависи от неговата концентрация и продължителност на действие. Естрадиолът влияе индиректно върху ГОХ-секретиращите неврони чрез верига от неврони в хипоталамуса с невроендокринна функция, които образуват т. нар. пулсов генератор на ГОХ (Harter et al., 2018). Естрадиолът упражнява регулация с отрицателна обратна връзка, изразяваща се в понижаване на интензитета на пулсовата секреция на ГОХ, което води до потискане на синтеза и секрецията на ЛХ. В началото на фоликулната фаза има постепенно повишаване на ФСХ, докато нивото на ЛХ остава ниско и относително постоянно. С напредване на зреенето яйчниковите фоликули започват да произвеждат голямо количество естрадиол и това води до покачване на неговата концентрация. При достигане на определен праг естрадиолът започва да потиска секрецията на ФСХ от аденохипофизата и същевременно стимулира повишаването на ЛХ (Yen, 1977). Високата концентрация на естрадиол има положителен ефект върху секрецията на ЛХ – повишава интензитета на пулсова стимулация от хипоталамуса с ГОХ и многократно увеличава чувствителността на хипофизата към него. Заедно с рязкото покачване на концентрацията на ЛХ се наблюдава и малък пик на ФСХ.

Преовулационният пик на ЛХ стимулира овулацията и последващото образуване на жълто тяло, което съответно води до навлизане в лутеалната фаза на репродуктивния цикъл. Жълтото тяло се формира от пристенните гранулозни клетки и клетките на вътрешния тека-слой на овулиралия фоликул. Те се превръщат в лутеални клетки, които превключват към друг път на стероидогенеза. Под действието на ЛХ жълтото тяло започва да произвежда значително количество прогестерон, както и естрадиол. Продължителният сигнал чрез прогестерон и естрадиол от яйчниците към мозъка има потискащ ефект върху ГОХ-секретиращите неврони и по този начин се инхибира секрецията на гонадотропини по време на лутеалната фаза (Nippoldtt et al., 1989). ЛХ е лутеотропен фактор, който поддържа функцията на лутеалните клетки и съответно намаляването на концентрацията му води до тяхното отмиране. При дегенерацията на жълтото тяло нивата на прогестерона и естрадиола падат рязко

и това позволява постепенно повишаване на базовата секреция на ФСХ и ЛХ от аденохипофизата. Така се подготвя новият цикъл на фоликулно зреене.

При примати навлизането в менструален период се дължи на рязкото понижаване на нивата на прогестерон и естрадиол поради дегенерацията на жълтото тяло. Първият ден на менструацията се приема за начало на менструалния цикъл. Събитията през менструацията, свързани с промени в ендометриума на матката, се дължат до голяма степен на възпалителни процеси. Резкият пад на прогестерона предизвиква усилена инфилтрация и активация на различни популации от имунни клетки в ендометриума. Те секретират протеази и възпалителни фактори. Комбинираният ефект на различни възпалителни медиатори, голямо количество металопротеази, които разграждат извънклетъчния матрикс, и други фактори водят до дестабилизиране на еднометриалната тъкан и кръвотечение. Недостигът на естроген и прогестерон отключва секрецията на простагландин $F2\alpha$, който предизвиква съкращения на гладката мускулатура на матката и така подпомага излющването на ендометриума (Sugino et al., 2004).

Ниските нива на прогестерон и естроген след дегенерацията на жълтото тяло и излющването на ендометриума водят до бавно покачване на ФСХ и ЛХ, което активира нов размножителен цикъл с развитие на няколко фоликула. ФСХ индуцира пролиферация на гранулозните клетки и съответно увеличаване на слоевете им във фоликула. През пролиферативната фаза нарастват синтезът и секрецията на естрадиол от ранните антрални фоликули. Повишаващите се нива на естрадиол, от една страна, започват да потискат секрецията на ФСХ, като така се предотвратява „събуждането“ на нови фоликули, а от друга страна, стимулират набъбване на ендометриума, което е един от белезите на пролиферативната фаза. При човека най-добре развиващият се фоликул става доминантен и по-късно единствен може да овулира, а другите търпят атрезия. Пикът на ЛХ в резултат на високия естрадиол предизвиква каскада от събития в доминантния преовулаторен фоликул, които водят до намаляване на цАМФ и активиране на *MPF* в овоплазмата. Така се индуцира мейотичното зреене на овоцита и овулацията.

Прогестеронът по време на лутеалната фаза е важен за крайния етап от подготовката на ендометриума за имплантация на ембрион. Това включва увеличено кръвоснабдяване, децидуализация на ендометриалната тъкан, инфилтрация на имунни клетки и усилена секреция на фактори, които подпомагат евентуалната имплантация на ембрион.

3.2. Роля на нестероидни хормони, секретирани от яйчниците

В регулацията на репродуктивния цикъл по оста хипоталамус – хипофиза – яйчници участват и нестероидни хормони, които се секретират от активираните фоликули. Сред тях най-добре изучени са нестероидните сигнали за обратна връзка от *TGF-β* надсемейството: инхибин, активин, фолистатин и анти-мюлеров хормон (АМХ). Тяхната синтеза и секреция се регулира времево спрямо етапите на зреене на фоликулите и в отговор на гонадотропините от аденохипофизата.

Гранулозните клетки секретират инхибини и активини, които са полипептидни хормони, изградени от две субединици (димери). Инхибините са хетеродимери от *A*- и *B*-субединица, докато активините могат да бъдат хомодимери или хетеродимери от изотиповете на *B*-субединицата. Инхибините потискат секрецията на ФСХ от хипофизата, а активините я стимулират (Namwanje & Brown, 2016). Инхибините са с най-голяма концентрация през междинните периоди на фоликулната фаза и лутеалната фаза.

Фолистатинът е гликопротеин, който се секретира от гранулозните клетки. Той има висок афинитет към активина и като го свързва, потиска активин-индуцираната секреция на ФСХ от хипофизата (Padmanabhan et al., 2002). Малки количества фолистатин се секретират и от клетки в аденохипофизата, което предполага и паракринен контрол.

Анти-мюлеровият хормон се секретира в голямо количество от гранулозните клетки на малките преантрални фоликули и е добър показател за яйчниковия резерв. Има данни, че АМХ възбужда невроните, които секретират ГОХ, и

основно има положителен ефект върху секрецията на ЛХ от аденохипофизата (Silva & Giacobini, 2021).

Всички гореизброени хормони освен описаните им ендокринни функции имат и специфични функции в рамките на яйчника като паракринни / автокринни фактори, регулиращи фоликулогенезата и мейотичното зреене на овоцитите.

3.3. Локални механизми на фоликулогенезата и овогенезата

Развитието на овоцита във фоликула е процес на взаимодействие между овоцита и обкръжаващите го соматични клетки. Един от първите признаци за активиране на фоликулна фаза в примордиалня фоликул е промяната в морфологията на гранулозните клетки – превръщането им от плоски в кубични бележи прехода към първичен фоликул. От своя страна овоцитът преминава във фазата си на растеж и започва да увеличава размерите си (Mora et al., 2012). Установено е, че преходът от примордиален към първичен фоликул е свързан с активиране на експресията на определени регулаторни белтъци: серин/треонин-киназата *mTOR* (*mammalian target of rapamycin*) в овоцита и гранулозните клетки (Z. Guo & Yu, 2019) и паракринния регулатор *Kit*-лиганд в гранулозните клетки (Williams & Erickson, 2000). *Kit*-лигандът е важен фактор за диференцирането на стромални клетки в тека клетки и образуването на тека-слой около първичния фоликул, както и за активирането на фазата на растеж на овоцита.

Овоцитът експресира рецепторната тирозин киназа *Kit*, с която се свързва секретираният от гранулозните клетки *Kit*-лиганд. Тяхното взаимодействие води до включване на регулаторната каскада *PI3K* (фосфатидилинозитол 3-киназа) – *Akt* (протеин киназа *B*) в овоцита. Активната киназа *Akt* фосфорилира намиращия се в ядрото транскрипционен репресор *Foxo3*, който потиска овоцитното развитие. По този начин се инхибира действието на репресора и се стимулира изнасянето му от ядрото към овоплазмата, което позволява на овоцита да възобнови развитието си (Saatcioglu et al., 2016). Активният *mTOR* комплекс също има важно значение за инициирането на фазата на растеж в овоцита и може да

бъде активиран от каскадата *PI3K – Akt*. Неговите ефекти са свързани със специфични транскрипционни и транслационни промени, така че да се осигури нормалното развитие на овоцита в следващите етапи и паракринният контрол от страна на овоцита върху фоликулното зреене (Guo et al., 2018).

Важна роля за ранните етапи на фоликулогенезата имат растежните фактори *GDF9* и *BMP15* от *TGF-β* надсемейството, които се секретират от овоцита. При липса на *GDF9* първичните фоликули не могат да продължат нормалното си развитие поради проблеми с диференцирането на гранулозните клетки и тека клетките. Факторът *BMP15* има важно значение за ФСХ-независимата пролиферация на недиференцираните гранулозни клетки (Cadenas et al., 2023).

В по-късните преантрални стадии се усилва експресията на рецептори за ФСХ и ЛХ във фоликулите, което ги прави по-чувствителни към гонадотропини. Овоцитните паракринни фактори *GDF9* и *BMP15* в комбинация с ФСХ стимулират пролиферацията и диференциацията на гранулозните клетки, при което фоликулът нараства и достига ранен антрален стадий (Cadenas et al., 2023).

При късните преантрални фоликули се задействат механизми за селекция на доминантни фоликули. Процесът е особено прецизно регулиран при т. нар. моноовулаторни видове като човек, говедо, кон и др., при които във всеки размножителен цикъл нормално настъпва овулация само на една яйцеклетка. С нарастването на диаметъра на фоликулите и диференцирането на гранулозните клетки настъпва спад в секрецията на активин и увеличаване на секрецията на инхибин (Appiah Adu-Gyamfi et al., 2020; Kristensen et al., 2018). По този начин започва да се потиска секрецията на ФСХ от хипофизата. Намаленото ниво на ФСХ в кръвта не позволява на изоставащите преантрални фоликули да се развият до антрални и води до тяхната атрезия. Най-големият фоликул обаче става доминантен и продължава да расте, тъй като за неговите клетки дори ниски нива на ФСХ са достатъчни – факт, описван от различни автори като повишена чувствителност или понижена зависимост от този хормон (Son et al., 2011).

Освен паракринния контрол е важно да се отбележи, че междуклетъчните контакти между гранулозните клетки и овоцита са нужни за всички етапи на

фоликулогенезата. В цепковидните контакти между гранулозните клетки от основно значение е конексин 43 (*Cx43*), а между гранулозните клетки и овоцита – конексин 37 (*Cx37*). Образуването на *zona pellucida* не пречи на цепковидните контакти, тъй като през нея преминават тънки израстъци на кумулусните клетки, достигащи до оолемата. През конексиновите канали между клетките преминават сигнални молекули, поради което дефектите в тях водят до проблеми в нормалното развитие на фоликулите (Winterhager & Kidder, 2015).

Антралните стадии са свързани с образуването на антрум и диференцирането на гранулозните клетки в пристенни и кумулусни клетки във фоликула. При достигане до антрален фоликул овоцитът става компетентен да възобнови мейозата, т.е. да приключи фазата на растеж и да продължи към зреене. Развитието на антралния фоликул е зависимо от гонадотропините ФСХ и ЛХ. Те действат, като се свързват съответно с ЛХ-рецептори за ЛХ и ФСХ-рецептори за ФСХ. Отличителен белег на доминантния фоликул е придобиването на ЛХ рецептори в отговор на действието на ФСХ и диференцирането на ендокринно активен тека слой, способен да синтезира андрогени в отговор на ЛХ стимулация. Под влияние на ЛХ тека клетките секретират андрогени, а под влияние на ФСХ гранулозните клетки превръщат тези андрогени в естрогени. Миши нокаут модели за гените на ФСХ- и ЛХ-рецепторите доказват първостепенната роля на гонадотропиновата стимулация за узряването на фоликула и овулацията. Липсата на ЛХ-рецептори води до ниска секреция на естроген във фоликула и невъзможност той да узрее и да овулира. Липсата на ФСХ-рецептори не позволява развитие на фоликула до антрален стадий и е свързана със занижена експресия на ЛХ-рецепторите. Също така, както се спомена по-горе, ФСХ-рецепторът изпълнява важна роля за активирането на ароматазата в гранулозните клетки и метаболизирането на андрогените до естрогени (Ferin, 2008). Ефектите на гонадотропините се регулират както чрез промяна в секрецията им посредством сигнали за обратна връзка към хипоталамуса от зреещите фоликули в яйчниците, така и от модулация на рецепторите им от паракринни фактори в рамките на фоликулите.

Андрогените са важни за пролиферацията и оцеляването на гранулозните клетки. Нокаут модел на гена за андрогенния рецептор в мишки е свързан със субфертилитет, като води до висока степен на апоптоза в гранулозните клетки и редуциране на антралните фоликули (Walters et al., 2012).

Естрадиолът във фоликулите е ключов за гонадотропин-индуцираната диференциация на гранулозните клетки. Нокаут на гена за естрогенния рецептор алфа (*ERα*) води до спиране в развитието на ранните антрални фоликули и инфертилитет (Dupont et al., 2000).

По време на антралните стадии на развитие на фоликула значение имат и инсулиноподобните растежни фактори (*IGF*). Комбинираният им ефект с гонадотропините е важен за правилното функциониране на тека клетките и гранулозните клетки (Mazerbourg & Monget, 2018). При липса на *IGF1* в мишки се наблюдава потискане на развитието на антрални фоликули, понижена активност на ФСХ-рецептора, намален синтез на естрадиол и слаба пролиферация на гранулозните клетки (Hayes et al., 2024).

Активините и инхибините са нужни и за развитието на антралните стадии. Те регулират ЛХ-индуцираната синтеза на андрогени от тека клетките на фоликула (Young & McNeilly, 2012). При липса на рецептор за активин в мишки се наблюдава арест на ранните антрални фоликули (Matzuk et al., 1996). Системата инхибин-активин контролира не само пролиферацията на гранулозните клетки, но и тяхната диференциация и узряването на овоцита (Knight et al., 2012).

Овоцитните фактори *GDF9* и *BMP15* също влияят на късните етапи на фоликулогенезата. Те регулират ФСХ-индуцираните ефекти в гранулозните клетки. *GDF9* потиска ФСХ-индуцирания синтез на естрадиол и ФСХ-индуцираната експресия на ЛХР в кумулусни клетки. *BMP15* редуцира апоптозата в кумулусните клетки и експресията на ФСХ-рецептора. Комбинацията на *GDF9* и *BMP15* заедно с *BMP6* потиска ФСХ-индуцирания синтез на прогестерон, чрез което се избягва преждевременната лутеинизация (превръщане в жълто тяло) на фоликула и се подпомага неговото оцеляване. Факторите *GDF9* и *BMP15* са важни и за експанзията на кумулуса в преовулаторните фоликули (Cadenas et al., 2023).

Важни за узряването на фоликула са и *BMP4* и *BMP7*, които се секретират от тека клетките като паракринни сигнали. Те повишават преживяемостта на гранулозните клетки, като потискат апоптозата им (Shimizu et al., 2012).

4. Възпаление: остеоартрит и простагландини

4.1. Остеоартрит при човек и миши модел на колагеназно-индуциран остеоартрит

Остеоартритът (ОА) представлява дегенеративно заболяване на синовиалните стави (най-често коленните, тазобедрените и глезенните), за което са характерни разрушаване на ставните хрущяли и деформиране на костната тъкан, съпътствани с болка и възпаление. В дългосрочен план то води до ограничаване на движението и намаляване на работоспособността, влошавайки качеството на живот на засегнатите пациенти. Тези проблеми създават повишена потребност от медицински грижи и нужда от преосмисляне на влиянието на заболяването в обществото и оптимизиране на превенцията и лечението.

Макар остеоартритът да е мултифакторно заболяване, полово и възрастово обусловените хормонални нива имат пряко отношение към неговата поява, развитие и прогресия (Peshkova et al., 2022). Така, макар да засяга и двата пола, остеоартритът се среща предимно при жени и обикновено се свързва с хормоналните промени при напредване на възрастта и влиянието им върху опорно-двигателния апарат (Prieto-Alhambra et al., 2014; Stevens-Lapsley & Kohrt, 2010). В световен мащаб жените представляват 60% от хората с остеоартрит, главно след 40-годишна възраст (Segal et al., 2024). Основните промени в ставната структура включват изтъняване на ставния хрущял, склонност към изкривяване спрямо нормалната позиция в засегнатата става, нестабилност на ставата и неравномерно механично натоварване в нея. Възможно е преобладаването на ОА при жени да е свързано с рязкото намаляване на нивата на половите хормони в менопаузата (Peshkova et al., 2022). Други рискови фактори при жените могат да

бъдат професионалните занимания със спорт и други физически натоварвания, наднорменото тегло, употребата на орални противозачатъчни, голям брой бременности и раждания, като не се изключва и генетична предразположеност. Изследванията върху етиологията на заболяването показват комплексна взаимовръзка между хормонални предпоставки, затлъстяване и механично увреждане на ставите (Hussain, Wang, et al., 2018; Kalichman & Kobyliansky, 2007; Stevens-Lapsley & Kohrt, 2010; Zhou et al., 2018).

Освен различията по отношение на биомеханиката на мъжкия и женския опорно-двигателен апарат (Black & Clark, 2022; Patterson et al., 2023) трябва да се отбележи като фактор и абнормално развитие на тазовите кости при новородени момичета заради преждевременно раждане и поднормено тегло (Hussain, Ackerman, et al., 2018). Тези данни показват, че остеоартритът следва да се разглежда не като изолиран процес на дегенерация на ставите в напреднала възраст, а като увреждане от комплексен характер, засягащо целия организъм и развиващо се под влияние на набор от фактори, действащи през различни периоди от живота.

Макар че остеоартритът първоначално е описан като невъзпалително дегенеративно ставно заболяване, в последно време се натрупват данни за важна роля на възпалителните механизми и сигнални пътища. Напредващото разрушаване на хрущяла и увреждане на синовиалната мембрана се свързва с развитието на имунен отговор – както хуморален, така и клетъчен. Той се изразява в активиране на комплемента, секреция на проинфламаторни цитокини и инфилтрация с активирани макрофаги и различни субпопулации Т-лимфоцити (Lopes et al., 2017).

В изследователската общност се застъпват различни мнения за обхвата на възпалението. Някои автори смятат остеоартрита за локален възпалителен процес с ниска интензивност. Основание за това им дава наличието на проинфламаторни цитокини в остеоартритните стави (например *IL-1β*, *IL-6*, *IL-15*, *IL-17*, *IL-18*, *IL-21*, *TNF-α* и *LIF*) и хемокини, които не са доставени от системното кръвообращение (Eitner et al., 2017). Предполага се участие и на механизми на

вродения имунитет като разпознаване на молекулни характеристики, свързани с тъканното увреждане, и наличие на молекули-ефектори от комплемента, способни да активират синовиалните макрофаги и мастоцити (Robinson et al., 2016). Като локални имунни фактори тези медиатори на възпалението могат да имат разрушително действие и на тях се приписва хроничното възпаление, съпровождащо остеоартрита (Orlowsky & Kraus, 2015).

Според изследвания на други автори обаче възпалителните промени, съпровождащи остеоартрита, не са ограничени локално, а се генерализират и стават системни. В кръвни проби от пациенти са открити показатели на системно възпаление като повишен брой на левкоцитите (Hackney et al., 2019) и повишена концентрация на адипокини (Berenbaum et al., 2013). При сравняване на показатели за синовиално с такива за системно възпаление е установена положителна корелация между нивата на *C*-реактивния белтък и *IL-17* в синовиалната течност, от една страна, и нивата им в кръвната плазма и броя левкоцити в кръвта, от друга (Babaei et al., 2019; Ivanovska & Dimitrova, 2011).

Съвременни изследвания върху ролята на вътреставното и системното възпаление за ставната ноцицепция разглеждат двата механизма като взаимно свързани и с потенциално значение на локални и системни възпалителни биомаркерни профили за персонализиране на лечението на остеоартрит. Установени са локално ставни и системно циркулиращи имунни клетки с важна роля в развитието на възпалителния отговор чрез поддържане на сигнални пътища на вродения имунитет, свързани с тъканното увреждане, както и взаимодействие с други типове клетки в ставата (Knights et al., 2023).

Макар че повечето страдащи от остеоартрит са в пострепродуктивна възраст, наблюдавано е развитие на заболяването и у млади жени, занимаващи се с дейности, свързани с интензивно натоварване на ставите, най-вече професионален спорт, балет или инструментална музика. С оглед фокуса на това изследване следва да се обърне внимание на спортове и изкуства, при които повторяемо ставно натоварване продължава с години (Amoako & Pujalte, 2014; Angioi et al., 2013; Sheibani-Rad et al., 2013). Това поставя въпроса за възможното

влияние на остеоартрита върху фертилитета на тези пациентки. В известните ни литературни източници липсват данни конкретно за остеоартрита, но има съобщения за отрицателни ефекти на други възпалителни болестни състояния върху овогенезата. При жени със системен еритематозен лупус нивата на антимюлеровия хормон са понижени, което показва изтощаване на яйчниковия резерв (Martins et al., 2017). Мишките *MRL/MpJ* (*MRL*/+), които спонтанно развиват автоимунитет, имат по-малък брой яйчникови фоликули в сравнение със здрави животни на същата възраст (Otani et al., 2015). В последните години се натрупват данни, че вредното влияние на затлъстяването и синдрома на поликистозните яйчници върху овогенезата частично се дължи на хроничното възпаление с ниска интензивност, което съпровожда тези състояния (Boots & Jungheim, 2015).

Мишките с колагеназно-индуциран остеоартрит (КИОА) са адекватен модел на човешкото заболяване. Те подобно на засегнатите хора показват основните симптоми на остеоартрита – дегенерация на ставния хрущял, склероза на подлежащата кост, образуване на остеофити (шипове), синовиално възпаление и хиперплазия. Развитието на болестните промени следва основните етапи: остра фаза, активно развитие на възпалението и същинска фаза на остеоартрита с хронификация, които са типични за модел с ензимно-индуцирано ставно възпаление (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014; Samvelyan et al., 2021). Развитието на тези болестни промени е възпроизводимо и симптомите се появяват и задълбочават бързо, което позволява наблюдения и изследвания в рамките на сравнително краткия живот на опитните животни. Тези предимства, съчетани с ниските разходи и ефективното развъждане, правят мишките с колагеназно-индуциран остеоартрит подходящ и широко прилаган животински модел, върху който да се изследват механизмите на развитие на остеоартрита, ролята на наследствените фактори, както и потенциалните подходи за лечение (Lorenz & Grässel, 2014; Poulet, 2016).

4.2. Простагландин *F2α* като медиатор на възпалението по време на овогенезата

Данните за важната роля на възпалението в патогенезата на остеоартрита логично водят до предположението, че ако заболяването е свързано с нарушения на овогенезата, те най-вероятно се дължат на системни ефекти на възпалението. Задълбоченото изследване на този проблем изисква насочване на вниманието към молекулите-участници във възпалителния процес. Важно място сред тях заемат простагландините – група съединения с липидна природа, производни на арахидоновата киселина. Простагландините се синтезират в широк набор от тъкани с участието на ензима циклооксигеназа, след което се секретират и осъществяват паракринна сигнализация, като се свързват с рецептори по клетъчната мембрана. Биологичната им активност е комплексна, зависеща както от конкретния простагландин, така и от прицелните клетки, но поначало те са медиатори на възпалението. Нестероидните противовъзпалителни лекарства като ацетилсалицилова киселина, диклофенак и ибупрофен са инхибитори на циклооксигеназата и действието им се основава на потискане на синтеза на простагландини (Wautier & Wautier, 2023).

Влиянието на простагландините и на възпалителните процеси, които те опосредстват, върху размножаването на женските бозайници е все още недостатъчно изучено. Причината е, че то е сложно и неоднозначно и е свързано както с нормалното функциониране на женската полова система, така и с негови патологични нарушения. От една страна, според данни от последните години локални възпалителни промени в яйчника, настъпващи в подходящ момент и с подходящо времетраене и интензивност, са благоприятни и дори необходими за правилното протичане на овулацията. Според възприетите понастоящем теории рязко повишената концентрация на отделения от хипофизата лутеинизиращ хормон в средата на размножителния цикъл стимулира клетките от гранулозата и теката на Граафовия фоликул да произвеждат простагландини (най-вече простагландин *E2*), цитокини и други медиатори на възпалението. Действайки паракринно в близкото тъканно микрообкръжение, тези молекулни сигнали

предизвикват секреция на протеази както от соматичните клетки на яйчника, така и от инфилтриращи имунни клетки. Протеазната активност, упражнена върху белтъчните компоненти на извънклетъчния матрикс, отслабва механичната здравина на стената на Граафовия фоликул и околната тъкан и улеснява тяхното разкъсване. По този начин възпалителният отговор, опосредстван поне отчасти от простагландини, е в основата на локалното тъканно ремоделиране в яйчника, което е предпоставка за успешна овулация (Duffy et al., 2019). Доказателство за такава функция на простагландините дават изследвания, според които противовъзпалителните лекарства, инхибиращи синтеза на простагландини, ако се приложат в определен времеви интервал, потискат овулацията както при жени, така и при животински модели (Nascimento et al., 2024).

Освен отрицателното влияние на инхибиторите на простагландиновия синтез върху овулацията съществуват данни, че те потискат и самото мейотично зреене на овоцитите (Nascimento et al., 2024). Механизмът на действието им засега е неизвестен, но е логично да се предположи, че простагландините са необходими за овоцитното зреене. В подкрепа на тази хипотеза са съобщенията на някои автори, че добавянето на простагландини, в частност простагландин *E2*, в средата за култивиране на овоцити подобрява качеството им и повишава потенциала им за развитие след осъществяване на оплождане (Boruszewska et al., 2020; Charpigny et al., 2021).

Действието на възпалителните процеси и техните медиатори – простагландините, върху овогенезата обаче е двояко. Успоредно с горецитираните съобщения за благотворно влияние специализираната литература съдържа и множество данни за вреда, в някои случаи стигаща до пълна загуба на размножителната способност. Има съобщения, че бактериални липополизахариди, простагландин *F2α* и други свързани с възпалението молекули, ако действат по време на овоцитното мейотично зреене, нарушават хода на мейозата и понижават потенциала за развитие на получените яйцеклетки (Bromfield & Sheldon, 2011; Soto et al., 2003). Болестни състояния като ендометриоза и синдром на поликистозните яйчници, които нарушават

нормалния ход на овогенезата и намаляват женския фертилитет при човека, все по-често се описват като свързани с възпаление с ниска интензивност, което има важно значение за тяхното отрицателно въздействие върху размножаването (Boots & Jungheim, 2015). Установено е повишено съдържание на простагландини *E2*, *J2* и *F2α* във фоликулната течност при пациентки със синдром на поликистозните яйчници, като концентрацията на простагландини показва обратна зависимост с успеха на *in vitro* оплождането (Feng et al., 2022).

Проблемът за действието на простагландините допълнително се усложнява от изследвания, според които зреенето и потенциалът за развитие на овоцитите не се влияят от наличието на най-застъпените простагландини – *E2* и *F2α*, в културалната среда (Rodrigues et al., 2020). Авторите установяват експресия на гени, свързани с действието на простагландините, в кумулусните клетки, но не и в овоцитите; според същата публикация експресията на простагландинови рецептори в овоцитите е незначителна или изцяло липсва. Гореспоменатото въздействие на бактериалния липополизахарид върху зреещите овоцити най-вероятно се основава на възпалителен отговор на гранулозните клетки, които се активират чрез експресиран на повърхността им *TLR4* (*toll-like receptor 4*) (Bromfield & Sheldon, 2011). Тези резултати пораждат допълнителен въпрос: дали евентуалното въздействие на молекулите, свързани с възпалението, се дължи на пряк ефект върху овоцита, или се осъществява с посредничеството на гранулозните клетки и следователно може да се наблюдава само в рамките на овоцит-кумулусния комплекс.

Както се вижда от горния преглед на публикуваната литература, данните за въздействието на възпалението и в частност на простагландините върху овоцитите към настоящия момент са разнопосочни и противоречиви. Част от причините за това следва да се търсят във факта, че повечето автори прилагат изследваните медиатори на възпалението за дълъг период, включващ повечето етапи на овоцитното зреене, а в редица изследвания и *in vitro* оплождане и начални етапи на зародишното развитие. Този широк обхват въвежда в изследването твърде много неизвестни величини и затруднява обяснението на получените

резултати, още повече че повечето автори не правят опит да търсят ефекти на свързаните с възпалението молекули върху отделните клетъчни компоненти на овоцита като мейотично вретено и хромозоми. Логичната първа стъпка на такова изследване е действието на медиаторите на възпалението да бъде проучено върху зрели овулирани овоцити. Това опростява изследователската задача, доколкото се абстрахираме от ефектите, които биха могли да настъпят по време на овоцитното зреене. Зрелият овоцит е подходяща отправна точка и по друга причина: контактите му с кумулусните клетки, които са започнали да отслабват още с възобновяването на мейозата, към момента на овулацията са минимални (Turathum et al., 2021). Това позволява да се установи въздействието на възпалителните фактори пряко върху овоцита, без усложняващите взаимодействия с кумулуса.

Различните простагландини въпреки общите си особености проявяват и известни разлики във физиологичното си въздействие, което налага при изучаването на влиянието им върху овоцитите да се направи избор на конкретен простагландин. Уместно е поне първоначално простагландин *E2* да бъде изключен поради добре документираната му роля за нормалната овулация. След него най-много литературни данни за въздействие върху овоцитите има за простагландин *F2α* (Feng et al., 2022; Rodrigues et al., 2020; Soto et al., 2003), като според повечето източници то е отрицателно. Липсват обаче данни на субклетъчно ниво за конкретните компоненти на овоцита, които се увреждат от третирането с простагландин *F2α*, което показва необходимостта от изследване с адекватен набор от микроскопски методи.

5. Заключение

В заключение настоящият обзор, насочен към чувствителни точки от мейотичното зреене на овоцитите, обосновава необходимостта от целенасочени изследвания на влиянието на възпалителни и хормонални фактори върху развитието на яйцеклетките в условия на екзогенно повлияване на фоликулогенезата и овогенезата. Мишият модел на КИОА предоставя

възможност за анализ на състоянието на тубулиновите и актиновите структури при индуцираните въздействия, за установяване на характерни цитоскелетни нарушения, които застрашават правилната сегрегация на хромозомите. Сглобяването на мейотични вретена, подредбата на хромозомите в тях и образуването на актинова шапка в овоцитите са определящи фактори, свързани с качеството на овулираните овоцити, потенциала им за оплождане и развитие на зародиш. Изследвания, засягащи влияние на възпалението върху овогенезата, имат значение за репродуктивния успех при остеоартрит в млада възраст. Влиянието на естрадиола и ФСХ, които упражняват разнопосочен ефект върху артритната симптоматика, но имат спрегнато и взаимно обусловено действие при овогенезата, са поле на изследване, в което настоящата работа би имала принос както от теоретичен и научно-изследователски интерес, така и практическо значение за репродуктивната биология.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Изследване на ефекта на колагеназа-индуциран остеоартрит върху овоцитни цитоскелетни структури при миши модел и влиянието на естрадиол и фоликуло-стимулиращ хормон.

Задачи:

1. Визуализация на тубулинов и актинов цитоскелет и хроматин в овоцити на мишки с КИОА и качествено сравнение с овоцити от контролни животни.

2. Изследване на влиянието на различни режими на третиране с естрадиол и ФСХ върху цитоскелетните структури и хроматина при овоцити от мишки с КИОА.

3. Визуализация на овоцитния цитоскелет и хроматин в яйцеклетки, третирани след овулацията с медиатор на възпалението (простагландин *F2α*) като предполагаем механизъм на въздействието на артрита.

4. Статистически анализ на данните за степента на зрялост и морфологичните особености на овоцитите.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

В изследването са използвани женски аутбредни мишки *ICR* (*Institute of Cancer Research*) на възраст 8-10 седмици.

Животните с експериментален, колагеназно-индуциран остеоартрит (КИОА) са предоставени от Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към Българска академия на науките (БАН), след като са им били приложени и различните схеми на *in vivo* третиране с естрадиол (Е2) и фоликулостимулиращ хормон (ФСХ) по време на острата фаза на КИОА.

При отглеждането и третирането на опитните животни са спазени стандартните изисквания за работа с животни, одобрени от Института по микробиология към БАН. Животните, използвани за изследване на въздействието на медиатор на възпалението, са предоставени от сертифицираната Експериментална развъдна база за опитни животни (ЕРБОЖ) към БАН. Всички експерименти с лабораторните животни са съгласувани с Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ, Наредба № 20 от 1 ноември 2012) и международните закони и директиви на Европейския съюз за работа с лабораторни животни.

След получаването им, животните от всички групи са включени в настоящото изследване. Подложени са на хормонална стимулация по стандартизирана схема, след което са евтаназирани, а овулираните яйцеклетки са изолирани от яйцепроводите и подготвени за анализ.

1.1. Групи за оценка на влиянието на КИОА, Е2 и ФСХ

Експерименталният модел на остеоартрит е разработен и приложен към животните в Института по микробиология към БАН и затова е описан тук накратко: след интраперитонеална анестезия с 50 *mg/kg* натриев фенобарбитал,

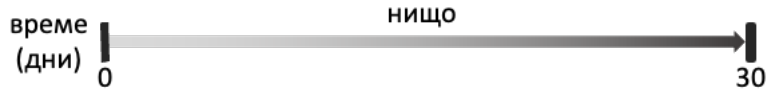
остеоартрит е предизвикан чрез вътреставно инжектиране на 2 *IU/µl* колагеназа (от *ClostridIUm histolyticum*, *Sigma-Aldrich, Germany*) в тибиоталарната става – ден 0 за КИОА. Етапите в хода на остеоартрита са дефинирани като: остра фаза от ден 0 до ден 5, активно развитие на възпалението до ден 18 и същинска фаза на остеоартрита с хронификация – до ден 30 (Ganova et al., 2020). Използваните от нас животни са в същинската фаза на остеоартрита. Контролните животни са инжектирани вътре-тибиоталарно със стерилен *PBS* вместо с колагеназа.

Третирането с естрадиол (*17β-estradiol*, *Sigma-Aldrich*) е прилагано *per os* в доза 4 *µg* в 0,300 *µl* сусамово масло (*Sigma-Aldrich*) и 60 *mg* течен шоколад (*Nutella, Ferrero Co, UK*) за всяка мишка. За третирането с ФСХ хормонът (*FSH*, *Sigma-Aldrich*), разреден в стерилен *PBS*, е инжектиран интраперитонеално на животните в доза 2 *IU*/мишка/ден (0,2 *ml*) за 10-дневен период.

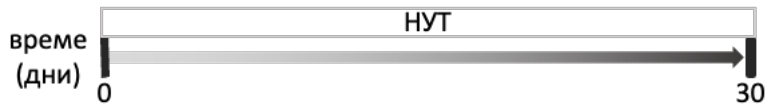
Животните с КИОА и различен режим на прилагане на репродуктивните хормони, получени от Института по микробиология към БАН, са разпределени в групи и се включват в настоящото изследване за оценка на въздействието на Е2 и ФСХ върху прицелните овоцитни структури: актинов и тубулинов цитоскелет, и състояние на хроматина.

Разпределение по групи (за удобство представени и графично):

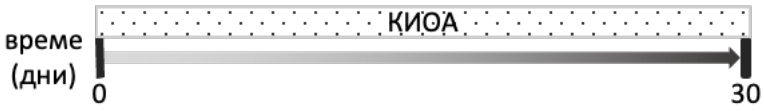
1. Контроли – овоцити, добити от животни без КИОА, но на възраст, сравнима с тези, третирани по различните схеми по-долу. Тази група е наречена чисти **Контроли**;



2. Контроли с течен шоколад – овоцити, изолирани от мишки, на които е даван течен шоколад 30 дни (от едномесечна възраст). Групата е наречена **Контроли^{Нут}**;



3. Група овоцити от женски с индуциран КИОА за 30 дни (от едномесечна възраст) – групата е наречена **30 КИОА**;



4. Яйцеклетки от животни с 30 дневен КИОА на които паралелно е даван само течен шоколад: **30 КИОА^{Нут}**;



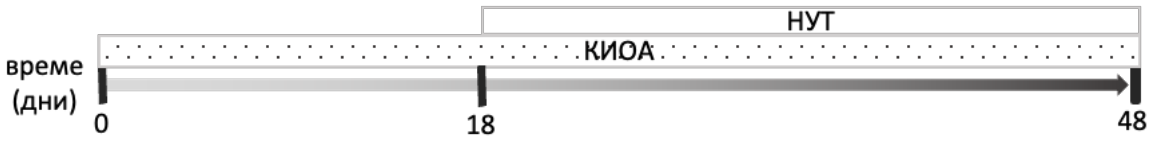
5. Група овоцити от женски, третирани 30 дни с естрадиол (Е2) от едномесечна възраст, даван им посредством течен шоколад: Група **Е2^{Нут}**;



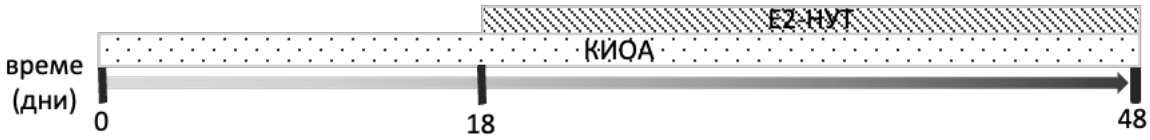
6. Овоцити, получени от животни с 30 дневен КИОА и паралелно третирани 30 дни с естрадиол (Е2), даван им чрез течен шоколад: **30 КИОА + Е2^{Нут}**;



7. Яйцеклетки от животни с КИОА, на които от 18-я ден на КИОА е даван 30 дни само течен шоколад: Група **18 КИОА^{Нут}**;



8. Овоцити, получени от животни с КИОА, които от 18-я ден на артрита са третирани за 30 дни с естрадиол (E2), даван им чрез течен шоколад: **18 КИОА + E2^{Нут}**;



9. Овоцити, получени след 10 дневно третиране с ФСХ без да е индуциран КИОА, но обработени за анализ 30 дни след началото на ФСХ третирането. Групата е наречена **10 ФСХ**;



10. Група яйцеклетки, изолирани от животни с индуциран КИОА, като през първите 10 дни на артрита е прилаган ФСХ, а животните са използвани за добив след 30-я ден на артрита. Групата е наречена **30 КИОА$^{10\ ФСХ}$**;



11. Яйцеклетки, получени от животни, третирани последователно за 10 дни с ФСХ, с последващ 30-дневен КИОА: Група **10 ФСХ + 30 КИОА**;



1.2. Групи за оценка на влиянието на простагландин *F2α*

За оценка на влиянието на простагландин *F2α* са използвани опитни животни на същата възраст (8-10 седмични) към началото на изследването, т.е съпоставима с възрастта на мишките с КИОА. Получените овоцити са инкубирани в среда с

различни концентрации на простагландин *F2α* (*PGF2α*), след което са фиксирани и анализирани за същите овоцитни структури (актинов и тубулинов цитоскелет, както и хроматин).

12. Контролна група овоцити, фиксирани веднага след изолирането им от яйцепроводите: **Контроли *Fix*;**

13. Контролни овоцити, инкубирани в чиста среда за 3 часа. Тази група е наречена **Контроли 0 *PGF2α***;

14. Овоцити, инкубирани в среда с добавен *PGF2α* в концентрация 50 *ng*/*ml* за 3 часа: **50 *PGF2α***;

15. Яйцеклетки, инкубирани в среда с добавен *PGF2α* в концентрация 100*ng*/*ml* за 3 часа: **100 *PGF2α*.**

2. Хормонална овариална стимулация, изолиране и фиксиране на овоцитите за анализ

Всички групи животни са подложени на овариална хормонална стимулация за получаване на синхронно овулирани овоцити: животните с КИОА след проведеното третиране в Института по микробиология към БАН, а тези за *PGF2α* – след получаването им от ЕРБОЖ. Хормоналните дози са съобразени с теглото на мишките от различните групи. Женските от групите с КИОА са инжектирани интраперитонеално с 12 *IU* фоликулостимулиращ хормон, комбиниран с лутеинизиращ хормон (*Meriofert*, *IBSA Farmaceutici*, *Italy*) за предизвикване на множествена овулация и 48 часа по-късно – с 14 *IU* човешки хорионен гонадотропин (*hCG*; *Choriomon*, *IBSA Farmaceutici*, *Italy*) за синхронно овулиране на овоцитите. Женските от ЕРБОЖ, предвид по-ниското им телесно тегло, са стимулирани съответно със 7,5 *IU Meriofert* и с 10 *IU* Choriomon по същата схема.

Всички животни са евтаназирани 16 часа по-късно и яйцепроводите им са отпрепарирани. Манипулацията на яйцепроводите е в среда на *Leibowitz* (*Sigma-*

Aldrich, *Germany*) с 0,3 % говежди серумен албумин (*BSA*; *Sigma-Aldrich*, *Germany*) върху топла масичка на 37°C. Кумулус-овоцитните комплекси (*COCs*) са събрани от дисектираните ампули на яйцепроводите, след което промити в чиста среда на *Leibowitz* и третирани с 0.5 *mg*/*ml* хиалуронидаза (*Sigma-Aldrich*, *Germany*) за премахване на кумулусния слой, заобикалящ овоцитите. „Голите“ овоцити са промити в буфер (*PBS*, *pH* 7.2, с 0,3% *BSA*). При групите за изследване влиянието на *PGF2α* **Контроли *Fix*** са фиксирани веднага след гореизброените стъпки, а при другите има допълнителна инкубация в *α-MEM* (*Sigma-Aldrich*) с различна концентрация (0 *ng*/*ml*, 50 *ng*/*ml*, 100 *ng*/*ml*) на *PGF2α* (*PGF2α Tris salt*, *Sigma-Aldrich*, *Germany*) за 3 *h* на 37°*C* и 5% CO_2.

Всички овоцити са фиксирани с 2% параформалдехид в пермеабилизиращ разтвор (*PBS* с 0,02% *Triton X-100*) за 45 *min* на 37°*C*. След две последователни промивания в буфер (по 10 *min*) овоцитите са поставени в консервиращ буфер с 0,02% натриев азид (в *PBS*, *pH* 7.2, и 0,3% *BSA*) на 4°*C* за 24 часа.

3. Имунофлуоресцентно оцветяване на овоцитите

Овоцитите от всички групи животни са подготвени за визуализиране на структури на микротубулния цитоскелет (мейотично вретено, микротубулни астери), структури на актиновия цитоскелет (кортекс, актинова шапка) и хроматина. За целта овоцитите са инкубирани за 45 *min* на 37°*C* с моноклонално мише анти-*α*-тубулин антитяло (*clone DM1A*, *Sigma-Aldrich*), разтворено 1:1000 в разреждащ буфер (*PBS*, *pH* 7.2, с 0,3% *BSA* и 1% натриев азид) и двукратно промити за по 10 *min* с миещ буфер (*PBS*, *pH* 7.2, с 0,3% *BSA* и 1*μl*/*ml Tween* 20). Следва инкубация (45 *min* на 37°*C*) с *FITC*-белязано анти-мише *IgG* антитяло за визуализиране на микротубулите (*Sigma-Aldrich*), разтворено 1:200 в разреждащ буфер, заедно с фалоидин-*TRITC* (*Sigma-Aldrich*, работна концентрация 1 *μg*/*ml*) за визуализиране на *F*-актин и *Hoechst* (*Hoechst* 33258 в работна концентрация 8 *μg*/*ml* или *Hoechst* 33342 в работна концентрация 5 *μg*/*ml*, *Sigma-Aldrich*) за визуализиране на хроматин. За яйцеклетките от групите с КИОА е приложен

Hoechst 33258, тъй като техните мембрани са пермеабилизирани при фиксирането, докато за яйцеклетките от групите $PGF2\alpha$ е предпочетен *Hoechst* 33342, който преминава през интактни мембрани. След флуоресцентното оцветяване овоцитите са двукратно промити за по 10 *min* с миещ буфер и последователно включени във възходяща концентрация – 10%, 30% и 50% поливинилов алкохол (*Fluka*, *Germany*). За изготвянето на препарати овоцитите са поставени на предметни стъкла в капка от $20\mu l$ 100% поливинилов алкохол и покрити с покривно стъкло.

4. Специфични консумативи и апаратура

За стъпките при манипулирането на кумулус-овоцитните комплекси и култивирането на овоцитите са използвани стерилни ембриологични петрита (*Corning*, САЩ), а наблюдението на клетките е под стереомикроскоп (*Zeiss*, Германия). За фиксирането на клетките, както и флуоресцентното оцветяване, са използвани 96-ямкови стерилни плаки със заоблено дъно (*Corning*, САЩ). Овоцитите са премествани поединично от ембриологичните петрита в плаките и в самите плаки – от ямка в ямка. За целта са използвани стъклени пастьорки, източени на пламък непосредствено преди работа, с изключително тънък и леко закривен връх. Средите и разтворите за клетките са филтрирани през $0{,}22\mu m$ бактериални филтри (*Corning*, САЩ) за стерилна употреба.

Стерилните условия на работа се осъществяват с помощта на ламинарен бокс (*Flow laboratories*, САЩ). За поддържането на $37°C$ е използвана топла масичка (*Labotect*, Германия). За осигуряването на $37°C$ и 5% CO_2 при междинните стъпки на обработката на клетките, както и тяхната инкубация е използван CO_2 инкубатор „*Hera cell 150*“ (*Heraeus*, Германия).

Флуоресцентната микроскопия за изследване на клетките е извършена на епифлуоресцентен микроскоп (*Axioskop* 20, *Zeiss*, *Gottingen*, *Germany*) в катедрата по Биология на МУ-София, както и на лазерен сканиращ конфокален микроскоп (*LSCM, Leica TCS SPE*, *Leica*, *Germany*) в Института по биология и имунология на размножаването (ИБИР) „Акад. К. Братанов“ към БАН.

5. Изследване на овоцитите – епифлуоресценция и лазерна сканираща конфокална микроскопия

Изследването на микротубулния цитоскелет, актиновия цитоскелет и хроматина и съответно установяването на стадия на зрялост на овоцитите е направено чрез наблюдение с епифлуоресцентна микроскопия и заснемане на дигитални образи. Някои от овоцитите са селектирани за лазерна конфокална микроскопия (*LSCM* при 0.1 *μm* оптически срез). Измерването на визуализираните структури в овоцитите е направено с програма *LAS AF* (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence, Version* 1.8.2). Резултатите от *LSCM* са използвани за стандарт, според който са измерени структурите от епифлуоресцентната микроскопия и са отчитани всички морфометрични данни: дължина и ширина на мейотичното вретено и ширина на неговите полюси, както и размер на актиновата шапка.

6. Статистическа обработка на данните

Статистическият анализ на резултатите е направен с програма *IBM SPSS Statistics for Windows* (*Version 27.0/28.0/29.0, IBM Corporation*). Статистическите методи са приложени съгласно ръководството „Да преоткрием статистиката с *IBM SPSS STATISTICS*“ (Зорница Ганева, *Elestra*, 2016).

Параметрични тестове:

1. Сравнението на средноаритметичните стойности за повече от две групи е направено чрез еднофакторен дисперсионен анализ (*one-way ANOVA*). Статистически значимите различия между конкретни групи са установени с допълнителен пост-хок тест (*Games-Howell Post-Hoc test*).

Непараметрични тестове:

1. *Kruskal-Wallis* тест (за повече от две групи) с последващ тест на *Mann-Whitney* (за две групи) – непараметрична алтернатива за случаите, в които групите не покриват изискванията за прилагане на *ANOVA*;

2. За сравнение на категорийни данни е използван *Fisher-Freeman-Halton Exact Test* за независимост.

При извършването на множествени сравнения към резултата за статистическа значимост „p_i“ от непараметричните тестове е приложена корекция на Хочбърг „p_{Hoch}“ (Wright, 1992). Стойностите на p, които са равни на 0,05 или по-малки, са отчетени като статистически значими.

РЕЗУЛТАТИ

1. Общ брой и разпределение на анализираните овоцити

Изследването обхваща 1961 овулирани миши яйцеклетки. От тях 1597 са разпределени по групи, свързани с въздействието на репродуктивни хормони, прилагани в различни режими по време на експерименталния КИОА на животните, върху качеството на овоцитния цитоскелет и хроматин (*Таблица 1*).

Групи	Общ брой	до M I брой (%)	M I брой (%)	Ана I / Тело I брой (%)	M II брой (%)	Ана II / Тело II брой (%)	*D* брой (%)
Контроли	209	3 (1,44%)	86 (41,15%)	2 (0,96%)	116 (55,50%)	0	2 (0,96%)
Контроли^{Нут}	93	2 (2,15%)	40 (43,01%)	1 (1,08%)	49 (52,69%)	0	1 (1,08%)
30 КИОА	193	2 (1,04%)	139 (72,02%)	0	51 (26,42%)	0	1 (0,52%)
30 КИОА^{Нут}	111	0	59 (53,15%)	2 (1,80%)	48 (43,24%)	0	2 (1,80%)
E2^{Нут}	81	2 (2,47%)	36 (44,44%)	4 (4,94%)	32 (39,51%)	0	7 (8,64%)
30 КИОА + E2^{Нут}	55	17 (30,91%)	12 (21,82%)	0	12 (21,82%)	0	14 (25,45%)
18 КИОА^{Нут}	85	1 (1,18%)	46 (54,12%)	0	34 (40,00%)	0	4 (4,71%)
18 КИОА + E2^{Нут}	131	2 (1,53%)	69 (52,67%)	1 (0,76%)	48 (36,64%)	0	11 (8,40%)
10 ФСХ	214	4 (1,87%)	76 (35,51%)	23 (10,75%)	79 (36,92%)	16 (7,48%)	16 (7,48%)
30 КИОА$^{10\ ФСХ}$	139	2 (1,44%)	73 (52,52%)	3 (2,16%)	46 (33,09%)	4 (2,88%)	11 (7,91%)
10 ФСХ + 30 КИОА	286	3 (1,05%)	117 (40,91%)	27 (9,44%)	107 (37,41%)	24 (8,39%)	8 (2,80%)

Таблица 1. Брой и относителен дял по стадии на овоцитите, свързани с КИОА. Обяснение на използваните категории: „до M I“ – стадии *GV* /*GVBD* (по-ранни от Метафаза I); „M I“ – Метафаза I; „Ана I/Тело I“ – стадии Анафаза I или Телофаза I (след Метафаза I); „M II“ – Метафаза II; „Ана II/Тело II“ – стадии след Метафаза II (Анафаза II или Телофаза II); „*D*“ – дегенерирали овоцити.

При 364 яйцеклетки са изследвани дегенеративни ефекти на стареене на тези структури в различни условия на култивиране с простагландин *F2α*. Разпределението на овоцитите по групи с данни за мейотичния им статус към момента на фиксиране, са представени на *Таблица 2*.

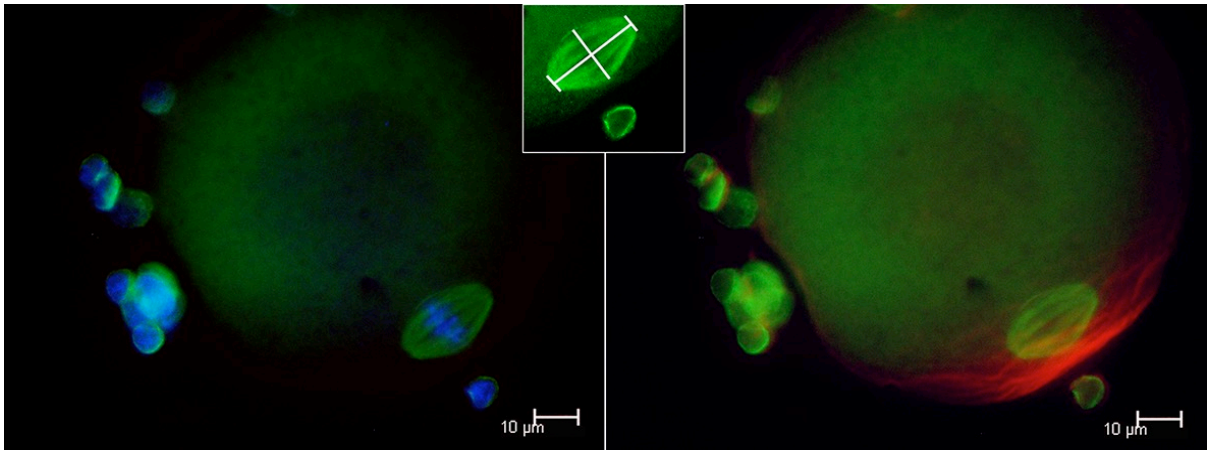
Групи	Общ брой	до М I брой (%)	М I брой (%)	Ана I / Тело I брой (%)	М II брой (%)	Ана II / Тело II брой (%)	*D* брой (%)
Контроли *Fix*	72	2 (2,78%)	18 (25,00%)	0	50 (69,44%)	0	2 (2,78%)
Контроли 0 *PGF2α*	130	2 (1,54%)	52 (40,00%)	0	69 (53,08%)	0	7 (5,38%)
50 *PGF2α*	50	0	31 (62,00%)	0	17 (34,00)	0	2 (4,00%)
100 *PGF2α*	112	0	42 (37,50%)	0	54 (48,21%)	0	16 (14,29%)

Таблица 2. Брой и относителен дял по стадии на овоцитите, свързани с изследването за *PGF2α*. Обяснение на използваните категории: „до М I“ – стадии *GV*/*GVBD* (по-ранни от Метафаза I); „М I“ – Метафаза I; „Ана I/Тело I“ – стадии Анафаза I или Телофаза I (след Метафаза I); „М II“ – Метафаза II; „Ана II/Тело II“ – стадии след Метафаза II (Анафаза II или Телофаза II); „*D*“ – дегенерирали овоцити.

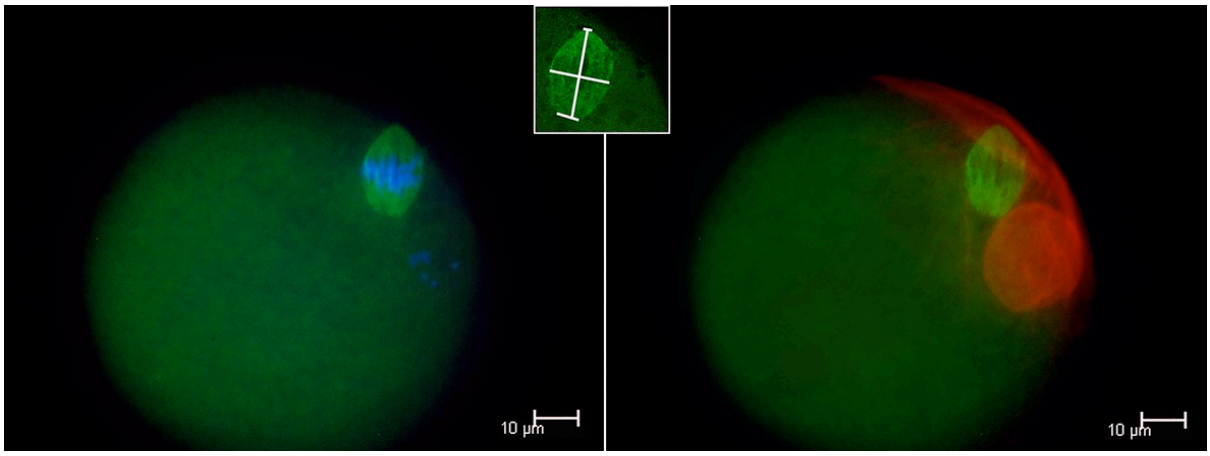
2. Микроскопски анализ на овоцитите

2.1. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ

1. Контроли - овоцити, добити от животни без КИОА, но на възраст, сравнима с тези, третирани по различните схеми. На *Фигури 1А* и *1В* са показани контролни овоцити с нормално вретено, добро качество на хромозомите, правилно подредени в мейотичното вретено. Актиновите шапки са с нормална полярна позиция, морфология и размер.

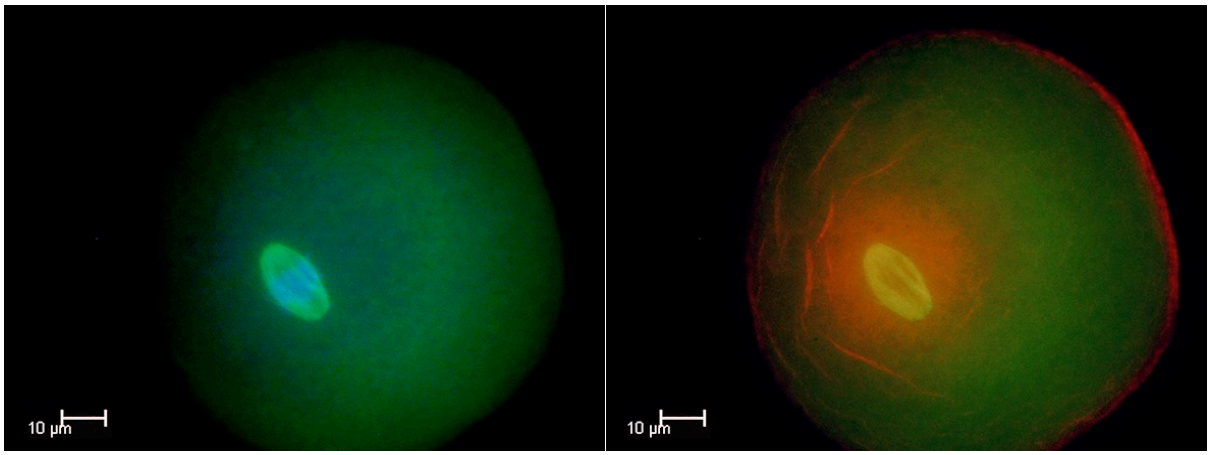


Фигура 1А. Ляво: Епифлуоресценция - контролен овоцит в M I с нормално вретено (зелено), комбиниран образ с подредените хромозоми (синьо); Дясно: същото вретено с актиновата шапка (червено). епифлуоресцентни образи. Вмъкнатата снимка е конфокален образ на същото вретено, използван за измерванията (25 μm дължина и 15 μm ширина, ширина на полюсите съответно 5 μm и 4 μm). Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 μm.



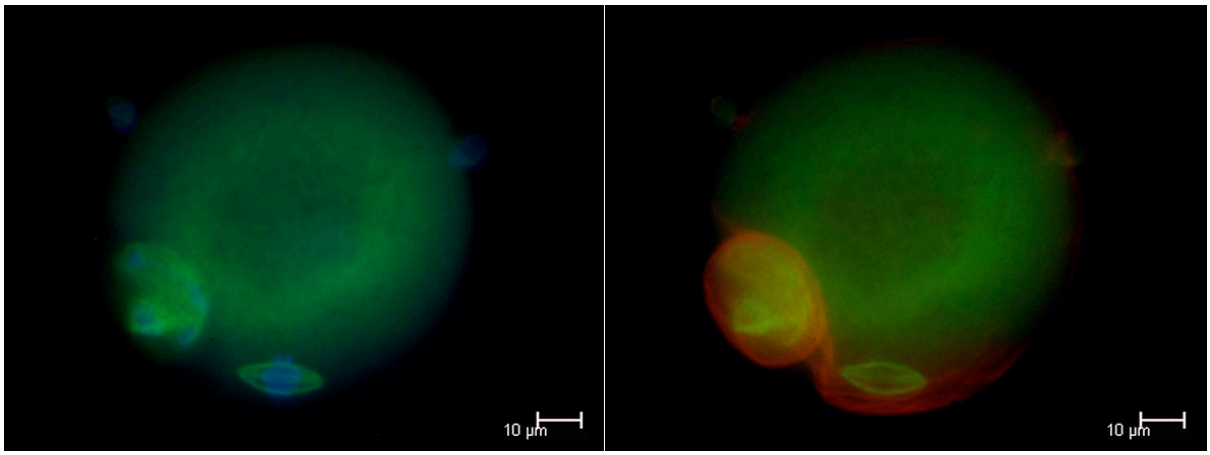
Фигура 1В. Ляво: Епифлуоресценция – контролен овоцит в М II с нормално вретено (зелено) и подредените хромозоми (синьо); Дясно: същото вретено с актиновата шапка (червено) в съседство, вижда се и полярното телце. Вмъкнатата снимка е конфокален образ на същото вретено, използван за измерванията (23 μm дължина и 14 μm ширина, ширина на полюсите съответно 3 μm и 6 μm). Тези измервания са използвани за екстраполиране на данните за епифлуоресцентните образи. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 μm.

2. Контроли^{Нут} – овоцити, изолирани от мишки, на които е даван течен шоколад 30 дни (от едномесечна възраст). Тези яйцеклетки също имат нормални по размери мейотични вретена, добре подредени метафазни хромозоми в тях и нормални актинови шапки. Епифлуоресцентни образи за тази група са показани на *Фигури 2А* и *2В*.



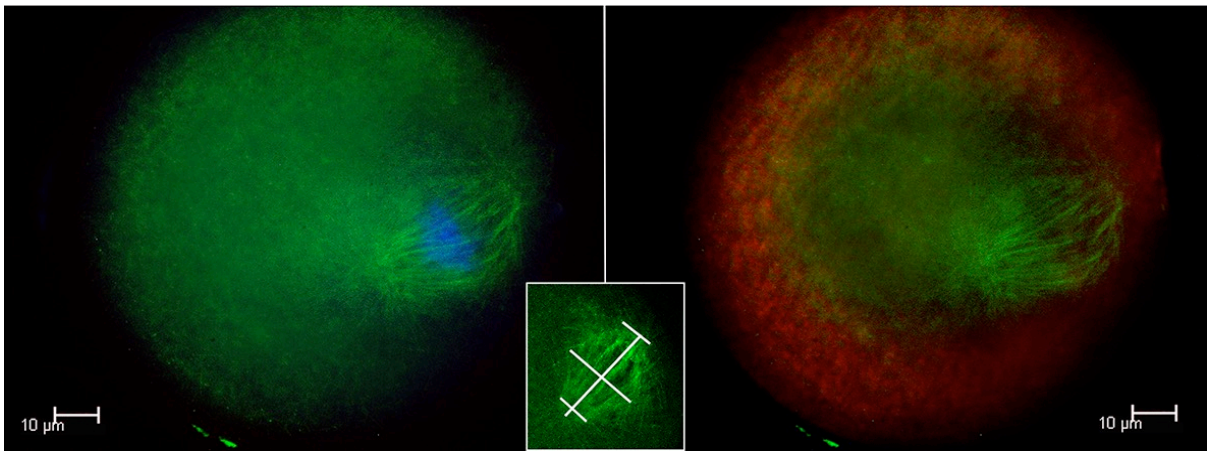
Фигура 2А. Овоцит от група **Контроли^{Нут}** в метафаза I. Ляво: Мейотично вретено (зелено) и правилно подредена метафазна пластинка хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средна дължина на вретената в М I за групата

е 20,27 *μm*, средна ширина 11, 55 *μm*, с полюси средно 3,08 *μm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

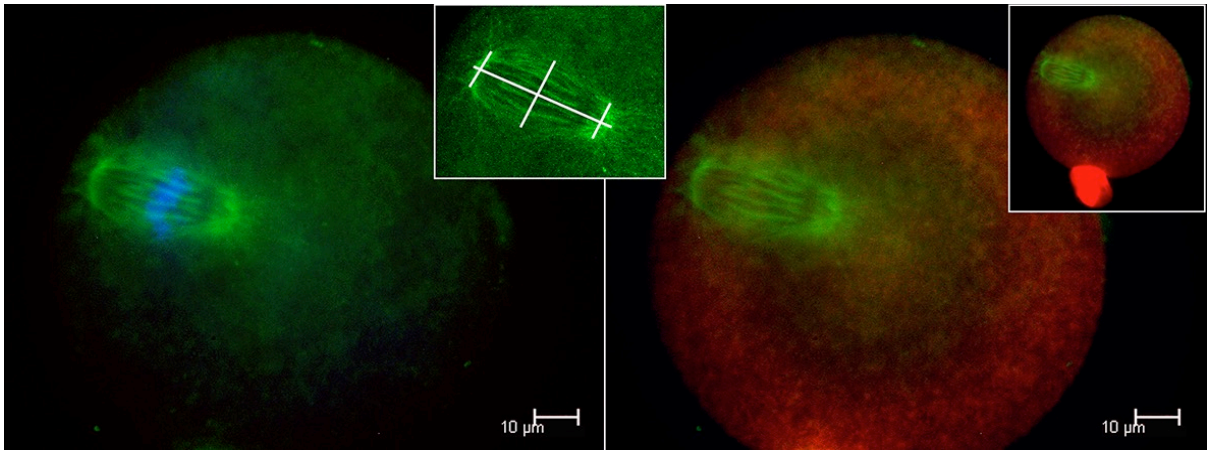


Фигура 2В. Овоцит от група **Контроли**$^{\text{Нут}}$ в метафаза II. Ляво: Епифлуоресценция - нормално вретено (зелено) и подредени хромозоми (синьо); Дясно: същото вретено с нормална актинова шапка (червено) и полярното телце близо до него. Средна дължина на вретената в М II за групата 20,08 *μm*, средна ширина 12, 89 *μm*, полюси средно 3,17 *μm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

3. 30 КИОА - овоцити от женски с индуциран КИОА за 30 дни (от едномесечна възраст, илюстрирани на *Фигури 3А* и *3В*. В тази група яйцеклетки е по-малък делът мейотично зрели овоцити (26.42%MII за **30 КИОА**) спрямо чистите Контроли, с които тази група е сравнявана (55.50% MII). Характерна особеност на групата са големите вретена – както по-дълги, така и по-широки, с широки полюси при сравнение с данните по тези параметри за Контролите. Същевременно актиновите шапки често отсъстват (при 61.87% от MI и 52.94% от MII) като специфична полярна структура, закотвяща вретеното в овоцитната периферия, като са заместени от неполяризиран актинов ореол, видим на снимките като пръстеновиден облак. Въпреки тези характерни аномалии на цитоскелета, хромозомите показват добро качество и подредба в метафазни пластинки.

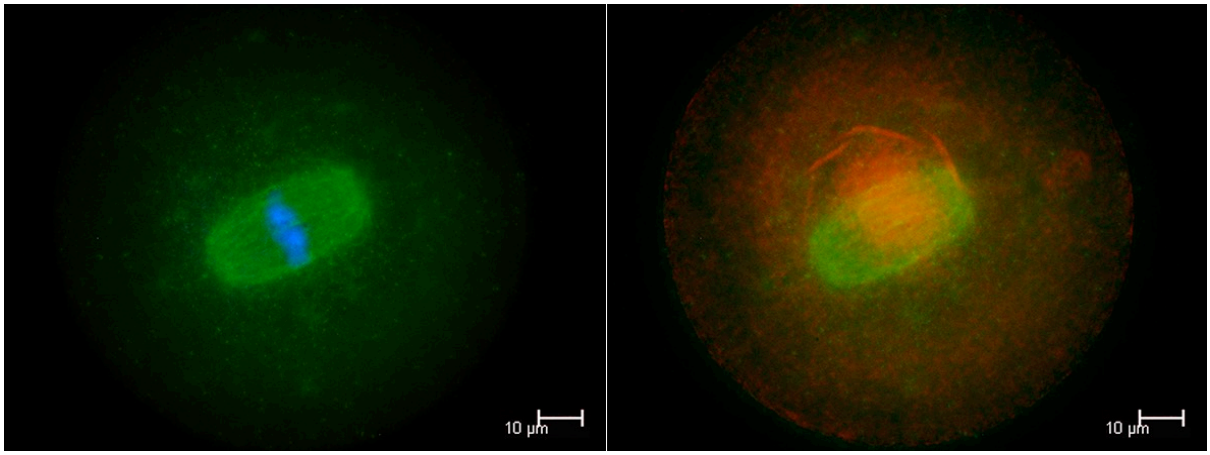


Фигура 3А. Овоцит в М I от група **30 КИОА**. Ляво: Мейотичното вретено е дълго (средно 37,59 *µm*) и широко (18,04 *µm*), с широки (7 *µm*) полюси. Хромозомите са правилно подредени; Дясно: същото вретено, но актинова шапка липсва, а неполяризиран актин образува характерен ореол. Вмъкнатата снимка е конфокален образ на същото вретено с конкретно измерени параметри на вретеното: 45 *µm* дължиина на 31 *µm* ширина; полюси: 14 *µm* и 12 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

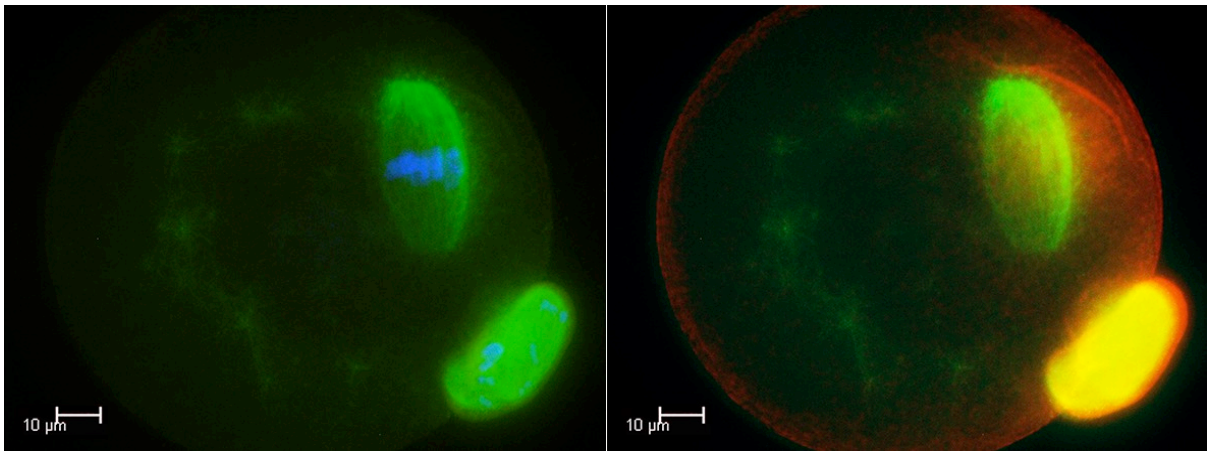


Фигура 3В. Овоцит в М II от група **30 КИОА**. Ляво: Мейотичното вретено е дълго и широко (средна дължина 37,04 *µm* и средна ширина 17,34 *µm*), с широки (средно 6,81 *µm*) полюси. Хромозомите са правилно подредени; Дясно: същото вретено, актинова шапка липсва и неполяризиран актин образува ореол. Вмъкнатата снимка е конфокален образ на същото вретено с конкретно измерени параметри на вретеното: 39 *µm* дължина на 21 *µm* ширина; полюси: 10 *µm* и 10 *µm*). Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

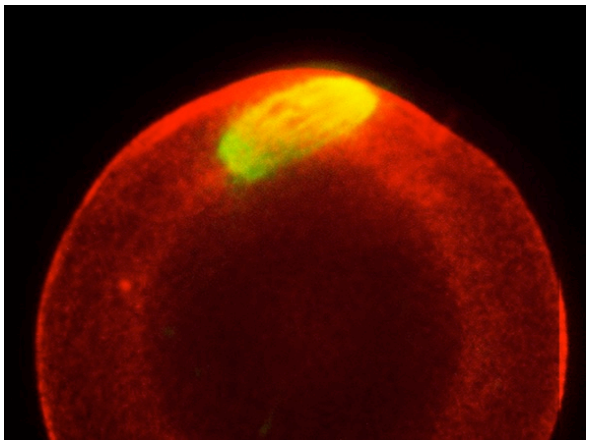
4. Яйцеклетки от животни с 30-дневен КИОА, на които паралелно е даван само течен шоколад: **30 КИОА^{Нут}**, илюстрирани на *Фигури 4А* и *4В*. Групата се отличава с висок процент (над 90%) клетки с дълги, широки вретена с широки полюси и допълнителни тубулинови звезди (астери) в цитоплазмата (при 62,71% М I и при 72,92% М II). Нормален общ вид на вретеното обаче осигурява правилно подреждане на хромозомите в метафазна пластинка. Актиновите шапки са сравнително големи, съответстващи на големите вретена, често придружени от актинов ореол (виж *Фигура 4С*).



Фигура 4А. Овоцит в М I от група **30 КИОА^{Нут}**. Средните параметри на вретеното в групата са: дължина 38,26 *µm*, ширина 19,30 *µm* и полюси 6,17 *µm*. Ляво: тубулин и хроматин; Дясно: тубулин и актин. Ореол от неполяризиран актин, видим отгоре, обгражда шапката. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

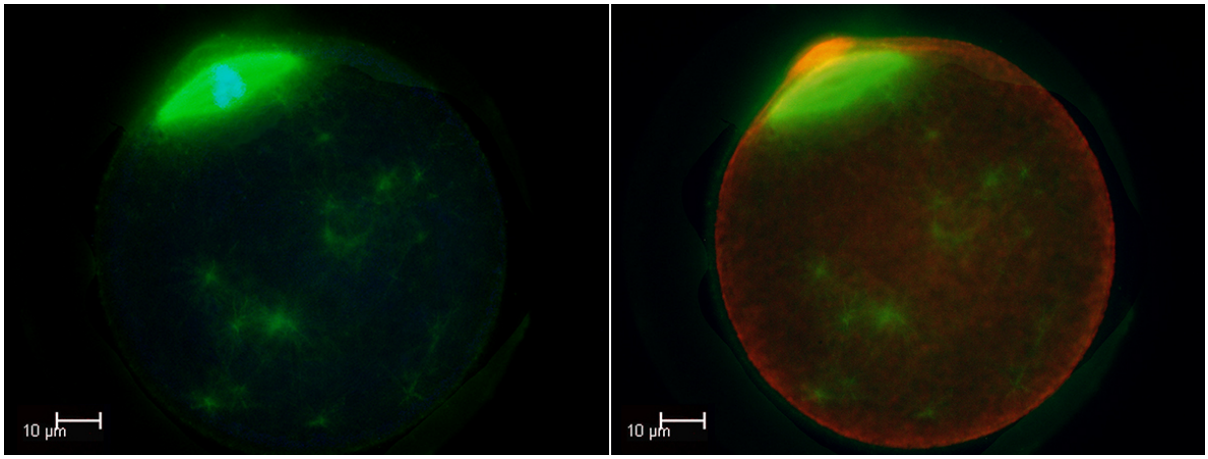


Фигура 4В. Метафаза II овоцит от група **30 КИОА^{Нут}**. Средни параметри на вретеното: дължина 41,27 *µm*, ширина 19,09 *µm*, полюси 5,96 *µm*. Избран е образ с тубулинови звезди в цитоплазмата. Ляво: тубулин и хроматин; Дясно: тубулин и актин. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

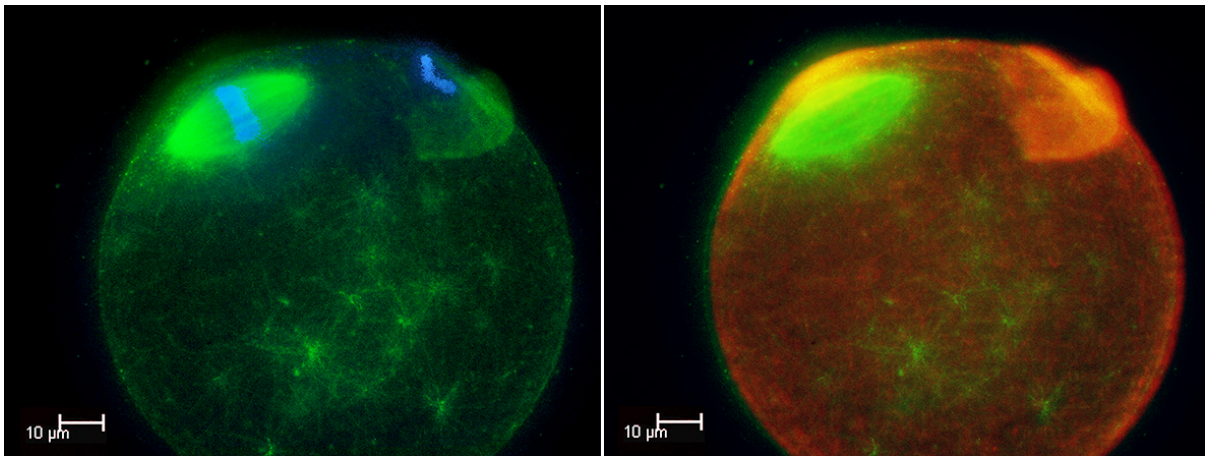


Фигура 4С. Актинов ореол в овоцитна метафаза първа, група **30 КИОА^{Нут}**. Находката е типична за яйцеклетките с 30-дневен остеоартрит. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

5. Група овоцити от женски, третирани 30 дни с естрадиол (Е2) от едномесечна възраст, даван им посредством течен шоколад: Група **Е2^{Нут}**, илюстрирани на *Фигури 5А* и *5В*. Овоцитите от тази група имат по-къси и по-тесни мейотичните вретена, с по-фокусирани полюси. В цитоплазмата често се наблюдават тубулинови астери (в над 70% от клетките). Актиновите шапки са малки, а в групата не се наблюдава актинов ореол.

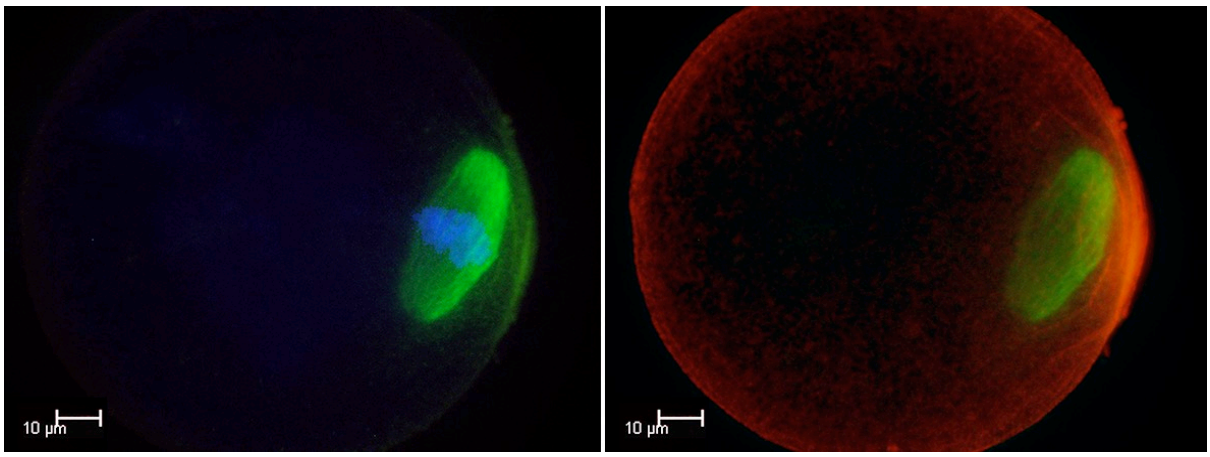


Фигура 5А. Овоцит в М I от група **Е2^{Нут}**. Средните параметри на вретеното в групата са: дължина 37,62 *μm*, ширина 15,91*μm* и полюси 3,23 *μm*. Ляво: тубулин и хроматин; Дясно: тубулин и актин. Цитоплазмени тубулинови астери са типични за групата. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

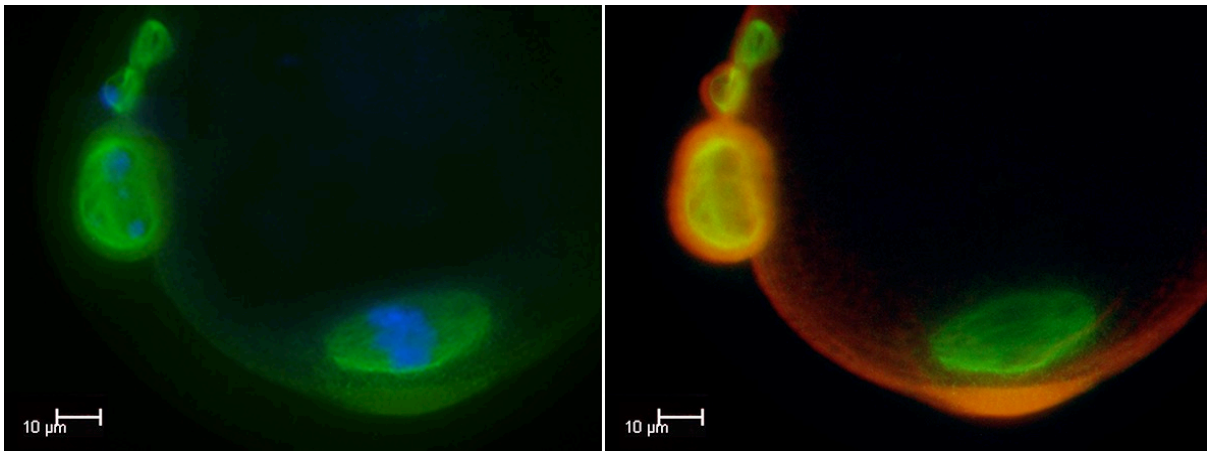


Фигура 5B. Яйцеклетка в М II от същата група (**E2^{Нут}**) с ясно различими тубулинови звезди в овоплазмата. Средни параметри на вретеното дължина 35,82 *µm*, ширина 18,33 *µm* и полюси 4,93 *µm*. Ляво: тубулин и хроматин; Дясно: тубулин и актин. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

6. Овоцити, получени от животни с 30-дневен КИОА и паралелно третирани 30 дни с естрадиол (Е2), даван им чрез течен шоколад: **30 КИОА + E2^{Нут}**, илюстрирани на *Фигури 6A* и *6B*. Тази група се отличава с нисък процент мейотично зрели овоцити и с най-висок процент дегенерирали яйцеклетки. Вретената са с голяма средна ширина и с най-широките полюси спрямо другите групи. Подредбата на хромозомите е преобладаващо нормална.

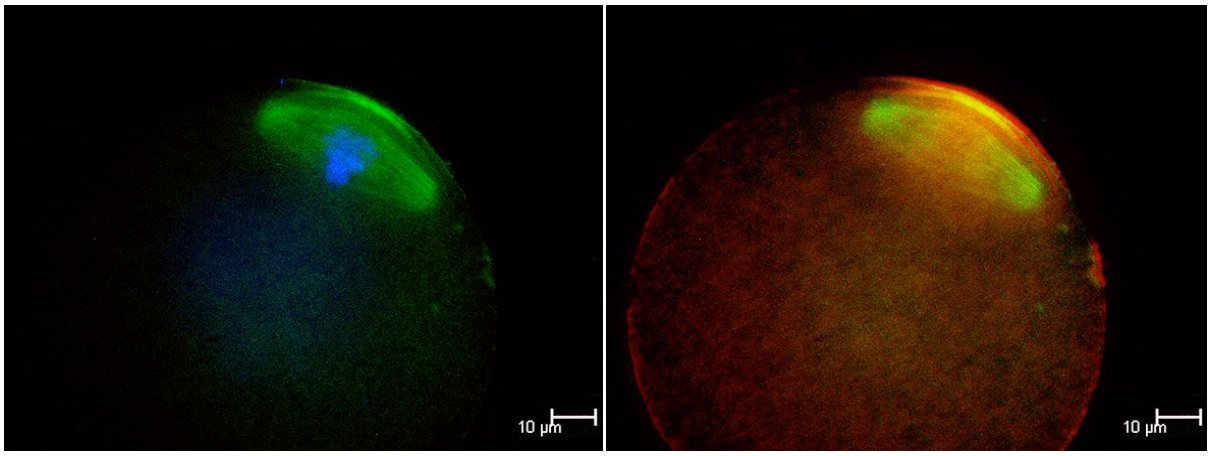


Фигура 6A. Яйцеклетка в М I от група **30 КИОА + E2^{НУТ}**. Средната дължина на вретеното е 46,90 *µm*, средната ширина е 19,29 *µm*, а полюсите са с най-голяма средна ширина от 7,85 *µm*. Комбиниран образ на тубулин с хроматин вляво и комбинация на тубулин с актин вдясно. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

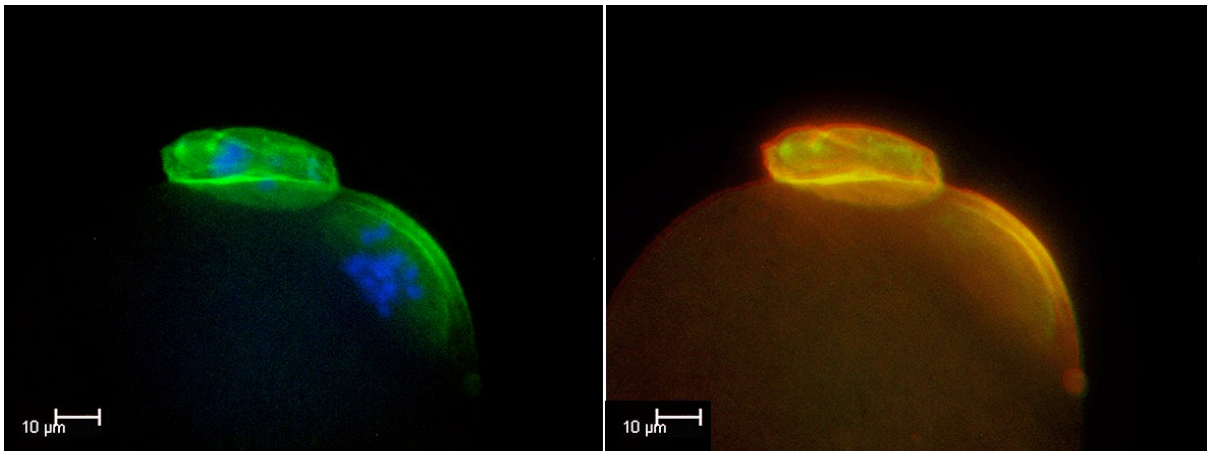


Фигура 6B. Овоцит в M II от същата група. Средната дължина на вретеното е 36,80 *µm*, средната ширина е 19,02 *µm*, а полюсите са също с голяма средна ширина от 7,43 *µm*. Комбиниран образ на тубулин с хроматин вляво и комбинация на тубулин с актин вдясно. Оригиналното увеличение е 1000x. Бар = 10 *µm*.

7. Яйцеклетки от животни с КИОА, на които от 18-я ден на КИОА е даван 30 дни само течен шоколад: група **18 КИОА^{Нут}**. В тази група са измерени едни от най-големите мейотични вретена (виж *Фигури 7A* и *7B*), а тубулинови астери се срещат относително рядко и само в M I, малък дял от яйцеклетките имат дегенерирал хроматин. Има по-висок процент на дезорганизирани вретена и неподредени метафазни пластинки от **30 КИОА^{Нут}**. Средната ширина на актиновите шапки е близка до тази на Контролите. В групата има и овоцити с актинов ореол, но процентът е по-нисък от повечето групи с 30-дневен КИОА.

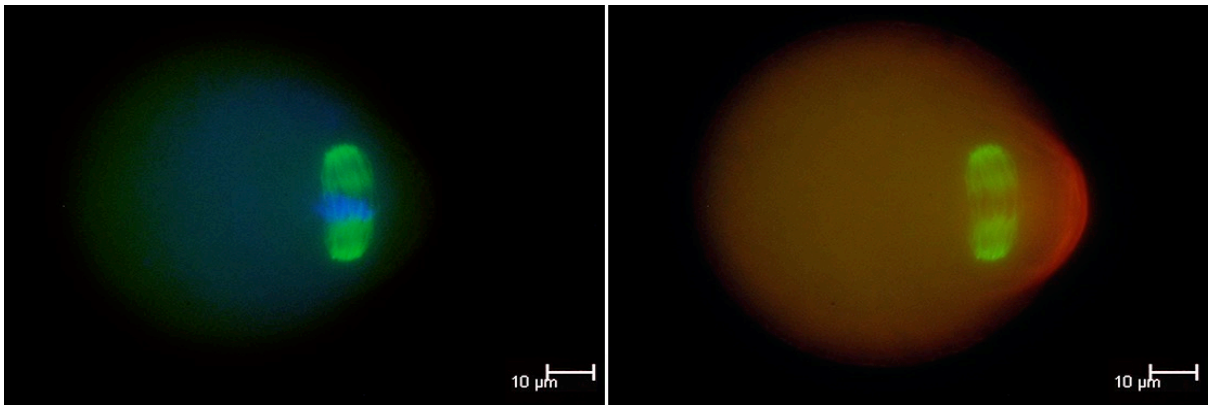


Фигура 7A. Овоцит в M I от група **18 КИОА^{Нут}**. Средната дължина на вретеното е 43,56 *µm*, средната ширина е 19,82 *µm*, а полюсите са средна ширина от 6,72 *µm*. Ляво: комбиниран образ на тубулин с хроматин Дясно: комбинация на тубулин с актин.

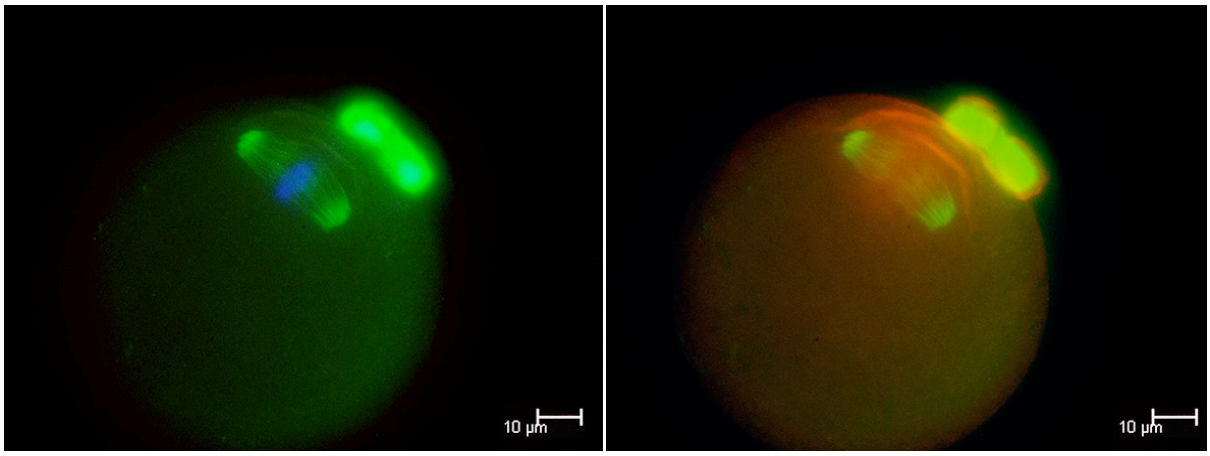


Фигура 7B. Овоцит в M II от **18 КИОА^{Нут}**. Мейотичното вретено е с дегенеративен вид и неподредени хромозоми. Средната дължина на вретената за групата, подлежащи на измерване, е 42,67 *µm*, средната ширина е 19,99 *µm*, а средната ширина на полюсите е 6,66 *µm*. Комбиниран образ на тубулин с хроматин вляво и комбинация на тубулин с актин вдясно. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

8. Овоцити, получени от животни с КИОА, които от 18-я ден на артрита са третирани за 30 дни с естрадиол (E2), даван им чрез течен шоколад: **18 КИОА + E2^{Нут}**. Мейотичните вретена в тази група остават сравнително големи и с широки полюси (виж *Фигури 8A* и *8B*). Групата показва най-високия процент дегенерирал хроматин. Актиновите шапки са по-малки от тези на Контролите.

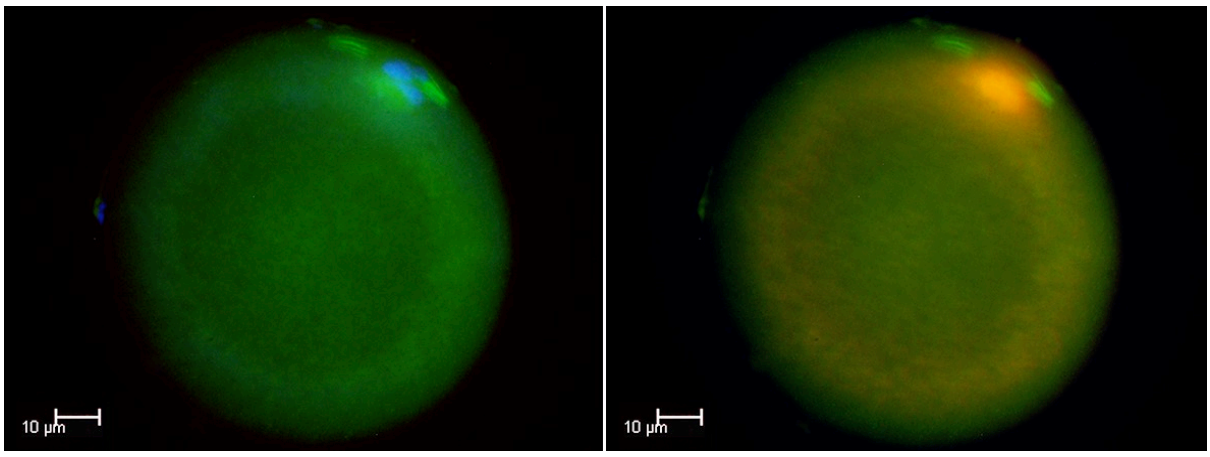


Фигура 8A. Метафаза I овоцит от група **18 КИОА + E2^{Нут}**. Ляво: Широко мейотично вретено с отворени полюси в зелено и правилно подредена метафазна пластинка хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средна дължина на вретената в M I за групата е 36,71 *µm*, средна ширина 16,86 *µm*, с полюси средно 6,96 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.



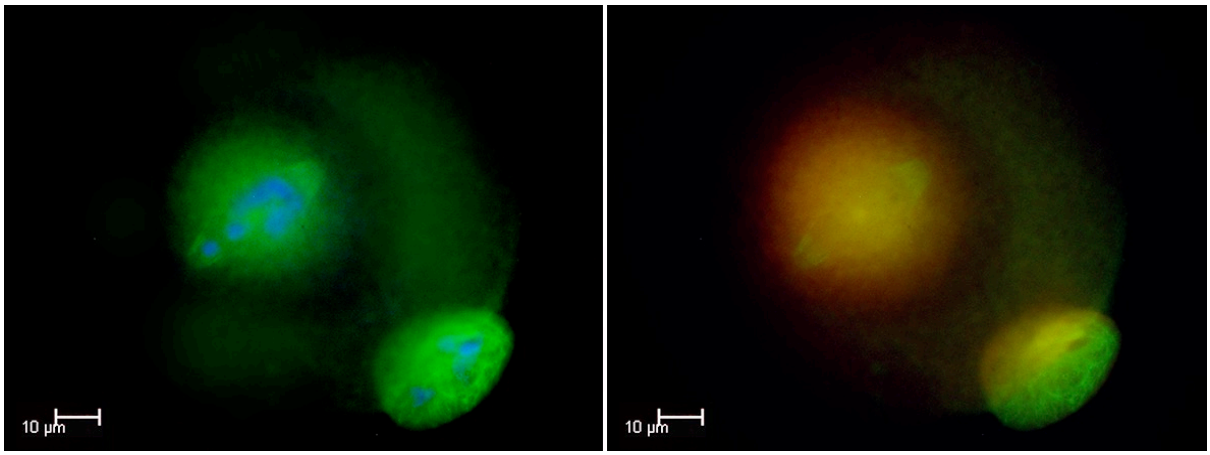
Фигура 8В. Метафаза II овоцит от група **18 КИОА + Е2^{Нут}**. Ляво: Мейотично вретено с широки полюси в зелено и метафазна пластинка с подредени хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средната дължина на вретената е 38,06 *µm*, средна ширина 18,07 *µm*, с полюси средно 7,00 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

9. Група **10 ФСХ**: овоцити, получени след 10 дневно третиране с ФСХ без да е индуциран КИОА, но обработени за анализ 30 дни след началото на ФСХ третирането. За групата са характерни тесни, удължени вретена с компактни полюси, както и малки актинови шапки (виж *Фигури 9А* и *9В*). Наблюдава се „облак“ от деполимеризиран тубулин в централната област на вретеното, около хромозомите. Това е съпроводено с неподредени в метафазна пластинка хромозоми. Има и по-висок процент дезорганизирани вретена и дегенерирал хроматин в сравнение с останалите групи.



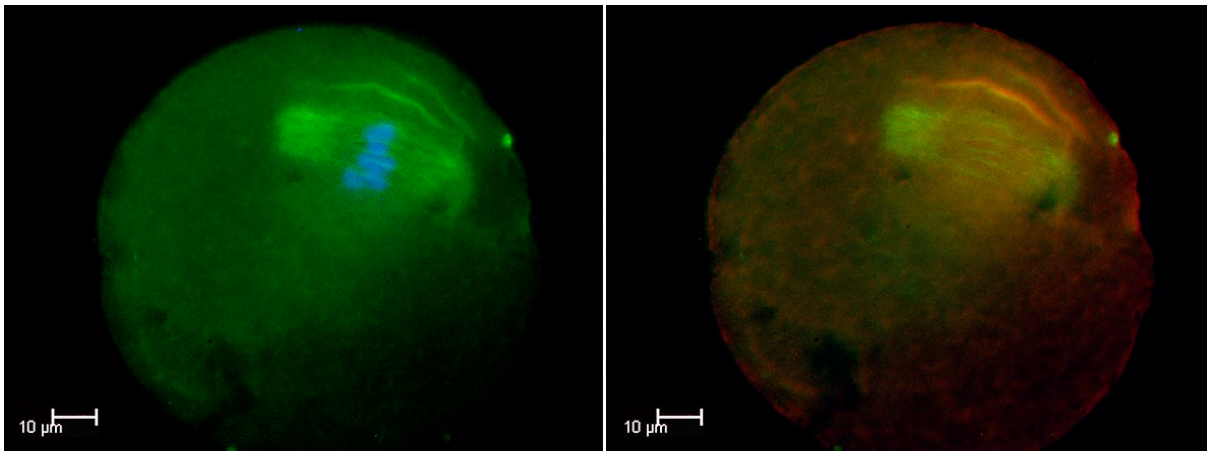
Фигура 9А. Овоцит в метафаза I от група **10 ФСХ**. Ляво: Мейотичното вретено е с тесни, фокусирани полюси, дезорганизирана екваториална област (в зелено) и неподреден метафазен хроматин (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова

шапка. Средна дължина на вретената в M I за групата е 38,41 *μm*, средна ширина 13,13 *μm*, с полюси средно 5,32 *μm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

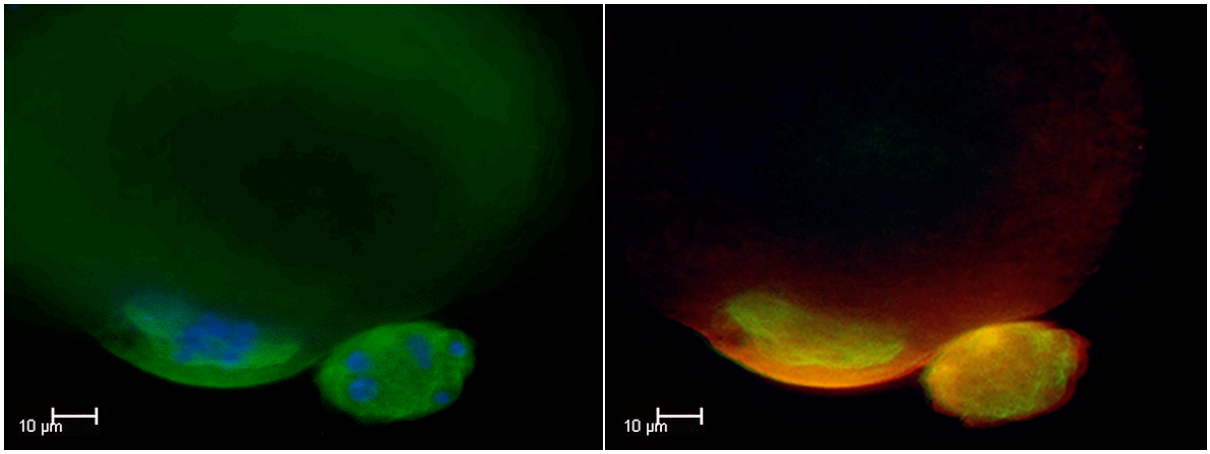


Фигура 9B. Метафаза II овоцит от група **10 ФСХ**. Ляво: Мейотично вретено с оформени полюси, но дезорганизирана екваториална област (зелено) и неподредени, но кондензирани хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средната дължина на вретената е 36,59 *μm*, средна ширина 13,20 *μm*, с полюси средно 4,71 *μm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *μm*.

10. Група яйцеклетки, изолирани от животни с индуциран КИОА, като през първите 10 дни на артрита е прилаган ФСХ, а животните са използвани за добив след 30-я ден на артрита. Групата е наречена **30 КИОА$^{10\ ФСХ}$**. Наблюдават се по-големи вретена спрямо другите ФСХ-групи със средни морфометрични стойности, най-общо близки до останалите КИОА-групи (виж *Фигури 10A* и *10B*). Има най-малък дял на овоцити с дефекти от ФСХ-групите. Установено е и наличие на овоцити с тубулинови астери. Присъстват характерните за ФСХ-третираните групи овоцити с тубулинов облак и средните стойности на актиновите шапки остават от най-малките.



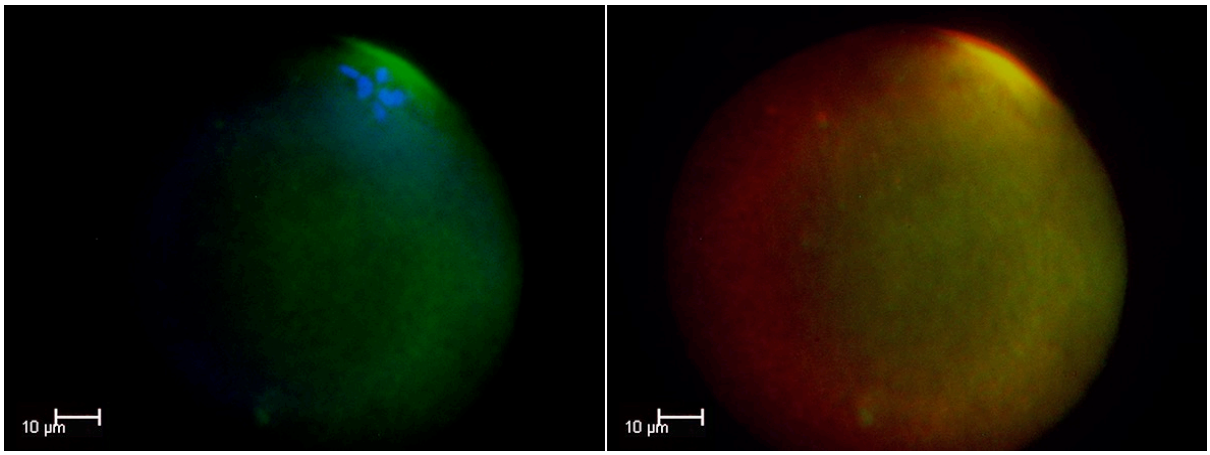
Фигура 10А. Овоцит от група **30 КИОА$^{10\ ФСХ}$** в метафаза I с общо дегенеративен вид. Ляво: Удължено и широко мейотично вретено с широки полюси в зелено и сравнително правилно подредена метафазна пластинка (синьо); Дясно: Същото вретено с неправилно обособена актинова шапка. Средна дължина на вретената в M I за групата е 40,92 *µm*, средна ширина 17,57 *µm*, с полюси средно 5,72 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.



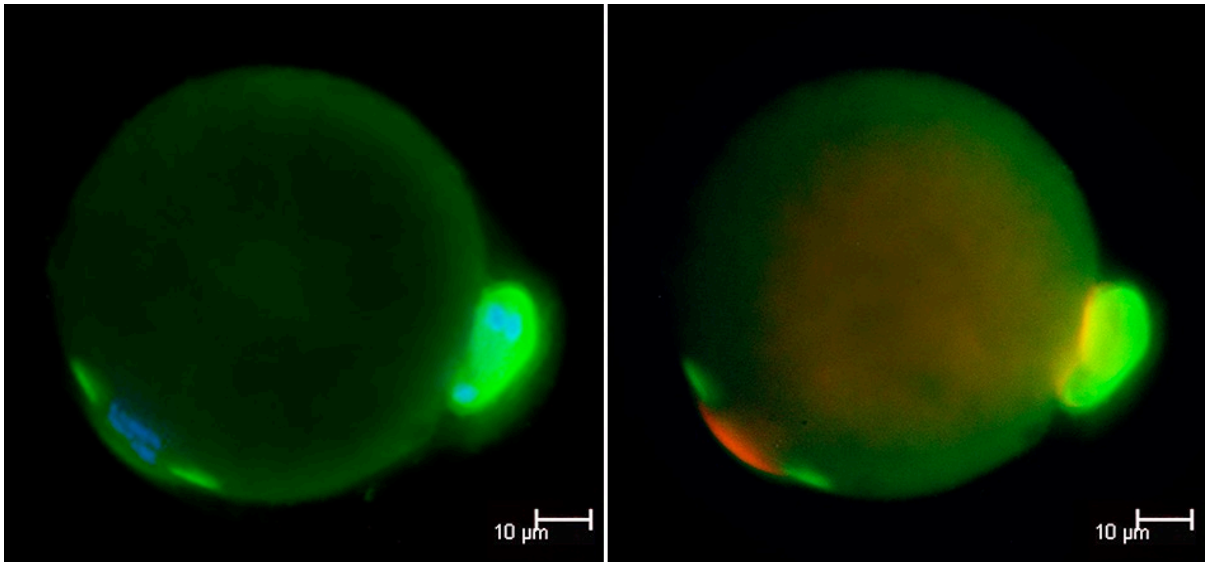
Фигура 10В. Овоцит от група **30 КИОА$^{10\ ФСХ}$** в метафаза II. Ляво: Мейотично вретено с дезорганизирани нишки в зелено и неправилно подредени метафазни хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средната дължина на вретената е 41,62 *µm*, средна ширина 16,41 *µm*, с полюси средно 5,73 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.

11. Яйцеклетки, получени от животни, третирани последователно за 10 дни с ФСХ, с последващ 30-дневен КИОА: Група **10 ФСХ + 30 КИОА**. Мейотичните вретена са най-тесни с най-фокусираните полюси спрямо другите групи с ФСХ. В

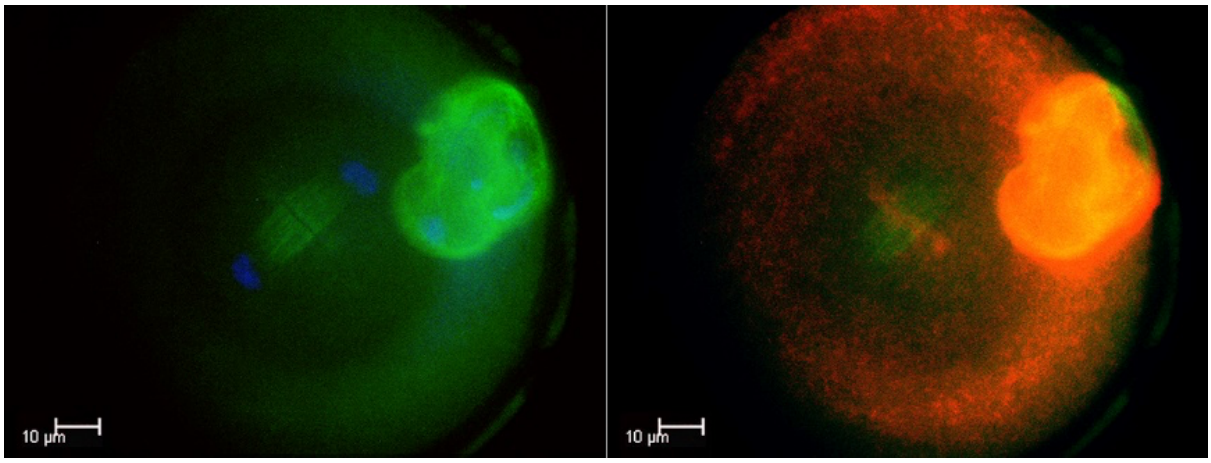
тази група се наблюдават най-голям дял на овоцити с дезорганизирани вретена, тубулинов облак, неподредени метафазни пластинки, дегенерирал хроматин и актинов ореол (виж *Фигури 11A* и *11B*). В групата е измерена най-малка средна ширина на актиновите шапки.



Фигура 11A. Овоцит от група **10 ФСХ + 30 КИОА** в метафаза I. Ляво: Дегенерирало мейотично вретено в зелено и неподредени метафазни хромозоми (синьо); Дясно: Същата клетка с актинова шапка. Средна дължина на вретената в M I за групата е 39,92 *µm*, средна ширина 11,78 *µm*, с полюси средно 4,50 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.



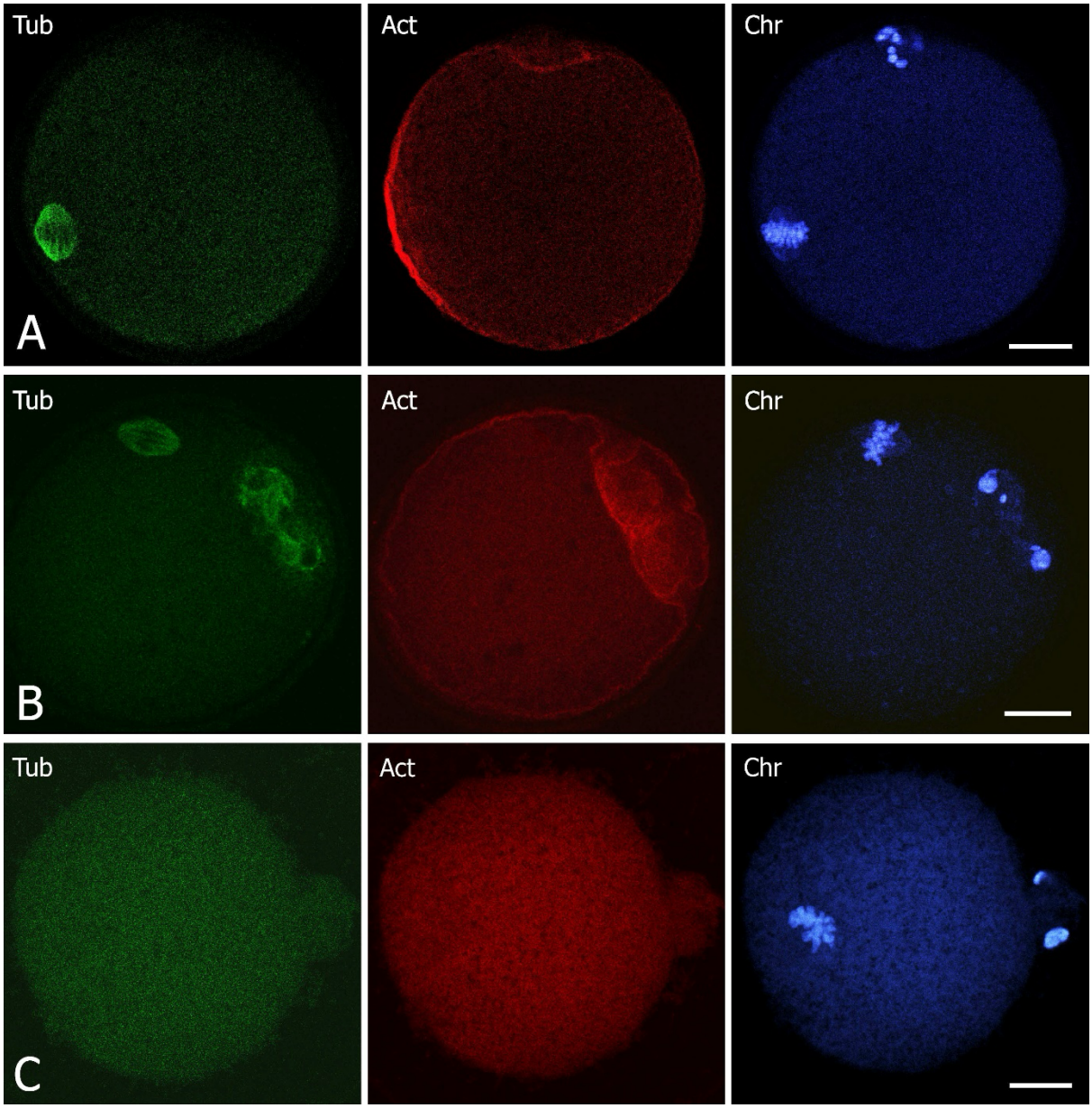
Фигура 11B. Овоцит от група **10 ФСХ + 30 КИОА** в метафаза II. Ляво: Тясно и удължено мейотично вретено с концентрирани полюси в зелено и метафазна пластинка с недобре подредени хромозоми (синьо); Дясно: Същото вретено с актинова шапка. Средната дължина на вретената е 36,46 *µm*, средна ширина 10,98 *µm*, с полюси средно 4,29 *µm*. Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 *µm*.



Фигура 12. Находка, характерна за овоцити от групите, третирани с ФСХ по различни схеми (виж Таблица 1): овоцит, преминал М II арест и продължил към телофаза и цитокинеза на мейоза II. Ляво: Паралелно ориентирани микротубули на вретеното (зелено) с бразда в екваториалната зона и хроматин (синьо) в две групи в краищата на вретеното, както и в полярното телце; Дясно: Тубулин (зелено) и актин (червено). Оригиналното увеличение е 1000х. Бар = 10 μm.

2.2. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на простагландин *F2α*

Докато овоцитите от двете контролни групи се характеризират с добре оформено мейотично вретено, актинов кортекс с шапка над вретеното и хромозоми, подредени в метафазна пластинка на екватора на вретеното, инкубираните в присъствие на простагландин клетки показват промени (виж *Фигура 13*).



Фигура 13. Панелно организирани лазерно-сканирани конфокални образи на овоцити в метафаза II с визуализиран *α*-тубулин (*Tub*), фибриларен актин (*Act*) и хроматин (*Chr*). Оригиналното увеличение е 1000х. Баровете са 20 *μm*. *A* – контролен овоцит в метафаза II (група **Контроли 0 *PGF2α***) с добре оформено

мейотично вретено, актинов кортекс с актинова шапка и хромозоми, подредени в метафазна пластинка. Първото му полярно телце е отгоре. *B* – овоцит в метафаза II от групата **50 *PGF2α*** (инкубация с 50 *ng/ml* простагландин *F2α*). Вретеното изглежда нормално, но актиновата реакция в кортекса и особено в актиновата шапка е слаба. Хромозомите са неправилно подредени. *C* – зрял овоцит от група **100 *PGF2α*** (инкубация с 100 *ng/ml* простагландин *F2α*). Оцветяването за тубулин и актин е дифузно, няма мейотично вретено и кортикален актинов слой, а метафазната пластинка е дезорганизирана.

В групата 50 *PGF2α* вретеното изглежда нормално, но реакцията за актин е по-дифузна, отколкото в контролите, и видимо понижена в кортекса и особено в шапката. Метафазните пластинки в сравнение с контролните са по-широки и със склонност към дезорганизация – от отделни неподредени хромозоми до разпръсване на относително голяма площ. В групата 100 *PGF2α* се визуализират дегенеративни промени във вретеното или то е изчезнало като микроскопски обект. Фибриларният актин е загубил кортикалната си локализация и дава слаба дифузна реакция в цитоплазмата. В метафазните пластинки се наблюдава разпръсване и дезорганизация на хромозомите средно в по-голяма степен, отколкото при 50 *PGF2α*.

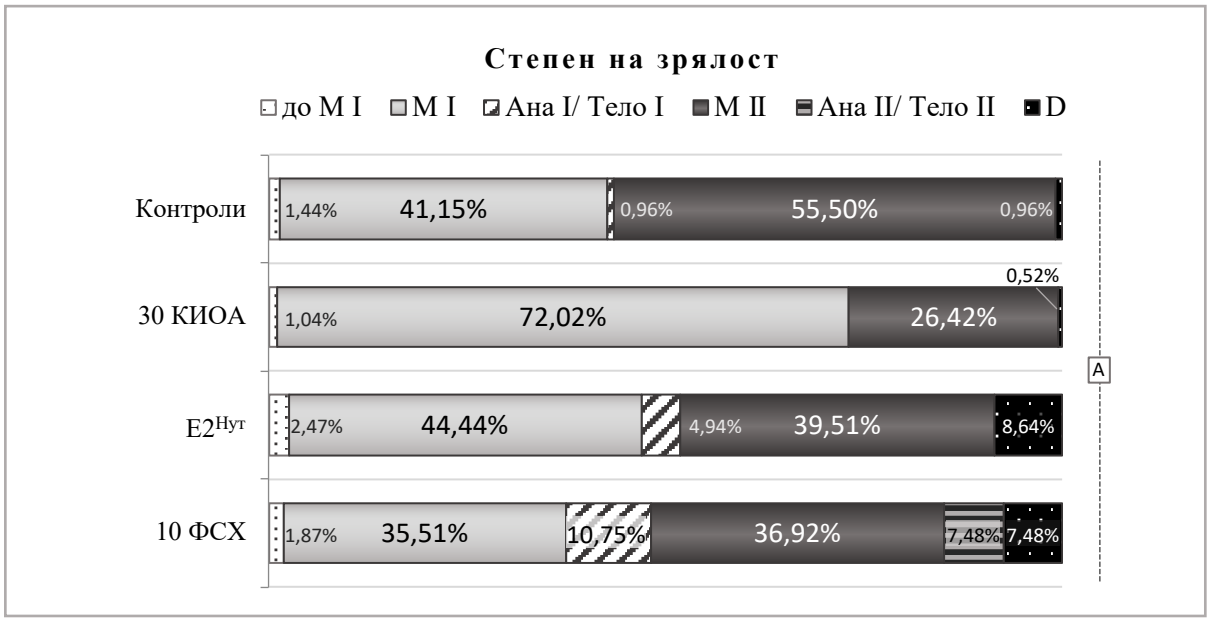
3. Статистически анализ на данните, получени за овоцитите при въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ

3.1. Сравнение на групите при некомбинирани фактори

Отделните фактори са сравнени помежду си за отчитане на индивидуалното им въздействие върху изследваните овоцитни структури. Анализирани са групите **30 КИОА**, **E2^{Нут}** и **10 ФСХ**.

3.1.1. Степен на зрялост при групите с некомбинирани фактори

Всички групи при това сравнение показват по-нисък дял зрели овоцити (M II) спрямо Контролите (55,50%), като за 30 КИОА е най-нисък с 26,42%, следвана от 10 ФСХ с 36,92% и E2^{Нут} с 39,51%. В групите E2^{Нут} и 10 ФСХ има най-висок процент на дегенерирали овоцити – съответно 8,64% и 7,48%. Установен е и значим дял преходни мейотични стадии: овоцити в Анафаза I/ Телофаза I при 10 ФСХ (10,75%) и E2^{Нут}(4,94%) и овоцити в Анафаза II/ Телофаза II - 7,48%. Наличието на стадии след Метафаза II се оказва характерно за 10 ФСХ. При всяко сравнение за степен на зрялост се откриват статистически значими разлики между групите (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001).



Фигура 14. Сравнение на степента на зрялост при некомбинираните фактори. Групите 30 КИОА, E2^{Нут} и 10 ФСХ са сравнени по категории. *A* - Сравненията на групите и всички стадии в тях показват статистически значими разлики (p_i<0,001;

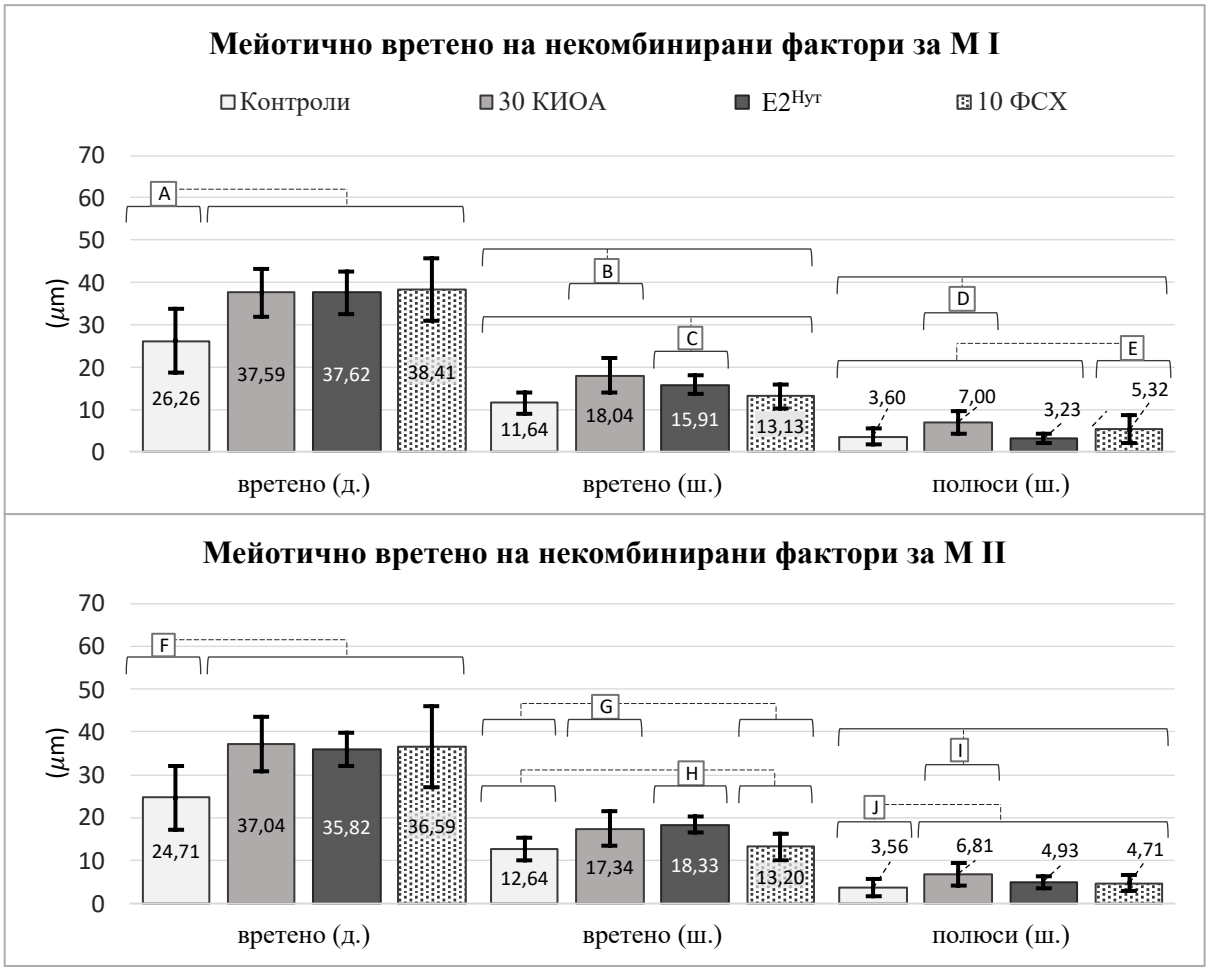
p_{Hoch}<0,001). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.1.2. Микротубулен цитоскелет при групите с некомбинирани фактори

Морфометрия на мейотичното вретено

Получена е по-голяма средноаритметична дължина за мейотичните вретена на 30 КИОА, $E2^{Нут}$ и 10 ФСХ от Контролите (26,26 μm). Стойностите за средната дължина по групи са близки за M I и M II, съответно: 30 КИОА – 37,59 μm и 37,04 μm; $E2^{Нут}$ – 37,62 μm и 35,82 μm; 10 ФСХ – 38,41 μm и 36,59 μm. Най-голяма е средната ширина на вретеното за 30 КИОА (18,04 μm) в M I, следвана от $E2^{Нут}$ с 15,91 μm и 10 ФСХ с 13,13 μm. В M II най-широки са вретената на $E2^{Нут}$ с 18,33 μm, а 30 КИОА са малко по-тесни с 17,34 μm. Най-малка средна ширина на мейотичните вретена е установена при групата 10 ФСХ, както в M I, така и в M II (13,20 μm). Средната ширина и на трите групи е по-голяма от тази на Контролите (M I – 11,64 μm; M II – 12,64 μm) и за двете фази. В M I и M II средната ширина на полюсите на вретената на 30 КИОА (съответно 7,00 μm и 6,81 μm) и 10 ФСХ (съответно 5,32 μm и 4,71 μm) е по-голяма от тази на Контролите (съответно 3,60 μm и 3,56 μm). Полюсите на вретеното за група $E2^{Нут}$ в M I са най-тесни - 3,23 μm, а в M II са 4,93 μm – по-широки от Контролите и 10 ФСХ. При анализите за статистически значима разлика по отношение на дължината е установена такава само при Контролите спрямо останалите групи - за M I и M II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Открита е значима разлика на средната ширина на вретеното в M I при 30 КИОА спрямо останалите групи (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001) и такава при $E2^{Нут}$ (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). Групата 10 ФСХ не се отличава значимо от Контролите в M I и M II, както и не се отчита разлика относно ширината при сравнението в M II между 30 КИОА и $E2^{Нут}$. По отношение на средната ширина на полюсите значима разлика има при сравненията на 30 КИОА и 10 ФСХ спрямо всяка от другите групи в M I (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01), а в M II значима е разликата на 30 КИОА и Контролите спрямо всяка

от другите групи (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). В М I средната ширина на полюсите при група E2^{Нут} не се различава значимо от Контролите, а в М II същата не се отличава спрямо 10 ФСХ.

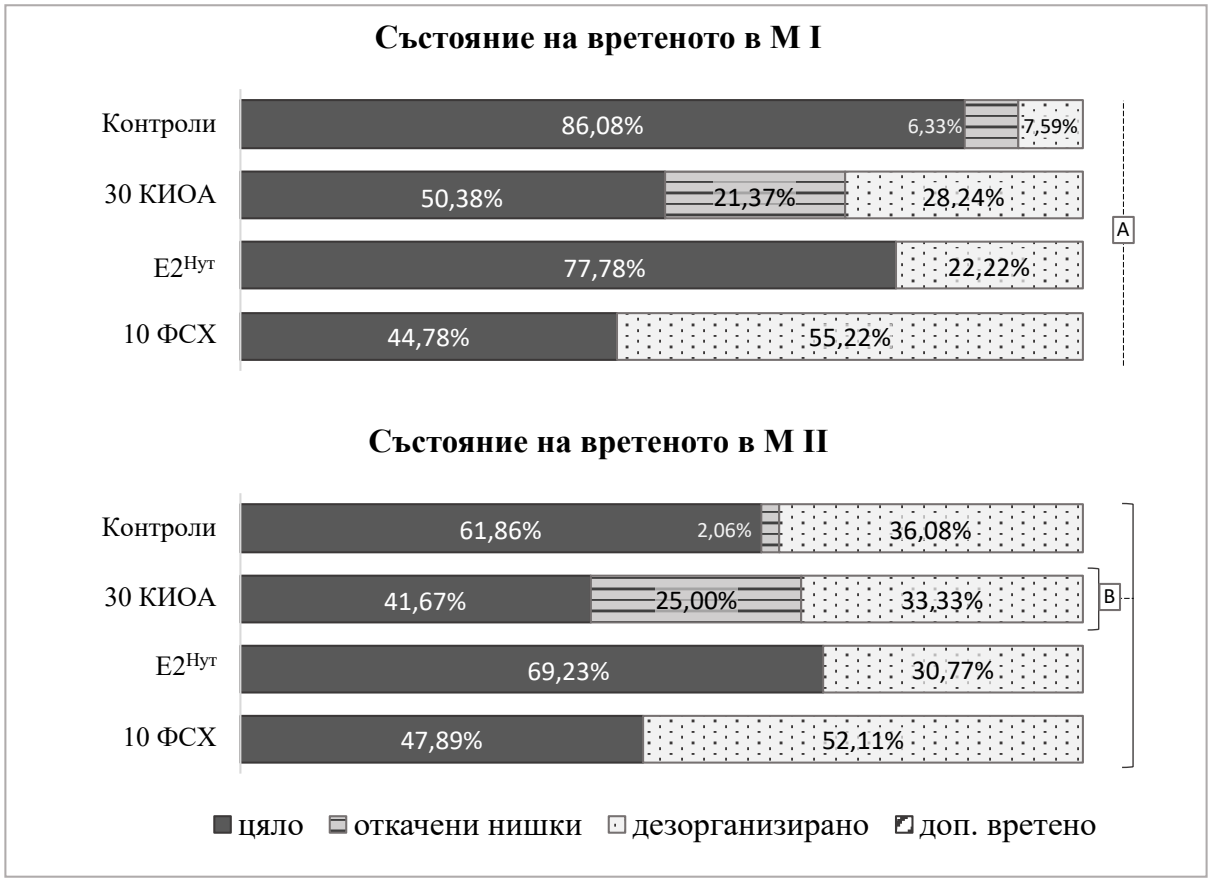


Фигура 15. Сравнение на средните стойности за дължина, ширина на мейотичното вретено и ширина на полюсите за групите с некомбинирани фактори. **М I**: Данни за мейотично вретено в Метафаза I. *A* – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *B* – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на 30 КИОА спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,05 и p_{Hoch}<0,05). *C* – сравнение на E2^{Нут} спрямо Контроли, 30 КИОА и 10 ФСХ (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). *D* – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01); 30 КИОА спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001 и p_{Hoch}<0,01). *E* – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли и 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01); 10 ФСХ спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). **М II**: Данни за мейотично вретено в Метафаза II. *F* – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *G* – сравнение на 30

КИОА спрямо Контроли и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). *H* – сравнение на E2^{Нут} спрямо Контроли и 10 ФСХ (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). *I* – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01); сравнение на 30 КИОА спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001 и p_{Hoch}<0,01). *J* – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли спрямо E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). p_i – оригинална стойност от съответния тест; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Морфологични особености на мейотичните вретена

Най-голям дял на дефекти в M I има групата 10 ФСХ с 55,22% дезорганизирани вретена, следвана от 30 КИОА с 28,24% дезорганизирани вретена и 21,37% с откачени нишки (общо 49,61%) (виж *Фигура 16*). В M II тези две групи запазват високия процент на дефекти, като стойностите за 30 КИОА (общо 58,33%) са малко по-високи от тези за 10 ФСХ (52,11%). В 30 КИОА е установено най-голямо съотношение на вретена с откачени нишки за M I (21,37%) и M II (25,00%) спрямо останалите групи. Контролите и групата E2^{Нут} са с най-високи проценти на цели вретена в M I – съответно 86,08% и 77,78%, както и в M II – съответно 61,86% и 69,23%. Статистически значима разлика в M I е открита при всички сравненията между групите (p_i <0,001 и p_{Hoch}<0,001), а в M II единствено 30 КИОА се отличава спрямо другите с p_i <0,01 и p_{Hoch}<0,05.

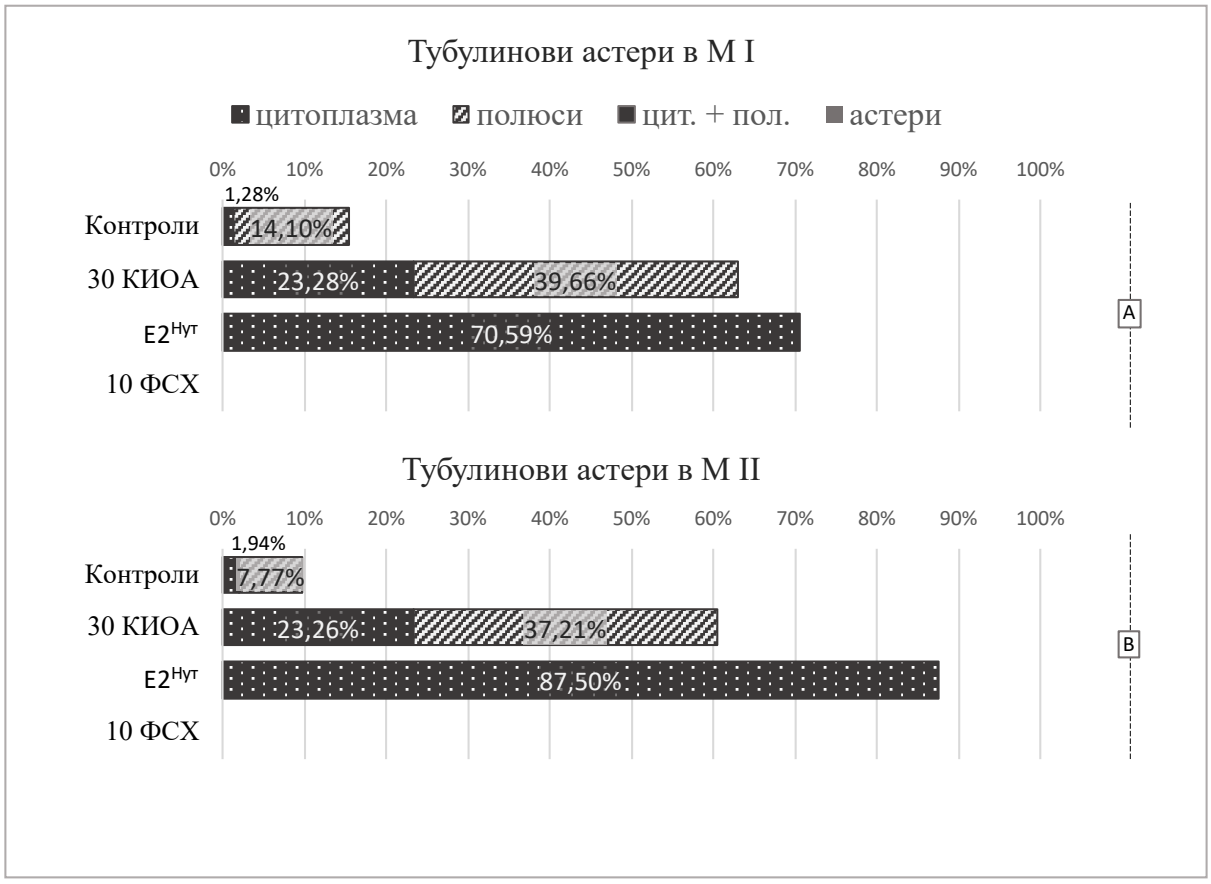


Фигура 16. Сравнение на състоянието на мейотичното вретено при некомбинирани фактори. Отгоре: Данни за мейотично вретено в M I. A – Между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдолу: Данни за мейотично вретено в M II. *B* – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли, E2^{Нут} и 10 ФСХ (всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Други тубулинови структури при групите с некомбинирани фактори

Най-висок процент на тубулинови астери е установен при групата E2^{Нут} в M I (70,59%) и в M II (87,50%), които се наблюдават едновременно в полюсите и цитоплазмата. При 30 КИОА също има голям дял на овоцити с тубулинови астери, като преобладават овоцити с астери в полюсите (M I – 39,66%; M II – 37,21%) спрямо такива с астери и в полюсите и в цитоплазмата (M I – 23,28%; M II – 23,26%). При Контролите овоцитите с астери са по-нисък процент и също преобладават овоцити с астери само в полюсите (M I – 14,10%; M II – 7,77%). В групата 10 ФСХ липсват овоцити с тубулинови астери. Установяват се

статистически значими разлики в М I и М II при сравненията между всички групи: М I – за всички p_i <0,001 и p_{Hoch}<0,001; М II - p_i <0,05 и p_{Hoch}<0,05.

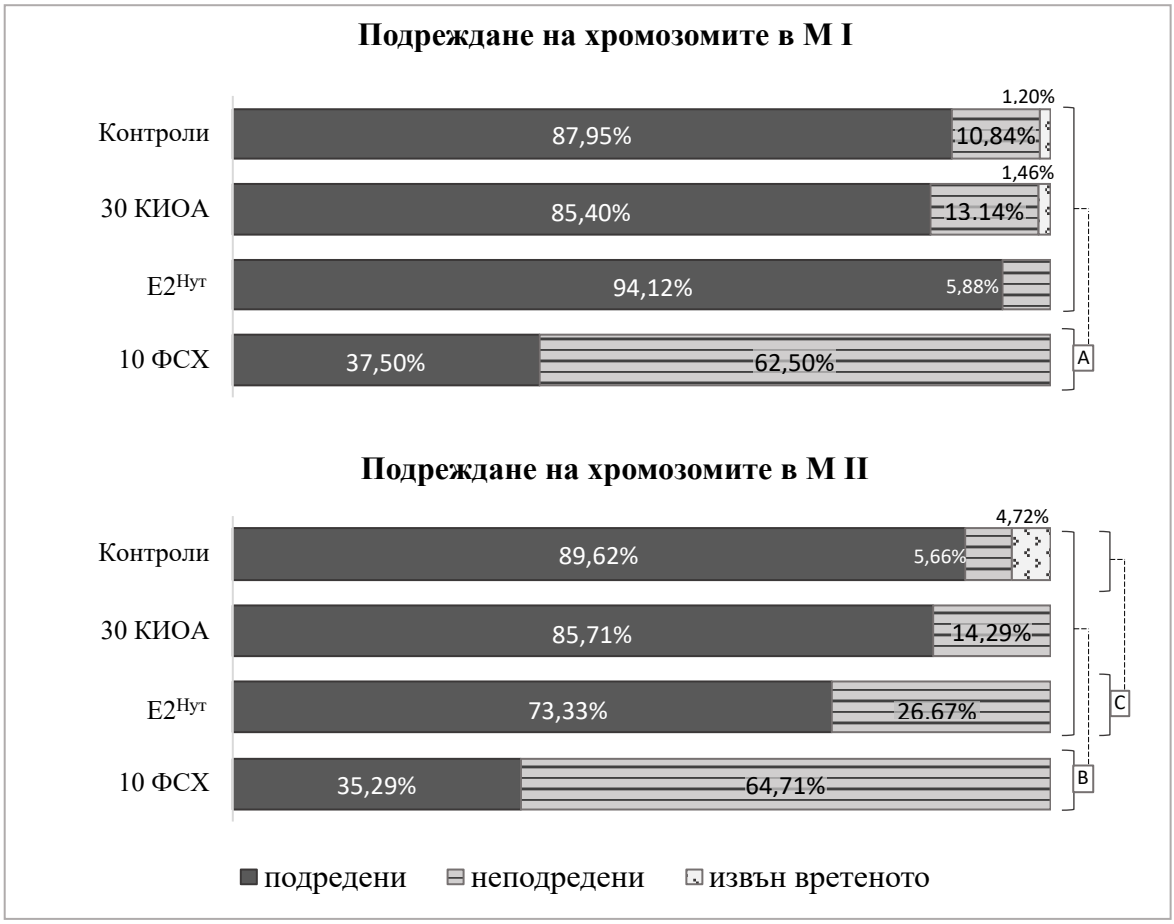


Фигура 17. Наличие на тубулинови астери при групите с некомбинирани фактори. Отгоре: микротубулни астери в М I. А – Между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдолу: микротубулни астери в М II. *В* – Между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика (p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Единствено в групата 10 ФСХ при това съпоставяне са установени овоцити с наличие на облак от деполимеризиран тубулин в областта на вретеното, чиито дял представлява 37,84% за М I и 27,03% за М II (виж *Фигури 9А* и *9В*). При другите групи не се открива такава характеристика, но тя присъства в всички групи, третирани с ФСХ. Резултатите от съпоставянето между групите с ФСХ са описани по-надолу в текста.

3.1.3. Подреждане на хромозомите във вретеното и състояние на хроматина при групите с некомбинирани фактори

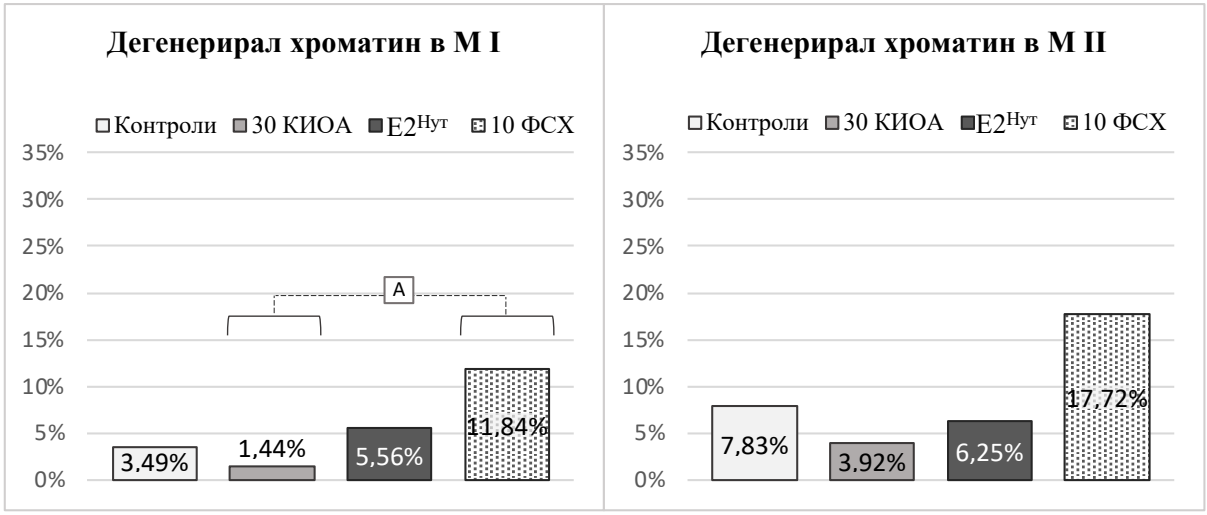
Най-голям дял на овоцити с неподредени метафазни пластинки в М I и М II са установени при групата 10 ФСХ (съответно 62,50% и 64,71%). При Е2^{Нут} в М I има по-нисък процент овоцити с неподредени хромозоми (5,88%) в сравнение с Контролите (10,84%) и 30 КИОА (13,14%), но в М II е по-висок (26,67%) за Е2^{Нут}, 5,66% за Контролите и 14,29% за 30 КИОА. Откриват се статистически значими разлики в М I и в М II при сравнението на 10 ФСХ спрямо другите групи (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Групата Е2^{Нут} се отличи значимо в М II не само от 10 ФСХ, но и от Контролите (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05).



Фигура 18. Подреждане на хромозомите в метафазното вретено при групите с некомбинирани фактори. Отгоре: подреждане на хромозомите в М I. А – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли, 30 КИОА и Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдолу: подреждане на хромозомите в М II. *В* – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли, 30 КИОА и Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). *С* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-

Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

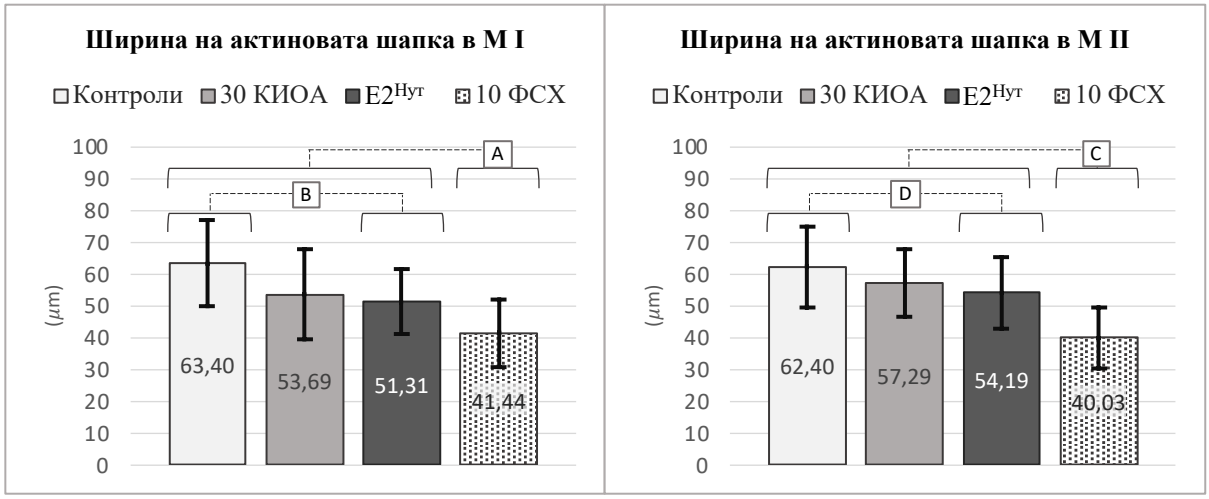
Най-висок процент на дегенерирал хроматин в М I и М II е получен за групата 10 ФСХ – съответно 11,84% и 17,72%. В М II при всички групи се наблюдава повишаване на дяла с дегенерирал хроматин в МII (Контроли – 7,83%; 30 КИОА – 3,92%; $E2^{Нут}$ – 6,25%) в сравнение със стойностите в М I (Контроли – 3,49%; 30 КИОА – 1,44%; $E2^{Нут}$ – 5,56%). Открива се единствено статистически значима разлика в М I между 10 ФСХ и 30 КИОА (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). В М II се получава значим резултат за разликите между 10 ФСХ и Контроли и между 10 ФСХ и 30 КИОА с теста на Фишър-Фрийман-Халтън – за двете p_i <0,05, но не могат да се потвърдят след прилагането на корекцията за множествени сравнения (за двете p_{Hoch}>0,05).



Фигура 19. Наличие на дегенерирал хроматин при групите с некомбинирани фактори. Отляво: дегенерирал хроматин в М I. А – сравнение на 10 ФСХ спрямо 30 КИОА (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Отдясно: дегенерирал хроматин в М II. Няма статистически значими разлики в М II. p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.1.4. Актинов цитоскелет при групите с некомбинирани фактори

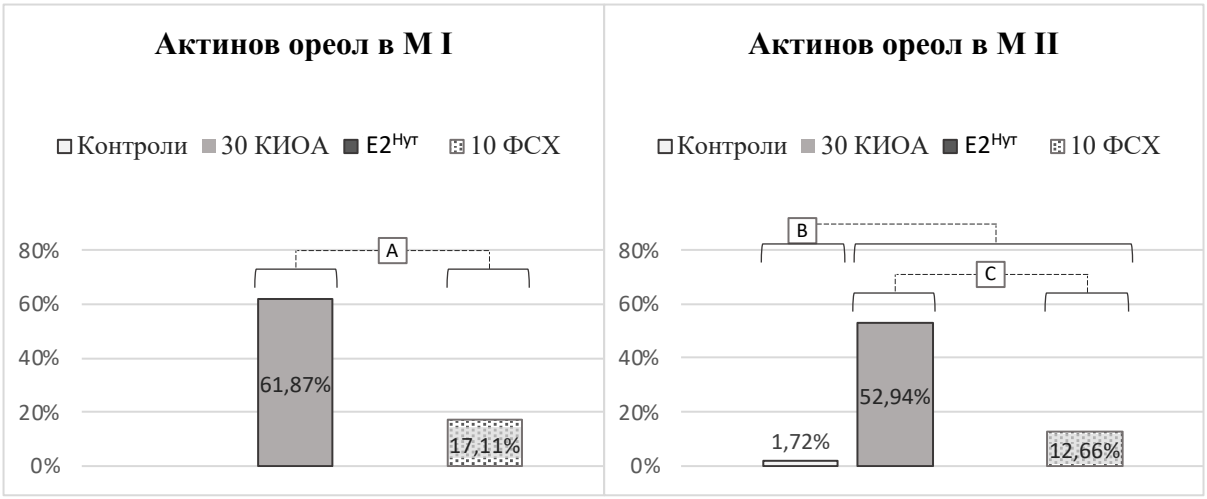
Контролите са с най-голяма средна ширина на актиновите шапки, а овоцитите от групата 10 ФСХ остават с най-ниска стойност: в М I – 63,40 μm за Контроли и 41,44 μm за 10 ФСХ, а в М II – 62,40 μm за Контроли и 40,03 μm за 10 ФСХ. Актиновите шапки на групата 30 КИОА са средностатистически по-широки от $E2^{Нут}$, както в М I – 53,69 μm за 30 КИОА и 51,31 μm за $E2^{Нут}$, така и в М II – 57,29 μm за 30 КИОА и 54,19 μm за $E2^{Нут}$. Откриват се статистически значими разлики при всички сравнения на 10 ФСХ спрямо другите групи в М I и М II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Освен със значимо различие спрямо 10 ФСХ, групата $E2^{Нут}$ се отличава и от Контролите в М I и М II (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01).



Фигура 20. Ширина на актиновата шапка при групите с некомбинирани фактори. Отляво: обща средна ширина на актиновата шапка в М I. А – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли и 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05), както и спрямо $E2^{Нут}$ (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). *B* – сравнение на $E2^{Нут}$ спрямо Контроли (*KW* и *MW*: за всички p_i<0,01; p_{Hoch}<0,01). Отдясно: обща средна ширина на актиновата шапка в М II. *C* – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли и 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05), както и спрямо $E2^{Нут}$ (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). *D* – сравнение на $E2^{Нут}$ спрямо Контроли (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). p_i – оригинална стойност от съответния тест; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

При някои от групите се установява сгъстяване на мрежата от цитоплазмен F-актин, което се визуализира в овоплазмата като актинов ореол около центъра на

овоцитите. Такъв присъства при повече от половината овоцити на групата 30 КИОА и за двете фази: М I – 61,87%, М II – 52,94%. При групата на 10 ФСХ също се установяват овоцити с актинов ореол в М I (17,11%) и М II (12,66%), но в по-ниско съотношение. В М II при групата на Контролите също има нисък процент (1,72%), а при овоцитите на $E2^{Нут}$ не се открива актинов ореол. При сравненията между 30 КИОА и 10 ФСХ има статистически значима разлика и за двете фази (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001), както и се открива такава в М II при Контролите спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05).



Фигура 21. Наличие на актинов ореол при групите с некомбинирани фактори. Отляво: наличие на актинов ореол в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА спрямо 10 ФСХ (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдясно: наличие на актинов ореол в М II. *B* – сравнение на 30 КИОА спрямо 10 ФСХ (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *C* – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.2. Сравнение при комбинирането на остеоартрит и Е2

За изследването на влиянието на остеоартрита в комбинация с Е2 са съпоставени следните пет групи: Контроли^{Нут},18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут}.

3.2.1 Степен на зрялост при комбиниране на КИОА и Е2

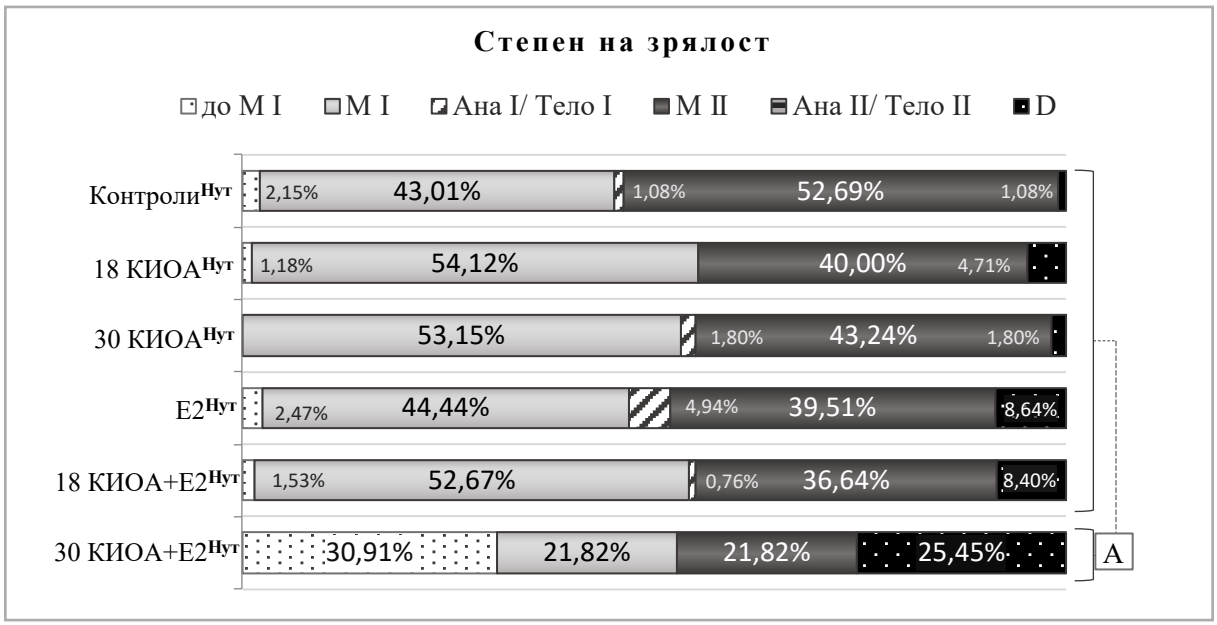
Броят на изследваните овоцити от всяка група и тяхното разпределение по стадии са представени в *Таблица 3*, а графичното сравнение на процентното съотношение между стадиите на *Фигура 22*.

Групи	Общ брой	до М I брой (%)	М I брой (%)	Ана I/Тело I брой (%)	М II брой (%)	*D* брой (%)
Контроли^{Нут}	93	2 (2,15%)	40 (43,01%)	1 (1,08%)	49 (52,69%)	0
18 КИОА^{Нут}	85	1 (1,18%)	46 (54,12%)	0	34 (40,00%)	4 (4,71%)
30 КИОА^{Нут}	111	0	59 (53,15%)	2 (1,80%)	48 (43,24%)	2 (1,80%)
Е2^{Нут}	81	2 (2,47%)	36 (44,44%)	4 (4,94%)	32 (39,51%)	7 (8,64%)
18 КИОА + Е2^{Нут}	131	2 (1,53%)	69 (52,67%)	1 (0,76%)	48 (36,64%)	11 (8,40%)
30 КИОА + Е2^{Нут}	55	17 (30,91%)	12 (21,82%)	0	12 (21,82%)	14 (25,45%)

Таблица 3. Брой и относителен дял по стадии на овоцитите, свързани с КИОА. Обяснение на използваните категории: „до М I“ – стадии *GV* /*GVBD* (по-ранни от Метафаза I); „М I“ – Метафаза I; „Ана I/Тело I“ – стадии Анафаза I или Телофаза I (след Метафаза I); „М II“ – Метафаза II; „Ана II/Тело II“ – стадии след Метафаза II (Анафаза II или Телофаза II); „*D*“ – дегенерирали овоцити.

Групите за изследване комбинацията на остеоартрит и Е2 имат по-ниска степен на зреене в сравнение с Контроли^{Нут} и процентът на М II е по-нисък в сравнение с този на М I (виж *Таблица 3* и *Фигура 22*). Тази разлика е най-силно изразена при 18 КИОА + Е2^{Нут}(М I: 52,67%; М II: 36,64%), 18 КИОА^{Нут}(М I:

54,12%; M II: 40%) и 30 КИОА^{Нут}(M I: 53,15%; M II: 43,24%). При групата 30 КИОА + Е2^{Нут} има най-малък добив на овоцити (виж *Таблица 1*) и най-голям дял на ранни стадии (30,91%) преди M I, както и наличието на повече дегенерирали овоцити (25,45%), като те надхвърлят процентно M I (21,82%) и M II (21,82%). Установени са статистически значими разлики само при сравненията на 30 КИОА + Е2^{Нут} спрямо останалите групи (за всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01).



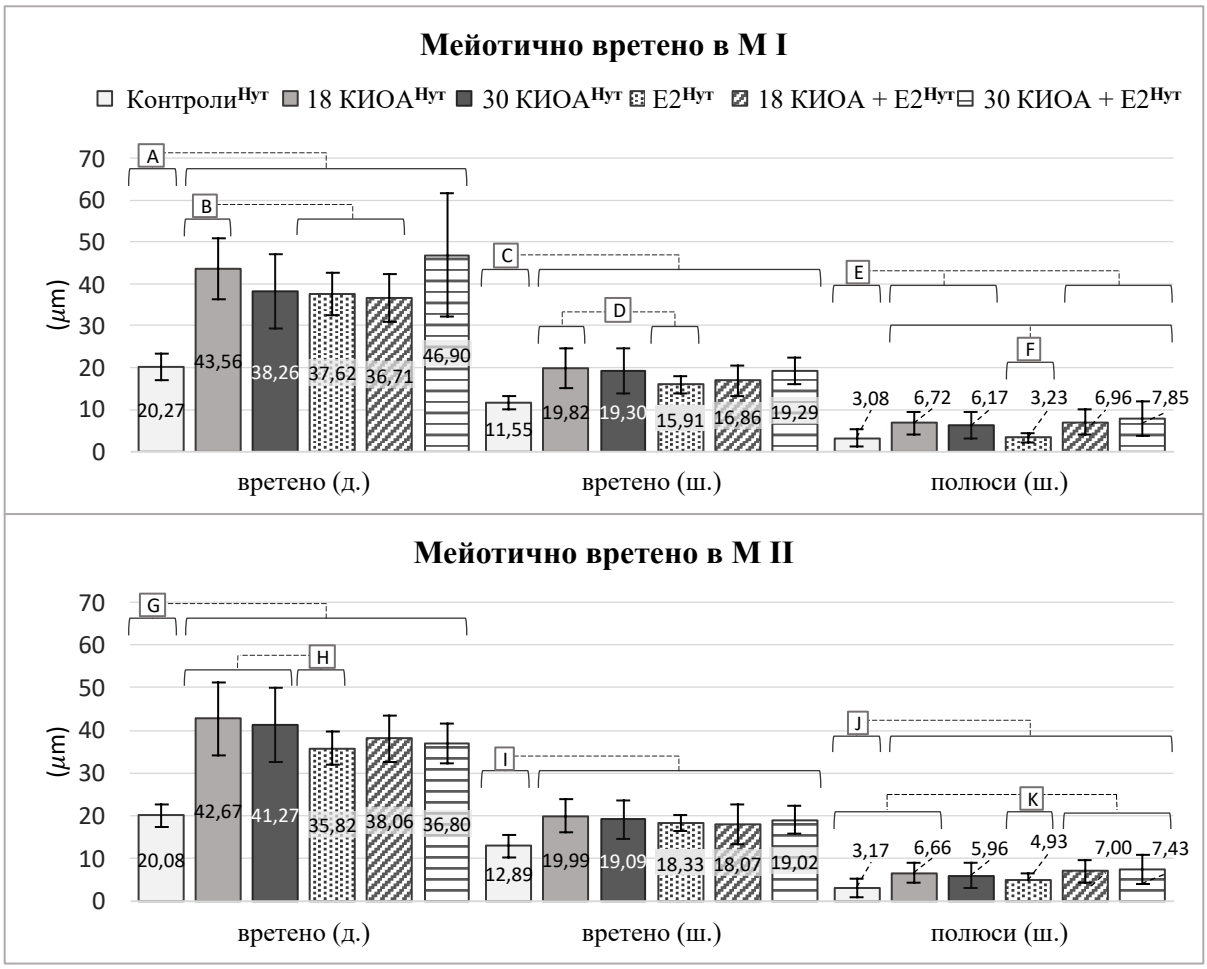
Фигура 22. Сравнение на съотношението по стадии при комбиниране на остеоартрит и Е2. Представени са групите от *Таблица 3*, сравнени по категории. *A* – сравнение на 30 КИОА + Е2^{Нут} с останалите групи (всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.2.2. Микротубулен цитоскелет при изследване на комбинацията на остеоартрит и Е2

Морфометрия на мейотичното вретено

Групите при това съпоставяне имат по-големи мейотични вретена спрямо Контроли^{Нут} в М I и М II. Комбинацията на 30 – дневен остеоартрит с естрадиол показа най-високи средноаритметични стойности в М I за дължината на вретеното и ширината на полюсите (46,90 μm и 7,85 μm), следваната от групата с 18 – дневен остеоартрит, която се отличи с най – широките вретена (виж *Фигура 23*). Овоцитите в М II при 18 КИОА^{Нут} са с най-голяма средна стойност за дължина и ширина (42,67 μm и 19,99 μm), а при 30 КИОА^{Нут} се нареждат втори (съответно с 41,27 μm и 19,09 μm). Най-голяма промяна в М II спрямо М I се забеляза при дължината във вретеното на 30 КИОА + Е2^{Нут}(М II: 36,80 μm), но остават с най-широките полюси (7,43 μm). Групите с естрадиол са с по-ниски средни стойности в М II от 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут}. От данните за овоцитите на Е2^{Нут} се калкулират най-ниските стойности в М II, а ширината на полюсите им се доближава най-много до Контроли^{Нут}, както в М I, така и в М II. Статистически значими разлики по отношение на средните стойности за дължина и ширина на мейотичното вретено има при Контроли^{Нут} спрямо останалите групи, както в М I , така и в М II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Също така групата 18 КИОА^{Нут} се отличи в М I по средна дължина на вретено спрямо Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05) и 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05). В М II групата Е2^{Нут}, освен от Контроли^{Нут}, се различи статистически по средна дължина спрямо 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). При групата Е2^{Нут} в М I се открива значима разлика за средната ширина на вретеното спрямо 18 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). По отношение на средната ширина на полюсите в М I има значима разлика на Контроли^{Нут} спрямо всички без групата Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001), както и при Е2^{Нут} спрямо групите с остеоартрит (*KW* и *MW*: за всички

p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). В М II значима разлика по отношение на полюсите има при Контролите спрямо всички групи (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001; *KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001), както и при Е2^{Нут} спрямо всички без групата 30 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01).



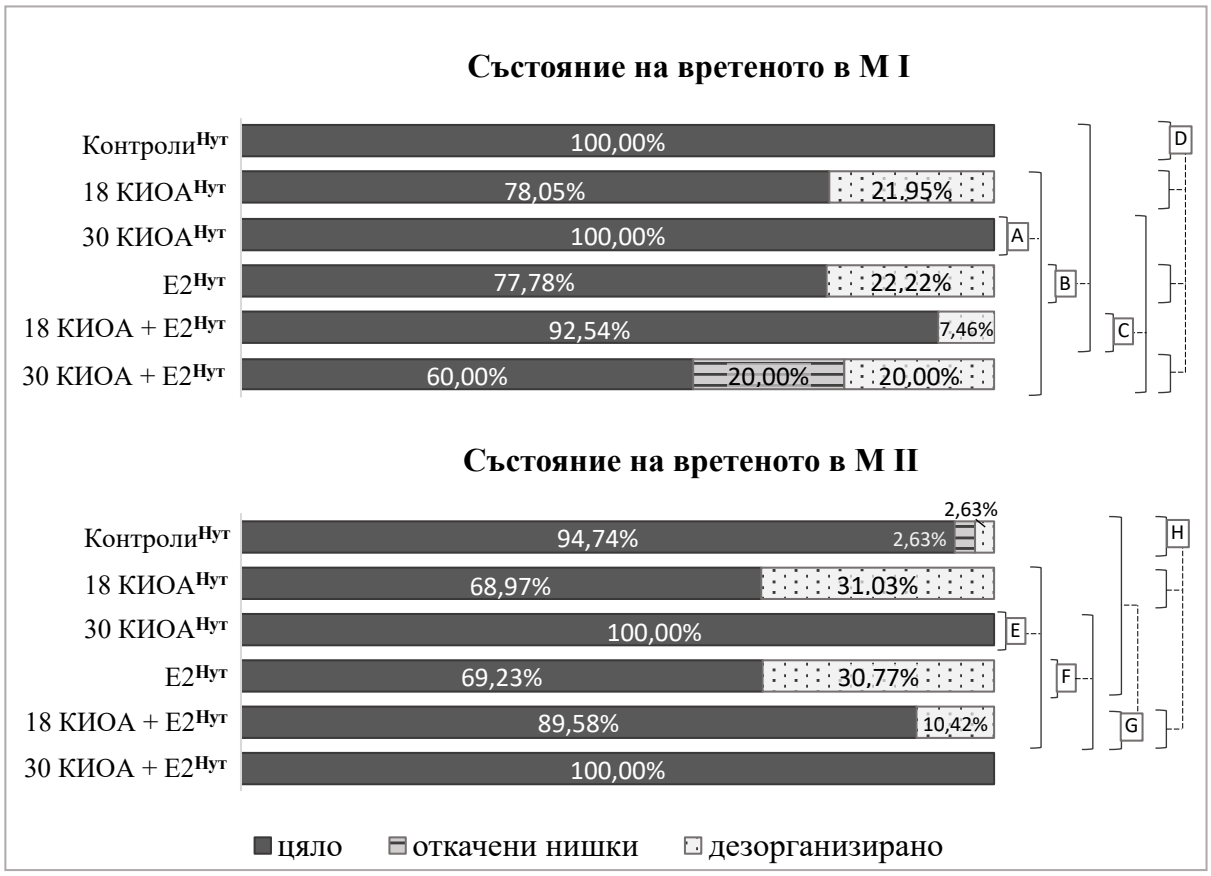
Фигура 23. Сравнение на средните стойности за дължина, ширина и ширина на полюси на мейотичното вретено при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. *A* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *B* – сравнение на 18 КИОА^{Нут} спрямо Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05) и 18 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). *C* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *D* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). *E* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *F* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут},

18 КИОА + Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. *G* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *H* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). *I* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *J* – сравнение на Контроли спрямо 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *K* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – оригинална стойност от съответния тест; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Морфологични особености на мейотичните вретена

Най-голям дял на цели вретена без дефекти в М I са отчетени при Контроли^{Нут} (100%) и 30 КИОА^{Нут} (100%), като в М II при 30 КИОА^{Нут} (100%) няма промяна, а при Контроли^{Нут} стойността остава близка (94,74%). При комбинацията от 30 КИОА и Е2 се получава най-голям общ процент (40%) на дефектни вретената в М I – 20% с откачени нишки и 20% с дезорганизирани вретена за сметка на интактните (60%), а в М II при тази група не се установяват дефектни вретена. Висок процент вретена без дефекти в М I и М II (92,54% и 89,58%) показва групата на 18 КИОА + Е2^{Нут}. Групите 18 КИОА^{Нут} и Е2^{Нут} са с по-малко интактни (78,05% и 77,78%) и повече дезорганизирани вретена (21,95% и 22,22%) от Контроли^{Нут} в М I и М II. При провеждането на точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън (p_i) и прилагането на корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг (p_{Hoch}) групата 30 КИОА^{Нут} в М I се отличава спрямо всички останали групи без Контроли^{Нут} (за всички сравнения: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05), а в М II не може да се установи значима разлика само с Контроли^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (сравнения с останалите групи: p_i < 0,05; p_{Hoch} < 0,05). Въпреки пропорционлните прилики между Е2^{Нут} и 18 КИОА ^{Нут} между тях в М I се открива статистически значима разлика (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). Групата, която комбинира двата фактора (18 КИОА + Е2^{Нут}) се откроява от индивидуалния ефект на естрадиола в Е2^{Нут} при М I и М II

(и за двата стадия: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01), а от 18 КИОА^{Нут} само в М II (: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). И в двата стадия има статистически значими различия между Е2^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01), но при сравнението на Е2^{Нут} с 30 КИОА + Е2^{Нут} такива не са установени. Групата Контроли^{Нут} се отличават със значима разлика спрямо 18 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} в М I (за всички сравнения: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05), а в М II спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за двете сравнения: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001).

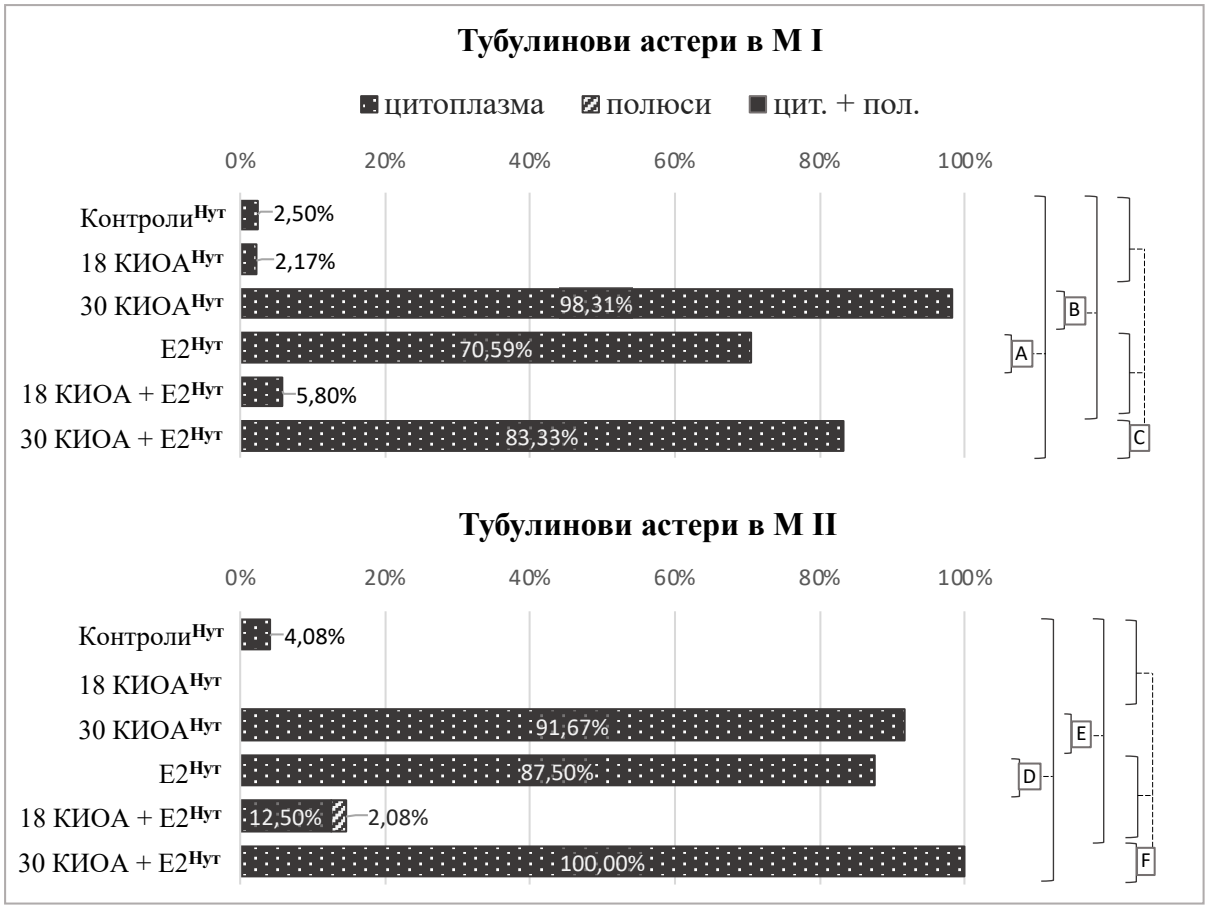


Фигура 24. Сравнение на състоянието на мейотичното вретено при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. А – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо всяка от останалите групи без Контроли^{Нут} (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). *B* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). *C* – сравнение на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо 30 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут}, 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01) *D* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут}. Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. Е – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). *F* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо 30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). *G* – сравнение на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут},

30 КИОА^{Нут} и Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). *G* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Други тубулинови структури

Установява се наличието на тубулинови астери в различна степен при различните групи от това съпоставяне (виж *Фигура 25*). Най-голям дял на овоцити в М I с тубулинови астери в цитоплазмата са отчетени при 30 КИОА^{Нут} (98,31%), като нивото им е високо и в М II (91,31%). Във всички овоцити на 30 КИОА + Е2^{Нут} в М II има такива астери, а в М I групата остава на второ място с 83,33% след 30 КИОА^{Нут} . В групата Е2^{Нут} също се установяват високи проценти на астери в М I (70,59 %) и повече в М II (87,50 %). В групите 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} има по-ниски проценти на астери в М I (съответно 2,17% и 5,80%), като в М II те липсват при 18 КИОА^{Нут}, а при 18 КИОА + Е2^{Нут} дялът е 14,58%. При групата Контроли^{Нут} дялът на овоцити с тубулинови астери остава нисък (М I – 2,50%; М II – 4,08%) Открива се статистически значима разлика при 30 КИОА^{Нут} в М I и М II спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). В М I и М II има разлика при Е2^{Нут} спрямо другите групи (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05), както и при 30 КИОА + Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001).

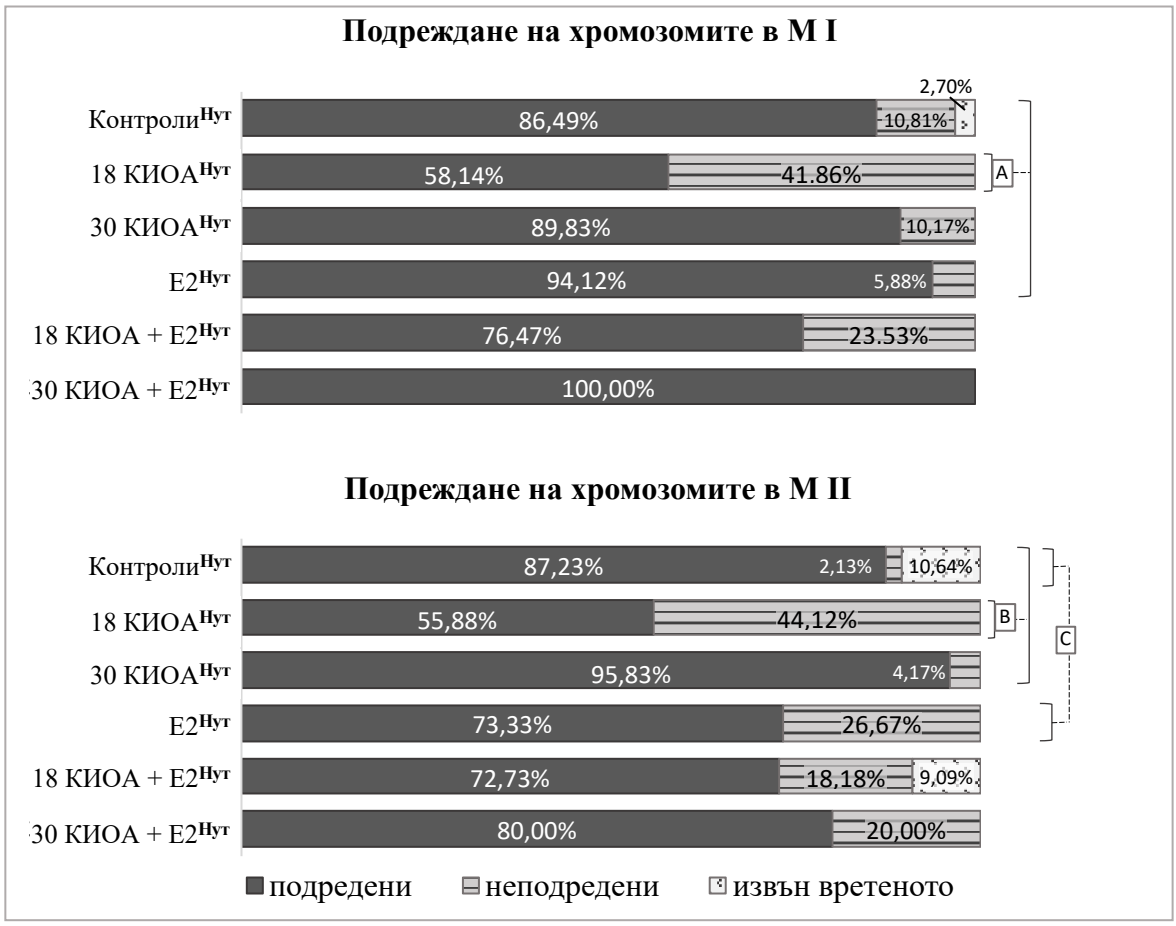


Фигура 25. Наличие на тубулинови астери в овоплазмата при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отгоре: микротубулни астери в М I. *A* – сравнение на $E2^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $30\ КИОА^{Нут}$, $18\ КИОА + E2^{Нут}$ и $30\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *B* – сравнение на $30\ КИОА^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $E2^{Нут}$ и $18\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *C* – сравнение на $30\ КИОА + E2^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $E2^{Нут}$, $18\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдолу: микротубулни астери в М II. *D* – сравнение на $E2^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $30\ КИОА^{Нут}$, $18\ КИОА + E2^{Нут}$ и $30\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *E* – сравнение на $30\ КИОА^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $E2^{Нут}$ и $18\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *F* – сравнение на $30\ КИОА + E2^{Нут}$ спрямо $Контроли^{Нут}$, $18\ КИОА^{Нут}$, $E2^{Нут}$, $18\ КИОА + E2^{Нут}$ (за всички p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

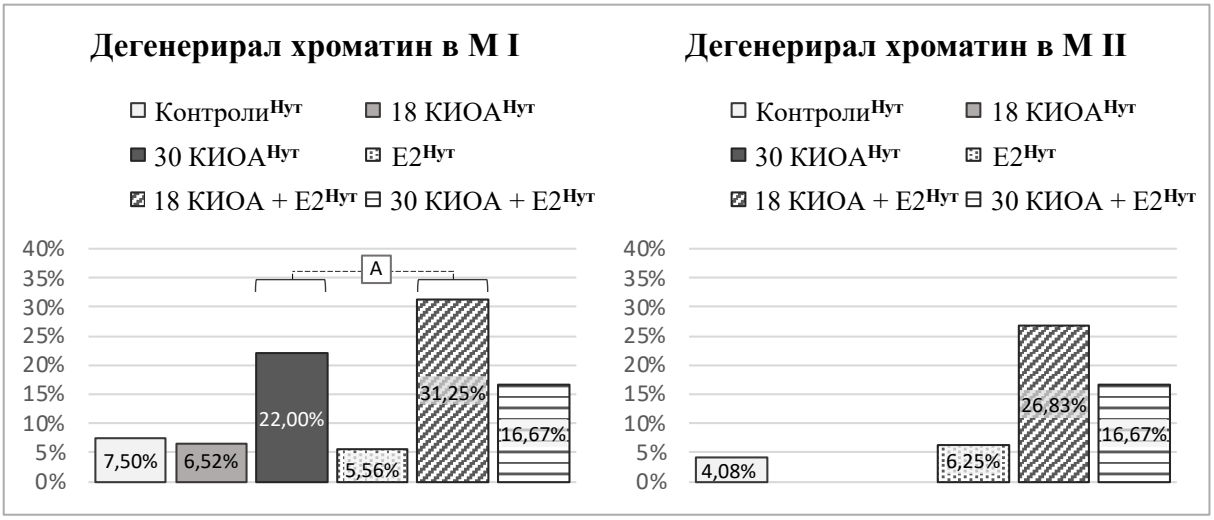
3.2.3. Подреждане на хромозомите във вретеното и състояние на хроматина при изследване на комбинацията на КИОА и Е2

Най-много овоцити с неподредени хромозоми в М I (виж *Фигура 26*) се установяват при 18 КИОА^{Нут} (41,86%), като тази тенденция се запазва и в М II (44,12%). Овоцитите от групата на 18 КИОА + Е2^{Нут} също имат по-малко подредени метафазни пластинки от останалите групи в М I (неподредени хромозоми 23,53%) и в М II (неподредени хромозоми 18,18% и извън вретеното 9,09%). Групите 30 КИОА^{Нут}, Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} показват по-висок процент подредени хромозоми от Контроли^{Нут} (86,49%) в М I (съответно 89,83%, 94,12% и 100%), а в М II групите Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} се характеризират с по-голям дял неподредени пластинки (съответно 26,67% и 20%). Само при Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} процентът на неподредените хромозоми се задържа нисък както в М I (съответно 13,51 % и 10,17%), така и в М II (съответно 12,77% и 4,17%). Статистически значима разлика в М I се открива при 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 30 КИОА и Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05), а в М II при 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05) и при Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05).

Дялът на овоцити с дегенерирал хроматин (виж *Фигура 27*) е най-висок при групата 18 КИОА + Е2^{Нут} в М I и М II (съответно 31,25% и 26,83%). При 30 КИОА^{Нут} овоцитите са с висок процент в М I (22%), но не са установени овоцити с дегенерирал хроматин от същата група в М II. За разлика от 18 КИОА + Е2^{Нут} групите 18 КИОА^{Нут} и Е2^{Нут} са със значително по-ниски стойности в М I (съответно 6,52% и 5,56%), като тенденцията при Е2^{Нут} се запазва в М II, а в тази фаза при 18 КИОА^{Нут} в тази фаза не се наблюдава дегенерирал хроматин. Групата 30 КИОА + Е2^{Нут} показва еднакъв дял на дегенерирал хроматин (16,67%) както в М I, така и в М II. Групата 30 КИОА^{Нут} се отличава в М I със значима разлика спрямо 18 КИОА + Е2^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут}. Въпреки процентните разлики, след прилагането на корекция върху резултатите от теста за статистическа значимост не се установяват други статистически значими разлики.



Фигура 26. Подреждане на хромозомите в метафазното вретено при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отгоре: подреждане на хромозомите в М I. А – сравнение на 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 30 КИОА и Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05). Отдолу: подреждане на хромозомите в М II. *В* – сравнение на 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 30 КИОА и Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05). *С* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

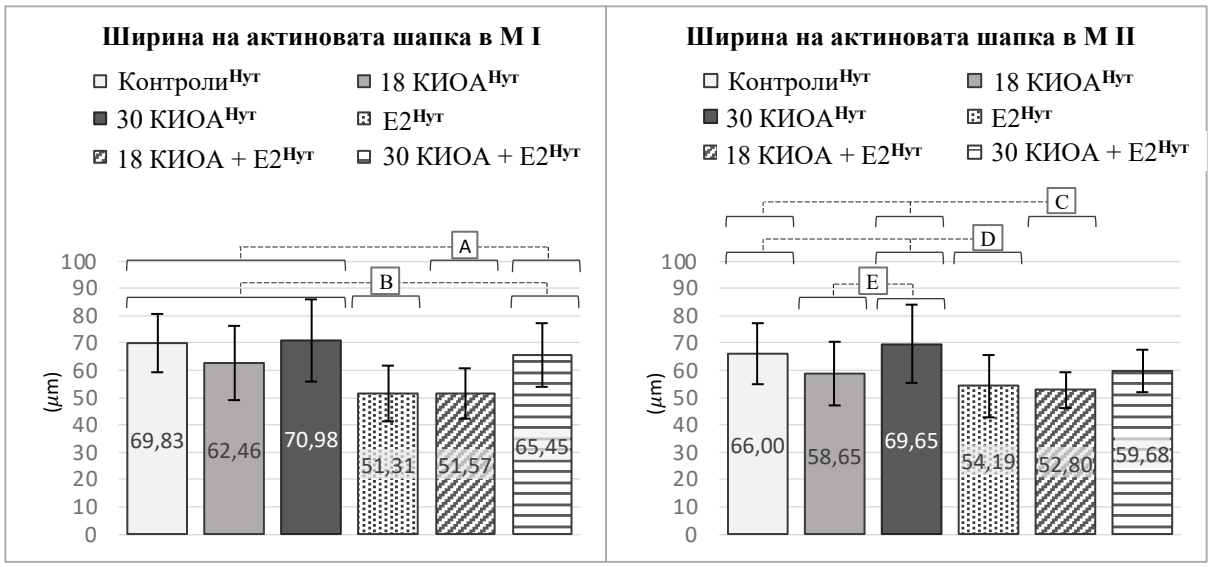


Фигура 27. Наличие на дегенерирал хроматин в овоцитите при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отгоре: дегенерирал хроматин в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА + Е2^{Нут} (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Отдолу: дегенерирал хроматин в М II. Не са установени статистически значими разлики в М II. p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.2.4. Актинов цитоскелет при изследване на комбинацията на КИОА и Е2

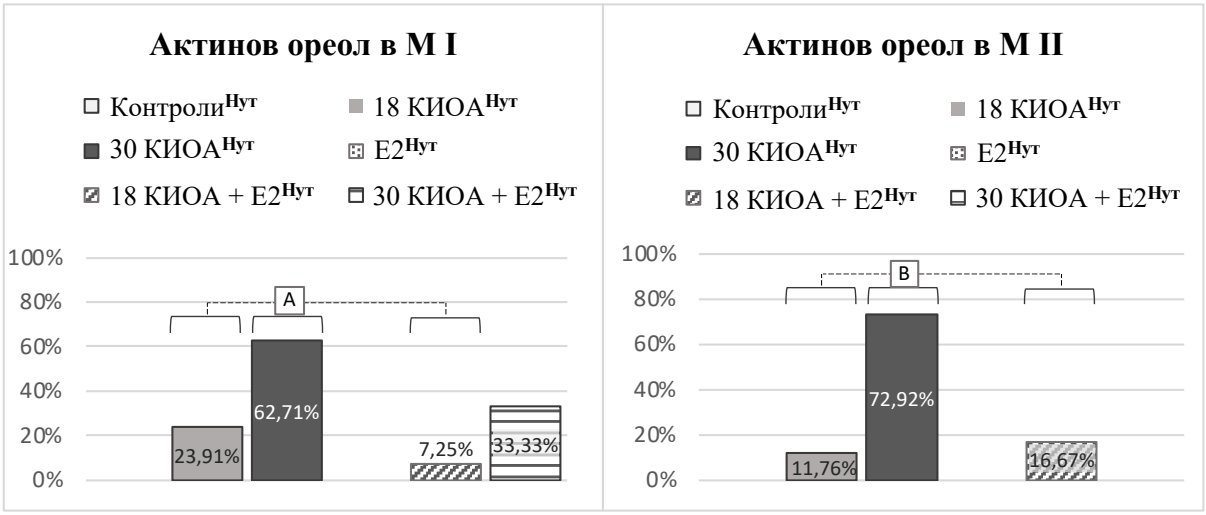
Най-голяма обща средна ширина на актиновата шапка е открита при групата 30 КИОА^{Нут}, както в М I (70,98 μm), така и в М II (69,65 μm). При групите Е2^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} стойностите остават най-ниски: в М I за Е2^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} е измерена средна ширина на шапката съответно 51,31 μm и 51,57 μm, а в М II за Е2^{Нут} е 54,19 μm и 52,80 μm за 18 КИОА + Е2^{Нут}. Размерите на шапката при групите 18 КИОА^{Нут} (М *I* – 62,46 μm; М II – 58,65 μm) и 30 КИОА + Е2^{Нут} (М *I* – 65,45 μm; М II – 59,68 μm) са по-ниски от тези на Контроли^{Нут} (М *I* – 69,83 μm; М II – 66 μm). Установена е статистически значима разлика на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001; *KW* и *MW*: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001), а в М II на същата група спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). Също така в М I значимо се откроява Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05) и в М II само спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). В М II е

изчислена значима разлика и между 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: p_i <0,05).



Фигура 28. Ширина на актиновата шапка при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отляво: обща средна ширина на актиновата шапка в М I. *A* – сравнение на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); сравнение на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01). *B* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 30 КИОА + Е2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Отдясно: обща средна ширина на актиновата шапка в М II. *C* – сравнение на 18 КИОА + Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). *D* – сравнение на Е2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). *E* – сравнение на 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). p_i – оригинална стойност от съответния тест; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Най-висок процент на овоцити с актинов ореол са открити в групата на 30 КИОА^{Нут} (М I: 62,71%; М II: 72,92%). При групите 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} също има овоцити с актинов ореол в М I (съответно 23,91% и 7,25%) и М II (съответно 11,76% и 16,67%). В М I групата 30 КИОА + Е2^{Нут} е на второ място с 33,33 %, а в М II при нея не се наблюдава актинов ореол. При групите Контроли^{Нут} и Е2^{Нут} такива не се наблюдават нито в М I, нито в М II. В М I и М II е открита статистически значима разлика при 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001).



Фигура 29. Наличие на актинов ореол в овоцити при комбиниране на остеоартрит и Е2. Отляво: наличие на актинов ореол в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Отдясно: наличие на актинов ореол в М II. *B* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + Е2^{Нут} (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.3. Сравнение при комбинирането на остеоартрит и ФСХ

3.3.1. Степен на зрялост при комбиниране на КИОА и ФСХ

За изследването на влиянието на остеоартрита в комбинация с ФСХ са съпоставени следните три групи: 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА.

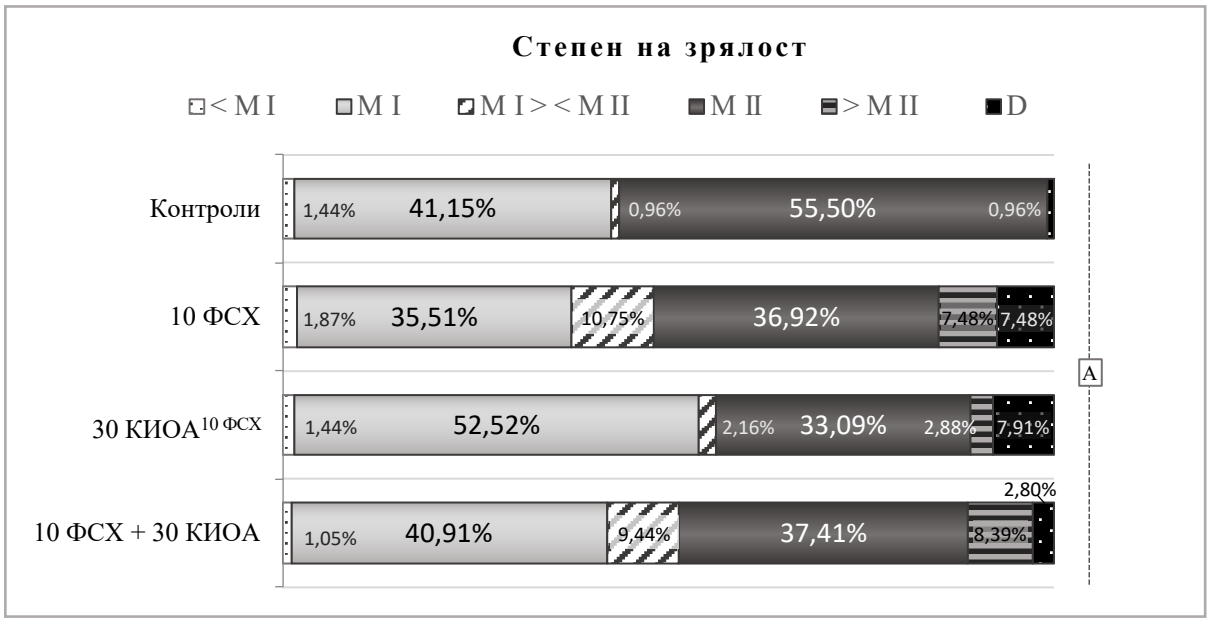
Броят на изследваните овоцити от всяка група и тяхното разпределение по стадии са представени в *Таблица 4*, а графичното сравнение на процентното съотношение между стадиите на *Фигура 30*.

Групи	Общ брой	до М I брой (%)	М I брой (%)	Ана I/Тело I брой (%)	М II брой (%)	Ана II/Тело II брой (%)	*D* брой (%)
10 ФСХ	214	4 (1,87%)	76 (35,51%)	23 (10,75%)	79 (36,92%)	16 (7,48%)	16 (7,48%)
30 КИОА$^{10\ ФСХ}$	139	2 (1,44%)	73 (52,52%)	3 (2,16%)	46 (33,09%)	4 (2,88%)	11 (7,91%)
10 ФСХ + 30 КИОА	286	3 (1,05%)	117 (40,91%)	27 (9,44%)	107 (37,41%)	24 (8,39%)	8 (2,80%)

Таблица 4. Брой и относителен дял на по стадии при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Категории: „до М I“ – стадии *GV* или *GVBD* (по-ранни от Метафаза I); „М I“ – Метафаза I; „Ана I/Тело I“ – стадии Анафаза I или Телофаза I (след Метафаза I); „М II“ – Метафаза II; „Ана II/Тело II“ – стадии след Метафаза II (Анафаза II, Телофаза II); „*D*“ – дегенерирали овоцити.

Всички групи от клъстъра ФСХ показват по-нисък дял на узрели овоцити в М II от Контролите (55,50 %). В групата 10 ФСХ са установени 36,92%, за 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ те са 33,09 %, а за 10 ФСХ + 30 КИОА – 37,41 %. Най-голям дял на овоцити в М I има при групата 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ с 52,52% за разлика от 10 ФСХ (35,51%) и 10 ФСХ + 30 КИОА (40,91%). Открит е висок процент спрямо Контролите на овоцити в А I и Т I за групите 10 ФСХ (10,75%) и 10 ФСХ + 30 КИОА (9,44%). Единствено при групите с ФСХ са установени овоцити, които са продължили след М II (А II или Т II), като за 10 ФСХ те са 7,48%, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ с 2,88% и 10 ФСХ + 30 КИОА с 8,39%. Най-нисък процент дегенерирали овоцити има при 10 ФСХ + 30 КИОА с 2,80%, а 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ съответно с 7,48%

и 7,91%. Всички групи с ФСХ показват статистически значима разлика по отношение на степента на узряване както спрямо Контролите, така и помежду им (p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05).



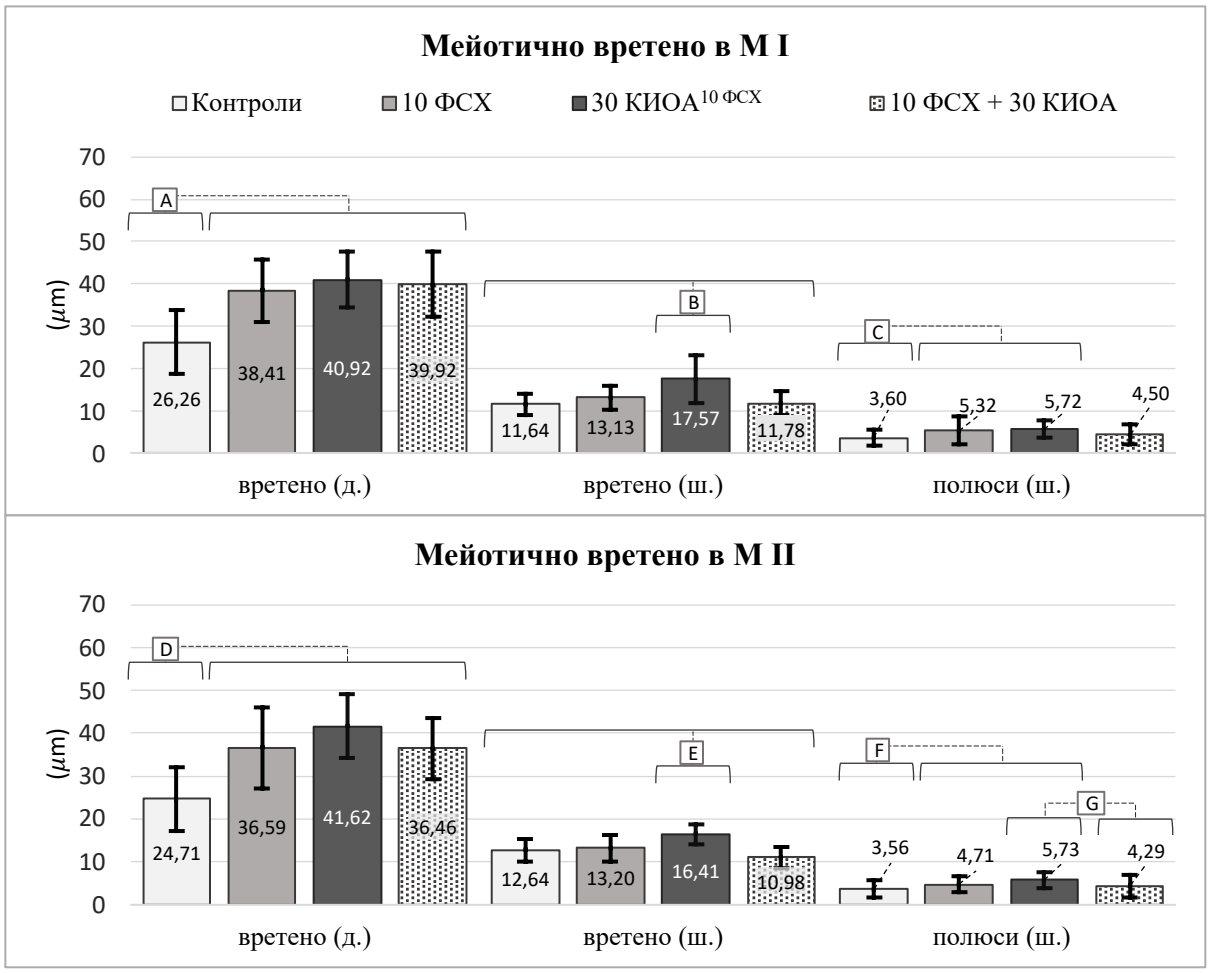
Фигура 30. Сравнение на съотношението по стадии при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Представени са групите от *Таблица 4*, сравнени по категории. А – между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика (p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.3.2. Микротубулен цитоскелет при изследване на комбинацията на остеоартрит и ФСХ

Морфометрия на мейотичното вретено

В групите с ФСХ са измерени по-високи средноаритметични стойности от Контролите за дължина и ширина на мейотичните вретена, както и ширина на полюсите им (виж *Фигура 31*). Най-големи средни стойности са получени при групата 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ за M I и M II, като средната дължина на вретеното е съответно 40,92 μm и 41,62 μm, средна ширина на вретеното – 17,57 μm и 16,41 μm, и за средна ширина на полюсите – 5,72 μm и 5,73 μm. Средните стойности за дължина на вретената между групите 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА остават сравнително близки до тези на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ в M I (съответно 38,41 μm и 39,92

μm), но за М II се установява леко понижение – 36,59 μm и 36,46 μm. При средните стойности за ширината на вретеното и полюсите му групата 10 ФСХ има малък превес с 13,13 μm спрямо 10 ФСХ + 30 КИОА (11,78 μm) за М I, както и за М II с 13,20 μm (съответно при 10 ФСХ + 30 КИОА – 10,98 μm). Средната ширина на полюсите запазва подобна тенденция между двете групи: при М I – 5,32 μm за 10 ФСХ и 4,50 μm за 10 ФСХ + 30 КИОА; М II – 4,71 μm за 10 ФСХ и 4,29 μm за 10 ФСХ + 30 КИОА. Групите от клъстъра ФСХ се отличават значимо по средна дължина от Контролите в М I и М II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001).



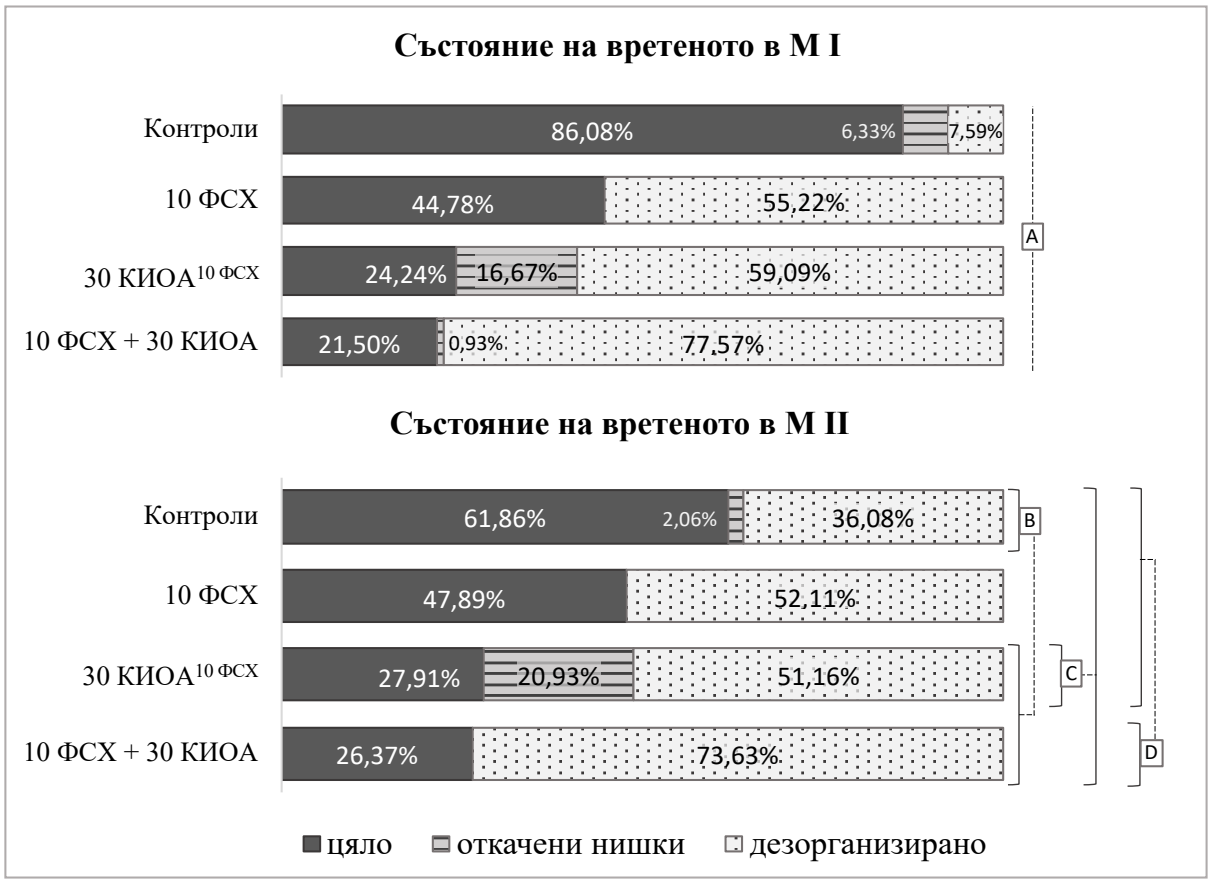
Фигура 31. Сравнение на средните стойности за дължина, ширина и ширина на полюси на мейотичното вретено при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. *A* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); *B* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо Контроли, 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05); *C* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01). Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. *D* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10

ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001); *E* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо Контроли, 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01); *F* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01); *G* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05). p_i – оригинална стойност от съответния тест.

Статистически значима разлика по отношение на ширината на вретеното е получена само за 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо Контролите и другите групи от клъстъра ФСХ, като такава има за М I и М II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,05). Разлика със значимост при средната ширина на полюсите е открита при 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо Контролите в М I и М II (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,01), също така и при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: p_i <0,05).

Морфологични особености на мейотичните вретена

При групите, третирани с ФСХ се установяват повече дефекти на мейотичните вретена, отколкото в Контролите (виж *Фигура 32*). Най-голям дял на дезорганизирани вретена е открит при овоцитите на групата 10 ФСХ + 30 КИОА в М I (77,57%) и М II (73,63%).



Фигура 32. Сравнение на състоянието на мейотичното вретено при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. *A* – между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. *B* – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). *C* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо останалите групи (всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *D* – 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо останалите групи (всички: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

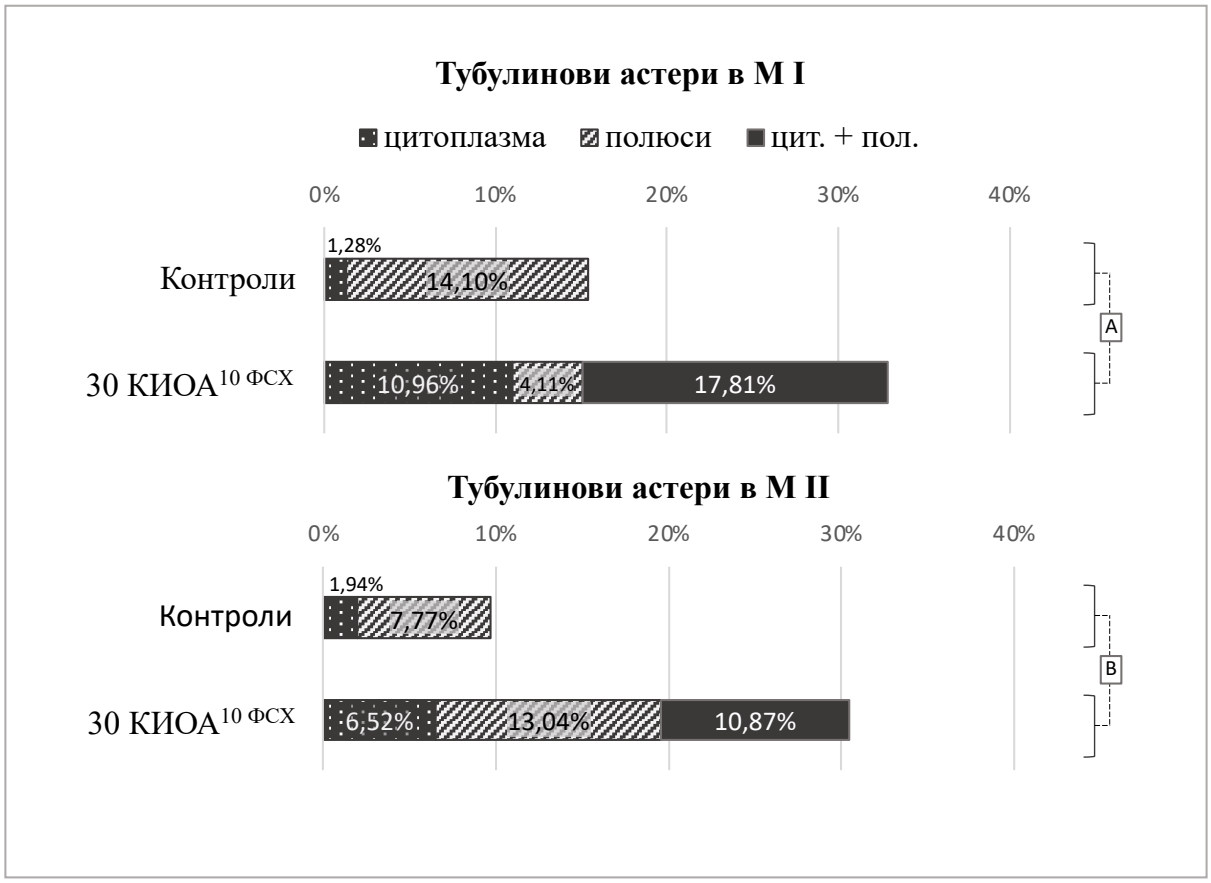
Дезорганизираните вретена при 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ са сравнително близки в процетно отношение при М I (съответно 55,22% и 59,09%) и с по-малка разлика при М II (съответно 52,11% и 51,16%). При 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ има наличие на по-голям процент вретена с откачени нишки в М I (16,67%) и М II (20,93%) и също така по-малък дял на интактните вретена спрямо 10 ФСХ (М I – 44,78%; М II – 47,89%): в М I – 24,24% и М II – 27,91%. Открита е статистически значима разлика при всички сравнения между групите с ФСХ заедно с Контролите в М I (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,01). В М II не е установена значима разлика само при сравнението

между Контролите и 10 ФСХ, но за всички останали тя е потвърдена с p_i <0,05 и p_{Hoch}<0,05.

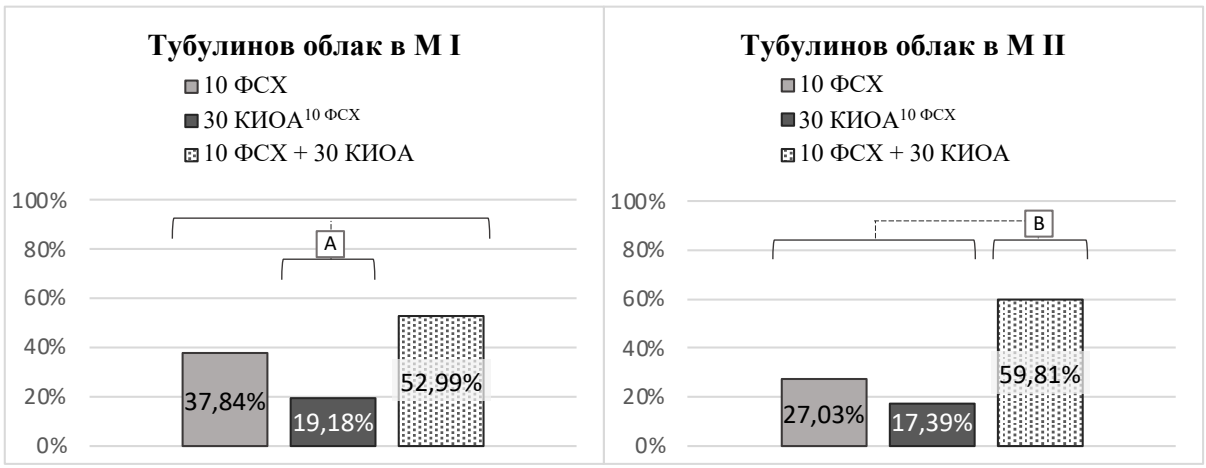
Други тубулинови структури

Микротубулни астери се наблюдават само в овоцитите на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (виж *Фигура 33*), като имат следното разпределение: М I – 10,96% в цитоплазмата (при Контроли: 1,28%), 4,11% в полюсите на вретеното (при Контроли: 14,10%) и 17,81% и на двете места; М II – 6,52% в цитоплазмата (при Контроли: 1,94%), 13,04% в полюсите (при Контроли: 7,77%) и 10,87% и на двете места. За разлика от Контролите само в 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ са установени микротубулни астери едновременно в полюсите на вретеното и цитоплазмата. Получена е статистически значима разлика между 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и Контролите в М I и М II (за всички сравнения: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,01).

Характерно за групите с ФСХ е наличието на облак от деполимеризиран тубулин в областта на мейотичното вретено, който не се наблюдава в другите групи. Най-голям дял на овоцити с такъв признак е установен в групата 10 ФСХ + 30 КИОА, като за М I той е 52,99%, а за М II – 59,81%. В групата 10 ФСХ има по-висок процент на овоцити с тубулинов облак от 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$: в М I за 10 ФСХ е 37,84% и за 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ е 19,18%, а в М II – 27,03% за 10 ФСХ и 17,39% за 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$. Изчислена е статистически значима разлика в М I при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за двете сравнения: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05), а в М II 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ се отличава значимо само от 10 ФСХ + 30 КИОА. За разлика от М I в М II е установена и значима разлика между 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001).



Фигура 33. Наличие на тубулинови астери при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отгоре: микротубулни астери в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и Контролите (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05). Отдолу: микротубулни астери в М II. *B* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и Контролите (p_i <0,001; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.



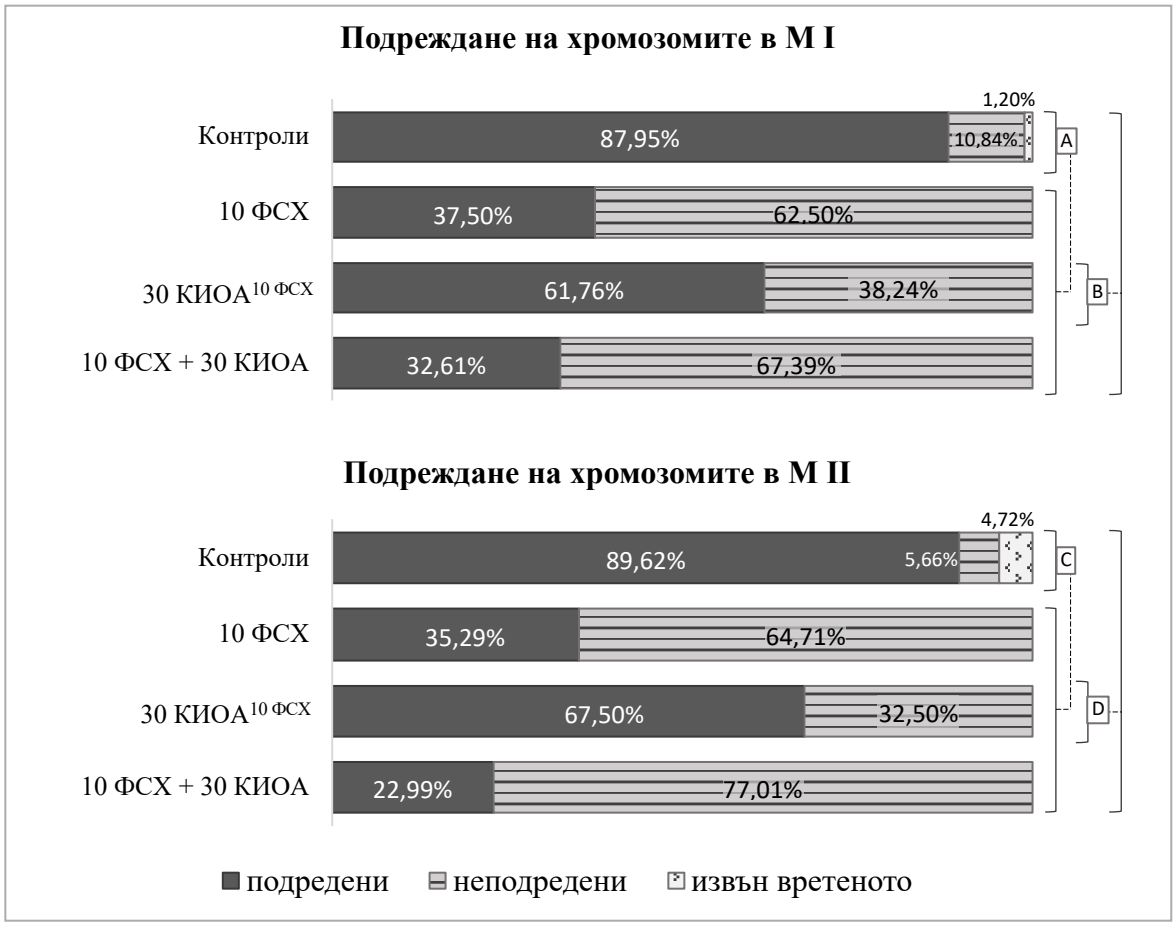
Фигура 34. Наличие на облак от деполимеризиран тубулин в областта на вретеното при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отляво: наличие на тубулинов облак в

М I. *A* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за двете сравнения: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). Отдясно: наличие на тубулинов облак в М II. *B* – сравнение на 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (за двете сравнения: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

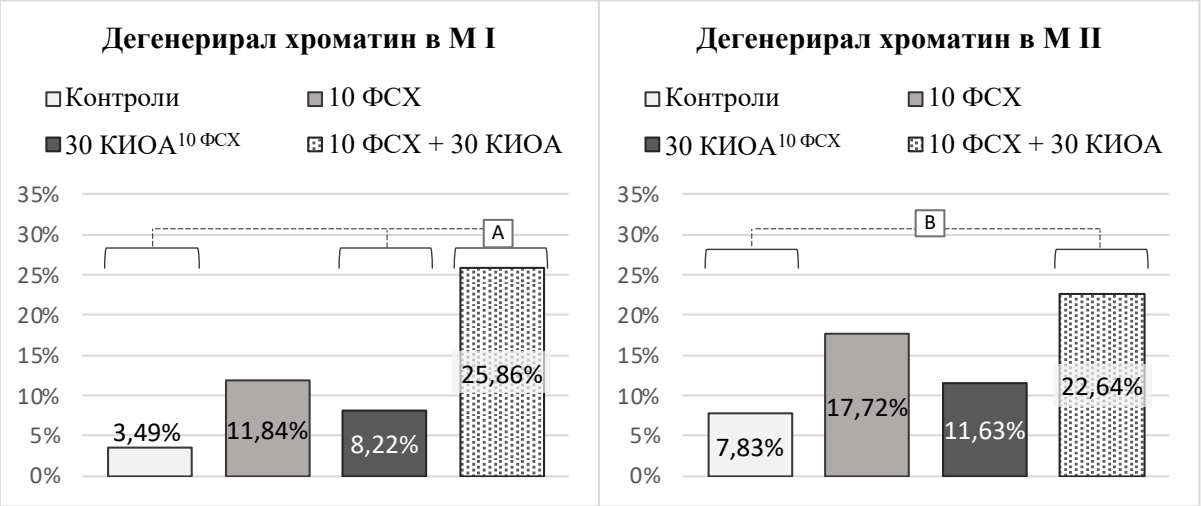
3.3.3. Подреждане на хромозомите във вретеното и състояние на хроматина при изследване на комбинацията на остеоартрит и ФСХ

В овоцитите на групите с ФСХ се открива по-висок процент на неподредени метафазни пластинки от Контролите (виж *Фигура 35*). Най-малък дял на подредени хромозоми е установен в групата 10 ФСХ + 30 КИОА с 32,61% за М I и 22,99% за М II. Стойностите им при групата на 10 ФСХ са малко по-високи: 37,50% за М I и 35,29% за М II. При 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ процентът на подредени метафазни пластинки е приблизително двойно по-голям спрямо другите две групи от клъстъра ФСХ с 61,76% в М I и 67,50% в М II. И при трите групи е получена статистически значима разлика спрямо Контролите в М I и М II (за всички: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). Групата 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ се отличава значимо от 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА в М I и М II (за всички: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Единствено не е потвърдена статистически значима разлика между групите 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА и за двете фази.

В групите с ФСХ е получен по-голям процент на дегенерирал хроматин в овоцитите спрямо Контролите в М I и М II (виж *Фигура 36*). В групата 10 ФСХ + 30 КИОА има най-висок дял на дегенерирал хроматин, като за М I е 25,86%, а за М II – 22,64%. Най-ниски стойности има при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и в М I (8,22%), и в М II (22,64%). При 10 ФСХ те са по-високи от предходната група: М I – 11,84%; М I*I* – 17,72%. В М I е получена статистически значима разлика при сравнението на 10 ФСХ + 30 КИОА с Контролите и с 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ при p_i <0,01 и p_{Hoch}<0,05, а в М II такава има само между 10 ФСХ + 30 КИОА и Контролите (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05).



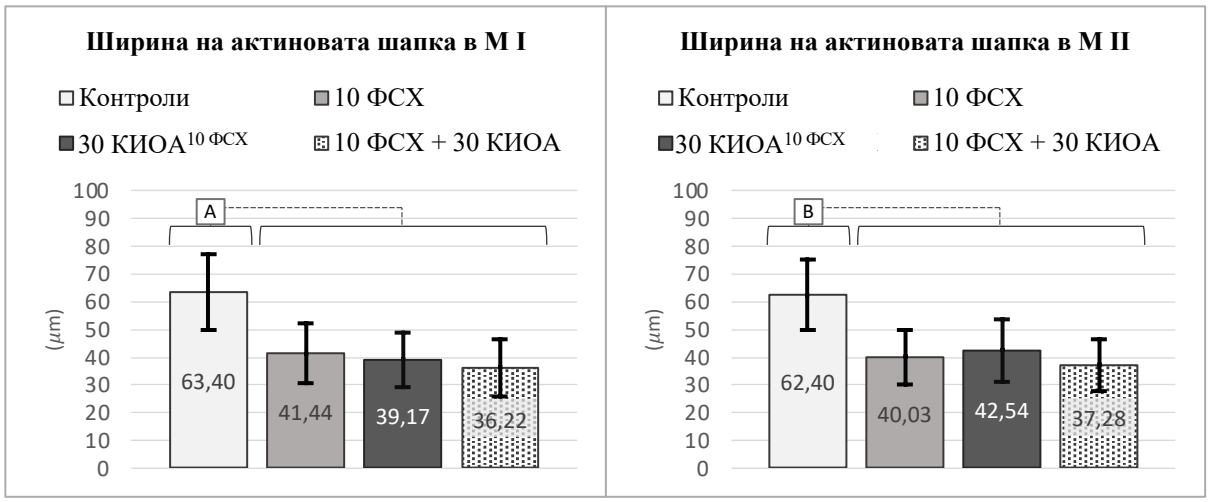
Фигура 35. Подреждане на хромозомите в метафазното вретено при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отгоре: подреждане на хромозомите в М I. *A* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за трите сравнения: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *B* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за двете сравнения: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Отдолу: подреждане на хромозомите в М II. *C* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за трите сравнения: p_i <0,001; p_{Hoch}<0,001). *D* – сравнение на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (за двете сравнения: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.



Фигура 36. Наличие на дегенерирал хроматин в овоцити при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отляво: дегенерирал хроматин в М I. *A* – сравнение на 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо Контролите и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (при двете сравнения: p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). Отдясно: дегенерирал хроматин в М II. *B* – сравнение на 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо Контролите (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

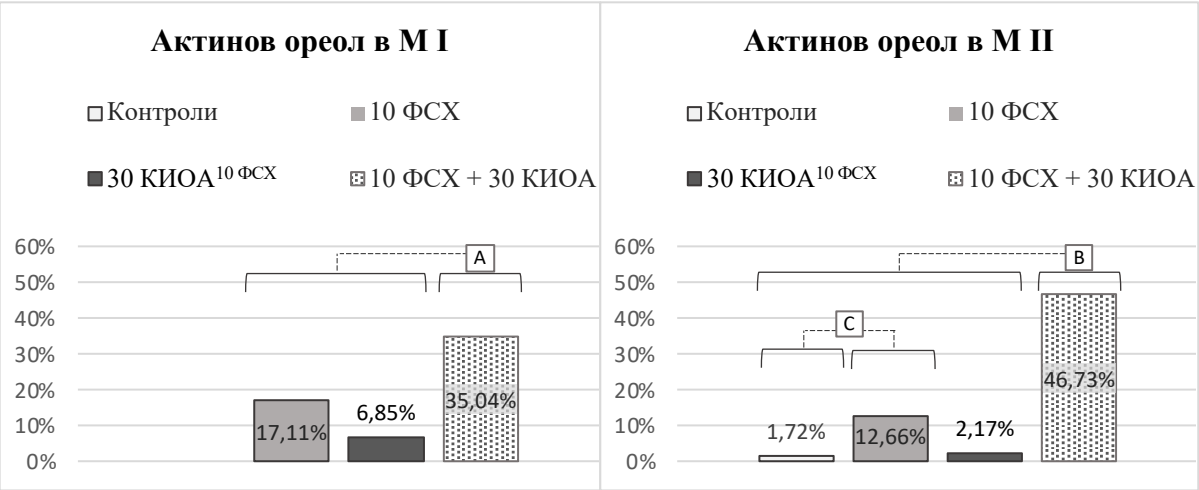
3.3.4. Актинов цитоскелет при изследване на комбинацията на КИОА и ФСХ

Групите от клъстъра се отличават с по-малки и компактни шапки от Контролите. Най-малка средноаритметична ширина е измерена при групата 10 ФСХ + 30 КИОА и в двете фази (М I – 36,22 μm; М II – 37,28 μm). В М I средната ширина на овоцитите в групата 10 ФСХ е малко над тази на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ – съответно 41,44 μm и 39,17 μm), а в М II е обратното – 40,03 μm за 10 ФСХ и 42,54 μm. Открита е статистически значима разлика при сравненията на групите с ФСХ спрямо Контролите (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001), но не е намерена такава между тях.



Фигура 37. Ширина на актиновата шапка при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отляво: обща средна ширина на актиновата шапка в М I. *A* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). Отдясно: обща средна ширина на актиновата шапка в М II. *B* – сравнение на Контроли спрямо 10 ФСХ, 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ и 10 ФСХ + 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички p_i <0,001). p_i – оригинална стойност от съответния тест.

Наблюдава се по-голям дял на овоцити с актинов ореол при ФСХ-групите в сравнение с Контролите. Най-висок процент на такъв е открит при 10 ФСХ + 30 КИОА с 35,04% в М I и 46,73% в М II. Най-ниска е стойността при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$, като в М I тя е 6,85%, а в М II е 2,17%. При групата 10 ФСХ процентът остава над този за предходната група: М I – 17,11% и М II – 12,66%. Установена е статистически значима разлика при 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо останалите групи в М I и М II (за всички: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). Сравненията между 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ не постигат значимо различие в М I и М II, както и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ спрямо Контролите в М II. Групата 10 ФСХ показва статистически значима разлика спрямо Контролите в М II (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05).



Фигура 38. Наличие на актинов ореол при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Отляво: наличие на актинов ореол в М I. *A* – сравнение на 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (за всички: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). Отдясно: наличие на актинов ореол в М II. *B* – сравнение на 10 ФСХ + 30 КИОА спрямо Контроли, 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (за всички: p_i <0,05; p_{Hoch}<0,05). *C* – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контролите (p_i <0,01; p_{Hoch}<0,05). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

3.4. Обобщение на резултатите при изследване на влиянието на остеоартрит, Е2 и ФСХ

Всички групи, в които присъства някой от факторите или комбинация от тях имат по-ниска степен на узряване на овоцитите спрямо Контролите (виж *Таблица 1*) и са с по-големи размери на мейотичните вретена (виж *Фигури 15*, *23* и *31*).

При чистите Контроли и Контроли^{Нут} не се откриват съществени различия по отношение на степента на зрялост (виж *Таблица 1*) и морфометрията на мейотичното делително вретено (виж *Фигури 15* и *23*). При групата на чистите Контроли има по-висок процент на дефектни вретена от Контроли^{Нут} в М II със статистически значима разлика p_i <0,05 (виж *Фигури 16* и *24*). При групата Контроли^{Нут} се наблюдават по-малко овоцити с астери от чистите Контроли, като в М I разликата е значима с p_i <0,05 (виж *Фигури 17* и *25*). По отношение на

актиновия цитоскелет средната ширина на шапката при Контроли^{Нут} е по-голяма от чистите Контроли (виж *Фигури* 20 и 28), но без статистически значима разлика. Също така при групата Контроли^{Нут} не се откриват овоцити с актинов ореол (виж *Фигура 29*).

Групата 30 КИОА е с един от най-малките дялове зрели овоцити (М II) и има най-много овоцити в М I (виж *Таблица 1*). При тази група се открива висок процент дефектни вретена, като приблизително половината от тях са с откачени нишки, а другата половина са напълно дезорганизирани (виж *Фигура 16*). В голяма част от овоцитите има тубулинови астери в полюсите на вретената (виж *Фигура 17*). Въпреки дефектните вретена процентът на подредени хромозоми остава висок и близък до този на Контролите (виж *Фигура 18*), а делът овоцити с дегенерирал хроматин е малък (виж *Фигура 19*). Средната ширина на шапката е по-малка от тази на групите с остеоартрит и Нутела (виж *Фигури* 20 и 28) и има висок процент на овоцити с актинов ореол (виж *Фигури* 21, 29 и 38).

При овоцитите на 18 КИОА^{Нут} са измерени едни от най-големите мейотични вретена (виж *Фигура 23*). Има по-висок процент на дезорганизирани вретена (виж *Фигура 24*) и неподредени метафазни пластинки от 30 КИОА^{Нут} (виж *Фигура 26*). В тази група, сравнена с останалите без ФСХ, има най-малко овоцити с тубулинови астери, като астери напълно липсват в М II (виж *Фигури* 25 и 17). Делът на дегенериралия хроматин също е малък (виж *Фигура 27*). Средната ширина на актиновите шапки е по-малка от тази на Контролите, но остава близка до тяхна стойност (виж *Фигура 28*). В групата има и овоцити с актинов ореол, но процентът е по-нисък от повечето групи с 30 КИОА (виж *Фигури* 29 и 21).

30 КИОА^{Нут} се характеризира с висок процент нормални вретена (виж *Фигура 24*) и понякога допълнително вретено в овоцитите. Процентът тубулинови астери в цитоплазмата е по-висок спрямо повечето групи (виж *Фигура 25*), а групата има и висок дял подредени хромозоми (виж *Фигура 26*). Вретената са по-големи от тези на 30 КИОА (виж *Фигури* 23 и 15), като в М I има висок процент дегенерирал хроматин, но в М II хроматинът е с нормален метафазен вид (виж *Фигура 27*). В тази група е измерена най-голямата средна ширина на актинови

шапки (виж *Фигура 28*), както и най-високият процент на овоцити с актинов ореол (виж *Фигура 29*).

Групата E2^{Нут} има нисък добив на овоцити (виж *Таблица 3*). Мейотичните вретена са по-къси и по-тесни от тези на групите с остеоартрит без E2 (виж *Фигура 23*). Полюсите са от най-компактните сред третираните групи и, особено в M I, се доближават до тези на Контролите (виж *Фигури 15* и *23*). Групата E2^{Нут} има по-малък дял на овоцити с дезорганизирани вретена спрямо групата 30 КИОА и ФСХ - третираните, както и от Контролите в M II (виж *Фигура 16*). Въпреки това, подобно на 18 КИОА^{Нут}, съотношението на овоцити с дефектни вретена е по-голямо спрямо останалите групи с остеоартрит (виж *Фигура 24*). При тази група остава висок процентът на тубулинови астери в цитоплазмата, като в M II тя се нарежда след 30 КИОА^{Нут} и 30 КИОА + E2^{Нут} (виж *Фигура 25*). Делът на неподредени хромозоми е сравнително малък (виж *Фигура 26*), като дегенериралият хроматин е по-рядко срещан (виж *Фигура 27*). Като цяло качеството на метафазния хроматин в M I и M II е близко до това на Контролите (виж *Фигури 19 и 27*), а в M II подреждането му във вретеното е сходно при групите с остеоартрит в комбинация с естрадиол (виж *Фигура 26*). В повечето случаи актиновите шапки са по-малки от тези на други групи с остеортрит, които не са третирани с ФСХ (виж *Фигури 28 и 37*).

За разлика от 18 КИОА^{Нут}, мейотичните вретена на овоцитите от 18 КИОА + E2^{Нут} са по-къси и по-тесни, но остават с широки полюси (виж *Фигура 23*). Също така при комбинацията на 18 КИОА с E2^{Нут} се наблюдават по-малък дял на вретена с дефекти (виж *Фигура 24*). Процентът на тубулинови астери е по-висок от този на 18 КИОА^{Нут}, но остава много по-нисък в сравнение с повечето групи с остеоартрит и с E2 (виж *Фигура 25*). В групата има по-малко овоцити с неподредени хромозоми от група 18 КИОА^{Нут} (виж *Фигура 26*), но има най-високия процент дегенерирал хроматин (виж *Фигура 27*). Актиновите шапки в група 18 КИОА + E2^{Нут} са по-малки от тези на Контролите и групите с остеоартрит без ФСХ (виж *Фигура 28*) и делът овоцити с актинов ореол е по-малък (виж *Фигура 29*).

При групата 30 КИОА + $E2^{Нут}$ добивът на овоцити е най-малък, като от тях има най-нисък процент зрели и най-висок процент дегенерирали (виж *Таблица 1*). Дължината на вретеното варира, като в М I тя е най-голямата, а в М II вретената са по-къси (виж *Фигура 23*). Мейотичните вретена са с голяма средна ширина и са с най-широките полюси. Овоцитите с дефектни вретена са повече в М I спрямо другите с остеоартрит без ФСХ, а в М II няма дефектни (виж *Фигура 24*). Установен е висок процент тубулинови астери (виж *Фигура 25*). Дялът на подредени хромозоми е по-голям от тези на 30 КИОА ^{Нут} и $E2^{Нут}$ (виж *Фигура 26*). Овоцитите с дегенерирал хроматин са по-малък дял спрямо 30 КИОА ^{Нут} и 18 КИОА + $E2^{Нут}$ в М I, но той остава от по-високите в М II спрямо другите групи. Средната ширина на актиновата шапка е по-близка до Контролите и 18 $КИОА^{Нут}$, но остава по-голяма от групите с $E2^{Нут}$ (виж *Фигура 28*). При една трета от овоцитите в М I се наблюдава актинов ореол, а в М II той липсва (виж *Фигура 29*).

Само при групите, третирани с ФСХ са установени овоцити, които са преминали М II (Анафаза II или Телофаза II), като техният дял е по-висок при 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА (виж *Таблица 1*). Групите с ФСХ се характеризират с най-малка ширина на мейотичните вретена и най-компактните полюси от останалите групи, с изключение на $E2^{Нут}$ в М I (виж *Фигури 31* и *23*). При тях има най-висок процент на дефектни вретена, като при тези с 30 КИОА и ФСХ има по-голямо съотношението от групата 10 ФСХ (виж *Фигура 32*). В част от овоцитите на 30 $КИОА^{10\ ФСХ}$ се наблюдават вретена с откачени нишки, а тези с дезорганизирани вретена по стойност се доближават до 10 ФСХ. Процентът на дезорганизирани вретена при 10 ФСХ + 30 КИОА е най-висок. Единствено от групите с ФСХ при 30 $КИОА^{10\ ФСХ}$ са установени овоцити с тубулинови астери в цитоплазмата, полюсите на вретеното, както и едновременно с двата вида, но техният общ дял остава по-нисък от повечето групи с остеоартрит (виж *Фигура 33* и *25*). Отличителна характеристика на групите с ФСХ е наличието на облак от деполимеризиран тубулин в областта на вретеното, който липсва при другите групи (виж *Фигура 34*). Най-висок процент на овоцити с тубулинов облак има групата 10 ФСХ + 30 КИОА, следвана от 10 ФСХ и най-нисък – при 30 $КИОА^{10\ ФСХ}$. Друг типичен белег за групите с ФСХ е голямото съотношение на овоцити с

неподредени метафазни пластинки, като най-голям дял на подредени хромозоми има при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ (виж *Фигура 35*). Тази група е и с най-ниския процент на дегенерирал хроматин, докато при останалите с ФСХ е сравнително по-висок спрямо други групи и 10 ФСХ + 30 КИОА е на второ място след 18 КИОА^{Нут} (виж *Фигури 36* и *27*). Групите с ФСХ имат най-малките шапки (виж *Фигура 37*). Най-голям дял на овоцити с актинов ореол има при групата 10 ФСХ + 30 КИОА, като тя се доближава най-много до другите групи с 30 КИОА без ФСХ (виж *Фигури 38* и *29*). Частта на тези овоцити при 10 ФСХ е по-малка, а при 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ е с още по-ниски стойности, които в М II се доближават до Контролите.

ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото изследване, доколкото ни е известно, представя нови и оригинални данни за влиянието на остеоартрита върху овогенезата при бозайници. Използването на миши модел на КИОА позволява добив на овулирани яйцеклетки от животни в същинската фаза на заболяването. Анализът на клетките съчетава изследване на ефекта от колагеназно-индуцирания остеоартрит върху цитоскелетни параметри на яйцеклетките с влияние от третирането на животните с естрадиол и фоликуло-стимулиращ хормон по различни схеми.

1. Влияние на КИОА върху цитоскелета и хроматина на овоцитите

Групата овоцити, получени от мишки с 30-дневен КИОА, имат по-нисък дял зрели до метафаза II клетки, сравнени с останалите фактори на въздействие, които не са комбинирани, както е показано в *Таблица 1* и *Фигура 14*. Същевременно мейотичните вретена (при M I и M II) имат уголемени размери и характерни особености. В групата обаче преобладава добро подреждане на метафазните хромозоми, сравнимо с това при контролите, а хроматинът е с най-ниска степен на дегенерация (както показват Фигури *18* и *19*). Анализът на параметрите на мейотичните вретена и актиновите струпвания установява ефекти на КИОА върху размерите на мейотичното вретено и образуването на актиновата шапка. При овоцитите от животни с 30 КИОА вретената са по-големи и по-широки, често съдържат дезорганизирани нишки и имат по-широки полюси в сравнение с вретената при контролните овоцити. Актиновият цитоскелет също е засегнат – вместо нормална актинова шапка, закотвяща мейотичното вретено към кортекса на овоцита, в повечето КИОА овоцити се наблюдава голям и сравнително дебел периферен актинов ореол (виж *Фигура 21*).

Същевременно при останалите групи овоцити от животни с КИОА групата 18 КИОА^{Нут} има също по-нисък процент на зрялост спрямо контролите, като група 30 КИОА^{Нут} има по-добър добив овоцити в M II от другите две артритни групи. За

тези две групи овоцити (30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА^{Нут}) се запазва тенденцията на големи вретена с широки полюси за М I и за М II, а подредбата на хромозомите се запазва преобладаващо добра при 30 КИОА^{Нут}, но е нарушена в значима степен при 18 КИОА^{Нут}. Данните предполагат корелация на степента на зрялост с успешната подредба на метафазните хромозоми в мейотичното вретено. Аномалии в образуването на актиновата шапка с образуване на актинов ореол засягат значимо 30 КИОА^{Нут}, докато при 18 КИОА^{Нут} делът на овоцити с ореол вместо шапка е нисък.

Регистрираните разлики са статистически значими и показват, че при групите овоцити, получени при различен режим на КИОА третирането (както в М I, така и в М II), остеоартритът може да даде своето отражение върху реорганизацията на тубулиновите и актиновите цитоскелетни структури по време на растежа и мейотичното зреене.

Както се вижда от *Таблица 1*, почти всички овулирани КИОА овоцити са в метафаза и съответно притежават мейотично вретено (М I или М II). Въпреки увеличените си размери и морфологичните си особености вретената имат сравнително нормална форма. Това показва, че образуването им, макар и засегнато от влиянието на остеоартрита, се осъществява успешно по време на овоцитното зреене. Увеличените размери и несъвършената ориентация на микротубулите обаче показват, че морфогенезата на вретеното в яйчника на КИОА мишките е повлияна от болестния процес, което би могло да се обясни със системни фактори на възпалението.

Уникалният процес на изграждане на микротубули в отсъствие на центрозоми при образуването на мейотичното вретено на овоцита съчетава два основни механизма на нуклеация на микротубули: първоначална, основана на ацентриолни центрове за организация на микротубули (*MTOC*) на стадий разпадане на герминалния везикул (Schuh & Ellenberg, 2007), и добавена впоследствие в прометафаза I нуклеация, основана на хроматина и опосредствана от *Ran*-ГТФ (Brunet et al., 2008). Тези механизми изискват активиране на различни белтъци от перицентриолния материал и центрозомата, участващи в нуклеацията

на многобройни микротубули от *MTOC* и по-късно в събирането им. Включват се и други пътища, например с участието на *CPC* (*chromosomal passenger complex*), както и еволюционно консервативният път, основан на активността на свързаните с кинетохорите *Aurora B/C* кинази. Тези пътища са особено важни при други видове бозайници, където *MTOC* не играят ролята, която имат в мишите овоцити (Bennabi et al., 2016). Антипаралелните микротубули се свързват в зоната на припокриване чрез двигателни белтъци, които транспортират ацентриолни *MTOC* в посока към вретеновите полюси. Действието на протеинкинази като *Aurora A*, *Plk1* и циклин-зависимата киназа 1 допринася за пространствената организация на *MTOC* и фокусирането на полюсите на мейотичното вретено (Bennabi et al., 2016; Marston & Wassmann, 2017; Namgoong et al., 2018).

Въпреки определени специфични аномалии на мейотичните вретена, характерни за групата на КИОА овоцитите (увеличена дължина и ширина на вретеното, ширина на полюсите и наличие на дезорганизирани микротубули), мнозинството от тях имат добре подредени хромозоми на екватора на вретеното както в М I, така и в М II. Добрите метафазни пластинки на овоцитите – както контролни, така и КИОА, показват, че микротубулите на вретеното са правилно прикрепени към кинетохорите. Изглежда, че в КИОА овоцитите хромозомите са подредени преди или независимо от действието на свързаните с остеоартрита възпалителни фактори. Промените в яйчниковото микрообкръжение по време на мейотичното зреене обаче е възможно да предизвикат несъвършенства в строежа на КИОА вретената и да доведе до увеличени размери и разширени полюси.

Правилното прикрепяне и подреждане на хромозомите във вретеното по време на клетъчно делене се контролира от вретеновата контролна точка (*SAC*). Тя се задейства от неподредени микротубули и неприкрепени хромозоми и предотвратява неправилната им сегрегация, като задържа настъпването на анафазата. В овоцитната мейоза *SAC* е по-малко точна и надеждна в сравнение с митозата и дори когато предизвиква арест в метафаза I, често позволява излизане от него, без проблемът да е отстранен. Това предразполага към грешки при мейотичната сегрегация на хромозомите и хроматидите. Някои автори обясняват

несъвършения контрол на *SAC* с големия обем на овоплазмата (Kyogoku & Kitajima, 2017). Други го приписват на специфичната ориентация на кинетохорите през първото мейотично делене: през метафаза I кинетохорите на сестринските хроматиди са ориентирани в една посока и се свързват с микротубули, идващи от един и същ полюс, за да бъдат бивалентите двустранно ориентирани и да се подредят правилно на екватора на вретеното (Hauf & Watanabe, 2004). Абнормално ориентиране или прикрепяне на кинетохорите може да доведе до *SAC*-активиран мейотичен арест или грешка при сегрегацията.

Нашите резултати, документиращи добро качество и правилно подреждане на хромозомите в групите КИОА овоцити, показват надежден контакт на вретеновите микротубули с хромозомите и успешното им придвижване към екватора на вретеното през ранните фази на мейозата. Въпреки това една от главните разлики между КИОА и контролните овоцити е по-големият дял на овоцити в метафаза I при КИОА в сравнение с контролите, както се вижда от *Таблица 1*. Този по-нисък успех на зреенето говори за арест в метафаза I поради задействане на вретеновата контролна точка. Въз основа на наблюдаваните особености на вретеното в КИОА овоцитите може да се предположи, че възпалителните ефекти на остеоартрита са нарушили сложния процес на изграждане на мейотичното вретено, причинявайки увеличаване на размерите му, дезорганизация на нишките или / и активиране на *SAC*.

Влиянието на възпалението върху овогенезата е сложно и засега слабо изучено. Според редица съобщения от последните години фоликулогенезата и овулацията имат някои общи молекулни механизми с възпалението с ниска интензивност. Фоликулната течност съдържа цитокини, някои от които предизвикват възпаление – например фоликулният *TNF-α*, *IL*-1 и *IL*-6, които в повишени концентрации се отразяват отрицателно върху качеството на овоцитите. Установено е, че нивото на *IL*-1 зависи от нивото на ФСХ във фоликула (Pant & Chitme, 2020). В преовулаторния фоликул се наблюдава секреция на простагландини, цитокини и хемокини, както и левкоцитна инфилтрация в отговор на рязкото покачване на лутеинизиращия хормон, което

предизвиква овулацията. Тези данни подкрепят „екзотичната" хипотеза за овулацията като възпалителен процес (Duffy et al., 2019; Espey, 1980). В същото време обаче локалните възпалителни процеси в яйчника и системните възпалителни разстройства понижават женския фертилитет, което отчасти се дължи на отрицателното им влияние върху овогенезата (Boots & Jungheim, 2015). При нашите експерименти животните с КИОА и контролите бяха подложени на един и същ режим на овариална стимулация, условия на отглеждане и обработка на клетките, което изключва влияние на тези фактори върху резултатите. Ето защо системно възпалително въздействие на остеоартрита върху овоцитното зреене е най-вероятната причина за разликите между КИОА и контролните овоцити в настоящото изследване.

Наблюдаваното от нас влияние на остеоартрита върху овогенезата може да се обясни в подтекста на системните възпалителни промени, свързани с това състояние при хора (Hackney et al., 2019) и при същия миши модел (Ivanovska & Dimitrova, 2011). Конкретните фактори, причиняващи наблюдавания понижен успех на зреене на КИОА овоцитите и морфологичните промени във вретената им, не могат да се установят на този етап. Предизвикващият възпаление цитокин *IL*-6, откриван в повишена концентрация в серума на пациентите с остеоартрит (T. Wang & He, 2018), приложен към зрели миши овоцити, уврежда мейотичните им вретена (Banerjee et al., 2012); ефектите обаче не са толкова специфични като наблюдаваните от нас, а и експерименталната постановка е твърде различна.

Други изследователи са наблюдавали уголемяване на мейотичното вретено след въздействие с определени молекули-участници в неговото изграждане и регулация. Инжектиране на анти-*Ran* антитела в незрели миши овоцити води до образуване на големи вретена, често с широки полюси (Cao et al., 2005). Неконтролираната активност на двигателния белтък *Eg5* (кинезин-5) води до удължаване на вретеното както при митоза (Yang et al., 2016), така и при овоцитна мейоза (Shirasu-Hiza et al., 1941). Обработката с таксол, който стабилизира микротубулите и може да предизвика образуването им, води до уголемени вретена и нуклеация на многобройни микротубули в миши овоцити (Cao et al.,

2005; Chen et al., 2016). Последният резултат е особено интересен с оглед на неотдавнашните данни, че нуклеирането на микротубули е най-важният фактор, определящ размерите на вретеното, особено в едри клетки (Rieckhoff et al., 2020), и наблюдението на астрални микротубули при множество КИОА овоцити в нашето изследване. Нормално вретеното в овоцити от бозайници поради липсата на центрозоми е с бъчвовидна форма и плоски полюси, лишени от астрални микротубули (Bennabi et al., 2016). Нашите уголемени КИОА вретена с дезорганизирани микротубули, включително астрални микротубули, биха могли да са резултат от абнормално усилена нуклеация на микротубули както около полюсите, така и по дължината на съществуващите вретенови нишки.

Отношение към разликите би могъл да има и механизмът на изграждане на мейотичното вретено, описван от някои автори като събиране на къси припокриващи се микротубули в двуполюсно вретено за разлика от дългите микротубули в митотичното вретено, простиращи се от полюса до екватора му (Severson et al., 2016). Тази прекъсната организация на нишките на мейотичното вретено под влияние на неустановени дезорганизиращи фактори, свързани с възпалението, би могла да допринесе за „рошавия" вид на нашите КИОА вретена.

Независимо от конкретните молекулни механизми изглежда, че свързани с остеоартрита възпалителни фактори могат да променят яйчниковото микрообкръжение на зреещите миши овоцити и да повлияят нуклеацията и организацията на вретеновите микротубули, водейки до донякъде несъвършеното им подреждане по дължината на вретеното и около полюсите му. Доколкото особеностите на вретеното не показваха разлика между M I и M II, може да се заключи, че системното въздействие на остеоартрита упражнява сходно въздействие върху овоцитното зреене независимо дали се отнася за първото или за второто мейотично делене.

В настоящото изследване при КИОА овоцитите се наблюдава специфичен дефект на организацията на микрофиламентите: актиновата шапка е заменена или придружена с голям, широк овоплазмен ореол и асиметрията в разпределението на фибриларния актин липсва или е нарушена. Овоцитната мейоза поначало е

силно асиметрична, което се основава на специфична реорганизация на субкортикалния актинов цитоскелет: чрез нуклеация на филаменти се създава актинова мрежа и хроматинът отделя пространствен сигнал, зависим от *Ran*-ГТФ, който насочва вретеното към кортекса. Това се съпровожда с натрупване на периферен актин в актинова шапка, която закотвя вретеното. В края на първото мейотично делене отделянето на първото полярно телце се осъществява от съкратителен актомиозинов пръстен (Duan et al., 2020; Uraji et al., 2018). През второто мейотично делене и в зрелия овоцит, задържан в метафаза II, е нужна правилно изградена актинова шапка, защото прикрепянето на вретеното на M II към периферията на овоцита е предпоставка за успешното завършване на мейозата и оттам за оплождането (Duan & Sun, 2019; Uraji et al., 2018).

В литературата има редица описания на нарушения на актиновия цитоскелет на миши овоцити, предизвикани от различни фактори. Намаляването на количеството на определени актин-свързващи белтъци, най-вече тропомодулина, потиска изграждането на овоплазмена актинова мрежа и кортекс, миграцията на вретеното и асиметричното делене (Jo et al., 2016; S. C. Sun et al., 2012). Намаляването на количеството на кинезина *KIF2A* (*kinesin family member 2A*) предотвратява миграцията на вретеното и образуването на актинова шапка, активира вретеновата контролна точка и така причинява арест в M I и неотделяне на първото полярно телце в миши овоцити (Chen et al., 2016). Такъв механизъм на дезорганизация би могъл да обясни увеличения дял на овоцити в M I в нашата КИОА група, но намаленото количество *KIF2A* в изследването на Chen et al. води и до нарушено подреждане на хромозомите, докато нашите овоцити с КИОА имат подредени хромозоми дори ако вретеното е голямо и съдържа дезорганизирани нишки. Освен това актиновият цитоскелет в нашите КИОА овоцити образува характерен широк деполяризиран овоплазмен ореол както през M I, така и през M II.

С оглед на описаните резултати интерес представлява публикувано изследване на стареещи миши овоцити (S. C. Sun et al., 2012), установило намаляване на основаната на актина полярност на овоцита и липса на актинова

шапка, както и неправилно разпределение на кортикалните гранули и риск от полиспермия при оплождането. В нашето изследване е спазван еднакъв протокол за фиксиране на КИОА и контролните овоцити непосредствено след изолирането им от яйцепроводите и отстраняването на кумулуса, така че можем да изключим постовулаторно стареене на овоцитите. Конкретните механизми, предизвикали наблюдаваните дефекти, не можеха да бъдат установени в рамките на изследването, но може да се предположи, че те отразяват влиянието на остеоартрита върху овоцитното зреене в яйчниците на опитните животни. Дефектите на разпределението на актина в КИОА овоцитите изглеждат специфични за тези клетки и значително по-драстични от дефектите на вретеното в същата група. Тази абнормална организация на микрофиламентите влошава качеството на КИОА овоцитите и най-вероятно намалява способността им да дадат жизнеспособни ембриони.

Резултатите от настоящото изследване позволяват да се направи изводът, че колагеназно-индуцираният остеоартрит оказва влияние върху цитоскелета на овулираните миши овоцити в три основни направления: (1) мейотичните вретена както в M I, така и в M II са по-дълги и по-широки, с по-широки полюси и често с дезорганизирани нишки около вретеното и полюсите му, които ми придават „рошав” вид; (2) актиновата шапка често е заменена с широк ореол, който не показва видима асиметрия; (3) въпреки посочените аномалии в КИОА овоцитите успешно се образуват мейотични вретена, които осигуряват правилно подреждане на хромозомите на екватора през M I и M II. Необходими са по-нататъшни изследвания, за да се разкрият молекулните механизми на свързаните с КИОА цитоскелетни дефекти, наблюдавани в настоящото изследване.

2. Влияние на третирането на животните с естрадиол върху цитоскелета и хроматина на овоцитите

Макар дълги години да се е смятало, че остеоартритът е локален проблем и увредените от болестта ставни тъкани не се повлияват от нивото на естрогените, значимо повишената честота на остеоартрит при жените в постменопауза предполага връзка на заболяването със затихване на яйчниковата функция (Roman-Blas et al., 2009). Съвременни изследвания установяват, че третирането на миши модел на КИОА с естрадиол има анти-артритен ефект: въздействието редуцира възпалителния профил на изследваните хондроцити, понижава нивото на апоптозата им и потиска секрецията на металопротеазата *MMP*-13 (*matrix metalloproteinase*-13), която разгражда извънклетъчния матрикс в засегнатата става (Ganova et al., 2023).

Ролята на естрогените като регулатор на ранните етапи на фоликулогенезата е важна и определяща: при мишки с дефицит на естроген или на неговия рецептор се блокира развитието на преантрални фоликули, което води до спиране на овулацията (Drummond & Findlay, 1999). Установена е и връзка на естрадиола с напредващото развитие на антралните фоликули в яйчника: той е необходим за развитието и диференцирането на пристенните гранулозни клетки (Ito et al., 2022). Тази роля на естрадиола в овогенезата, както и горецитираните данни за положителния му ефект върху артритната патогенеза, дадоха основание да се изследва комбинираното въздействие на остеоартрит и естрадиол върху овогенезата при мишия модел на КИОА.

Изследванията върху ефекта от различни режими на третиране с естрадиол разглеждат както влиянието на хормона, добавян в отсъствие на КИОА (група $E2^{Нут}$), така и при комбинирано въздействие на естрадиол с КИОА в различни режими (групи 30 КИОА + $E2^{НУТ}$ и 18 КИОА + $E2^{НУТ}$), а при групи 30 $КИОА^{Нут}$ и 18 $КИОА^{Нут}$ липсва третиране с естрадиол при добавена Нутела в предвидения период. Същевременно изследването има и своя контролна група с добавка на

Нутела към стандартната диета на животните без никакво допълнително въздействие.

Следва да се отбележи, че двете използвани контролни групи – чисти Контроли и Контроли^{Нут}, показват неголеми, но статистически значими разлики. Те са в полза на Контроли^{Нут}, които се отличават с по-малко дефектни вретена и тубулинови астери и нямат актинови ореоли. Тези разлики са интересни и позволяват да се предположи, че въпреки неограничения достъп на чистите Контроли до пълноценна храна те не са получавали в оптимални количества някаква хранителна съставка, която се съдържа в лешнико-какаовият крем Нутела, предоставян на Контроли^{Нут}, и влияе положително върху овогенезата. Наличните данни не позволяват да направим обосновано предположение за естеството на този компонент, но следва да се има предвид, че Нутела-крем е богат на мазнини и въглехидрати, които биха могли да повлияят метаболизма на стероидните хормони. В по-общ план разликата между двете контролни групи потвърждават важността на внимателното планиране на адекватни контроли, които да се включват в експерименталните изследвания, поради възможността неочаквани фактори (като използването на Нутела) да дадат отражение върху резултата. Освен това данните от опитните групи показват, че ползата от добавянето на Нутела не може да надделее над вредните ефекти, причинени от други фактори.

Като цяло групите, третирани с естрадиол, показват тенденция към намален дял на зрелите до метафаза II овоцити, като при група 30 КИОА+Е2^{Нут} са регистрирани най-висок процент дегенерирали яйцеклетки, както и незрели клетки на стадии преди метафаза I (в *GV* или *GVBD*), както показва *Таблица 1*. Оказва се, че най-засегнато е качеството на овоцитите, когато остеоартритът и третирането с естрадиол са паралелни. Както е показано на *Фигура 23*, най-големи вретена с широки полюси са регистрирани при М I на тази група.

Присъствие на значим дял яйцеклетки с цитоплазмени тубулинови астери паралелно с мейотичните вретена е характерно за цялата група овоцити от мишки с КИОА, третирани с естрадиол, независимо от това в кой период от развитието

на артрита е приложен хормонът. Наличието на тубулинови звезди е едно от условията за образуване на мейотичното вретено при разпадането на герминалния везикул (*GVBD*), но през следващите етапи на мейозата тези „квази-астрални“ микротубули намаляват както по брой, така и по дължина. Неотдавна получени данни показват, че те играят роля в придвижването на вретеното към периферията през метафаза I, като го забавят. Съответно прилагането на токсини, причиняващи деполимеризация на микротубулите, ускорява миграцията на вретеното към кортекса. Инхибиторите на автофагията, обратно, нарушават нормалната динамична регулация на квази-астралните микротубули и водят до увеличаване на броя им и до забавяне на миграцията на вретеното до степен анафаза I да протече, докато то е още далеч от кортекса, и да се получи голямо полярно телце (Londoño-Vásquez et al., 2022). Регистрираното значимо за групата присъствие овоплазмени тубулинови звезди в настоящото изследване би могло да има отношение към евентуални затруднения в тези фини процеси на ориентиране и придвижване на мейотичното вретено при този тип въздействие – КИОА, съпроводен с третиране с естрадиол преди добива и фиксирането на овоцитите за анализ. Макар тубулиновите звезди да присъстват в овоплазмата и при други групи анализирани овоцити, което предполага подобни причини за динамиката на тяхното присъствие, процентът им е най-висок след третиране с естрадиол. Може да се каже, че по този признак повлияните от естрадиол групи овоцити наподобяват клетките с потисната автофагия от експеримента на (Londoño-Vásquez et al., 2022). Наистина в настоящото изследване не се наблюдават описаните от тези автори големи полярни телца, но за сметка на това се отчита понижен успех на зреенето и повишена честота не само на метафаза I, а и на предхождащите я силно незрели стадии, а също така и на дегенерирали овоцити. Описаните находки подкрепят тезата за нарушено мейотично зреене за тази група и навеждат на предположение за активиране на вретеновата контролна точка, а може би и на по-ранни контролни точки (виж *Фигури* 4, 5 и 25).

Дефекти на преобразуванията на тубулиновия цитоскелет и динамичното взаимодействие на астерите с вретеновите микротубули по време на овоцитното зреене при КИОА и при различните режими на въздействие с естрадиол явно

водят и до формиране на удължените вретена с широки полюси, типични за тези овоцити. Възможно е двете особености да са свързани, т.е. повишеният брой и/или активност на *MTOC*, чийто израз са наблюдаваните астери, да води до уголемяване на вретеното. От изследвания върху митотични клетки е известно, че размерите на вретеното нарастват с увеличаване на броя центрове за нуклеация на микротубули (Mitchison, 2020; Rieckhoff et al., 2020).

Подредбата на хромозомите в мейотичните вретена при комбинирано въздействие на КИОА и естрадиол обаче се запазва в относително нормални стойности, като за M I при 30 КИОА+E2^{Нут} дори превъзхожда тази при контролите (можем да предположим, че при контролите *SAC* се активира по-често от нарушения в свързването на хромозомите с вретеното, а при третиране с естрадиол – от нарушения в изграждането на самото вретено). Резултатите показват по-лошо подреждане на хромозомите в група 18 КИОА^{Нут}, съпроводено и по-често срещан дегенерирал хроматин при тези с 18-дневен артрит и естрадиол (*Фигури 26* и *27*). Добре подредени хромозоми на фона на тубулиновите аберации при тези групи предполагат известен протективен ефект на естрадиола по този показател (вероятно комбиниран и с добавката на Нутела като част от хранителния режим на животните).

Актиновият цитоскелет показва намален размер на актиновата шапка при групите E2^{Нут} и 18 КИОА+E2^{НУТ}, а актинов ореол е по-често регистриран при 30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА^{Нут}, както се вижда от *Фигури 28* и *29*. Участието на актиновите микрофиламенти в позиционирането и придвижването на вретеното към овоцитния кортекс е важна част от механизма на мейотичните преобразувания в овоцитите: литературните данни доказват, че блокирането на микротубулната динамика не се отразява на тези преобразувания, но блокиране на актиновия цитоскелет пречи на миграцията на вретеното при мишата мейоза (Azoury et al., 2008; Pfender et al., 2011; Schuh & Ellenberg, 2008). Известно е и че инактивирането на основната циклин-зависима киназа на мейозата (*CDK1* / *MPF*) води до формин-зависима нуклеация на актинови филаменти, което обезпечава миграцията на вретеното и отделянето на полярни телца при мейотичната

телофаза и цитокинеза, както и динамиката в разпределението на други овоплазмени органели (Duan et al., 2020; Wei et al., 2018).

Получените резултати за особеностите на актиновия цитоскелет при овоцитите с КИОА без естрадиол, сравнени с овоцитите с комбинирано третиране (КИОА + естрадиол), предполагат влияние с различен ефект за естрадиола (формирана актинова шапка, макар с намален размер за групи $E2^{Нут}$ и 18 КИОА+$E2^{Нут}$) и възпалението – образуване на относително плътен актинов ореол, особено при група 30 $КИОА^{Нут}$. Предвид наличните литературни данни за участие на актина в изграждането на кинетохорните микротубули и свързване на хромозомните кинетохори с тях при сглобяването на мейотичното вретено (Mogessie & Schuh, 2017; Nikalayevich & Terret, 2023) и обсъденото по-горе значение на правилно образуваната актинова шапка за периферната позиция на мейотичното вретено, правилното протичане и успешното завършване на мейозата като предпоставка за успеха на оплождането (Duan & Sun, 2019; Uraji et al., 2018), получените резултати очертават зависимост на актиновите преобразувания както от възпалителните ефекти на остеоартрита, така и от третирането на животните с естрадиол.

Като цяло параметрите на третираните с естрадиол групи са по-лоши от тези на контролите. Това не е изненадващо, доколкото за всеки хормон се очаква да действа най-добре във физиологичната си концентрация, а при повишени нива да проявява нежелани ефекти. От друга страна обаче, по определени показатели като подреждането на хромозомите групите с едновременно въздействие на естрадиол и КИОА превъзхождаха групите с КИОА без естрадиол, макар и не в голяма степен. Това би могло да се дължи както на общ анти-артритен ефект на естрадиола, така и на влияние конкретно върху овогенезата чрез противодействие на възпалителните фактори. Ако екстраполираме резултатите от използвания миши модел, можем да предположим, че ако жени в репродуктивна възраст с остеоартрит приемат естрадиол за облекчаване на заболяването, не се очаква допълнително влошаване на овогенезата им, но не следва да се разчита и на драматичното й подобряване.

3. Влияние на третирането на животните с ФСХ върху цитоскелета и хроматина на овоцитите

Фоликуло-стимулиращият хормон е част от гонадотропната стимулация, която хипофизата упражнява върху яйчниковата функция. Отговорен за пролиферацията и диференциацията на гранулозните клетки във фоликула, ФСХ стимулира каталитичното метаболизиране на андрогените в естрогени от пристенните гранулозни клетки. Два ензима – ароматаза (*CYP19A1*) и 17*β*-хидростероид-дехидрогеназа (*17β-HSD*), превръщат андростендиона в естрадиол (Wu et al., 2022). Този път на гонадотропен контрол върху овариалния синтез на естрадиол, който да направлява развитието на фоликулите до късни антрални и доминантни фоликули, се използва в асистираната репродукция. За целите на овариалната стимулация и производство на увеличен (спрямо видово-специфично ограничения) брой доминантни фоликули се прилага екзогенен ФСХ за поддържане на негово надпрагово ниво, което да осигури множество едновременно растящи фоликули и добив на преовулаторни фоликули. Гонадотропната стимулация на яйчника и големият брой растящи фоликули обаче повишават нивата на естрадиола. Едно от опасенията, свързани с този подход, е, че сложната координация на ФСХ / ЛХ гонадотропния ефект при тези процеси може да доведе до ранен ендогенен скок на ЛХ, овариална хиперстимулация и влошено качество на овоцитите с риск от абнормално сегрегиране на хромозомите и анеуплоидии както при различни животински модели, така и при човек (Clark et al., 2022; Palinska-Rudzka & Mathur, 2023; Roberts et al., 2005; Walton et al., 2022; Xu et al., 2011).

Регулацията на яйчниковата функция чрез гонадотропна стимулация и обратна връзка от яйчника не работи в пострепродуктивна възраст, когато нивата на естрадиол са ниски, а серумният ФСХ е екстремно повишен поради загубена обратна връзка от яйчника. Това е свързано с утежняване на ставното увреждане и обостряне на ставните болки при жени с остеоартрит в напредваща менопауза (Y. Liu et al., 2020). Фината регулация, чрез хипофизния гонадотропин ФСХ и

овариалния естрадиол с обратна връзка, обаче остава работеща в случаите на остеоартрит при жени в репродуктивна възраст, при силно, повторяемо и продължително ставно натоварване (активни, често професионални спортистки, балерини и танцьорки, инструментални музикантки), чиято кариера често става причина за отлагане на планирано забременяване и нужда от асистирана репродукция. Мишият модел на КИОА предоставя възможност за изучаване на комбинираното влияние на възпалителните процеси, ФСХ и естрадиола върху овогенезата. Изследване на влиянието на ФСХ и естрадиол върху костно-мозъчни и синовиални клетки при КИОА-мишки установява противоположен ефект на двете третирания: докато ФСХ засилва разграждането на хрущяла, увеличава остеокластите и не повлиява образуването на остеобласти, естрадиолът намалява хрущялната увреда, стимулира образуването на остеобласти и редуцира остеокластите. В това противоположно действие са въвлечени хормонално-повлияни промени в нивата на *TNF-α*, *IL*-8 и разлики в производството на остеокалцин от остеобластите (Belenska-Todorova et al., 2021).

Нашето изследване установява сравнително по-нисък успех на мейотичното зреене при овоцитите от групите, третирани с ФСХ по различни схеми, спрямо контролите. Установени са значим процент клетки (групи 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА) в преход от първо към второ мейотично делене, както и в необичайно за овулирани овоцити състояние – в анафаза или телофаза на второто мейотично делене, които би трябвало да са част от процеса на опложданe. Регистрираният повишен дял овоцити в преходните анафаза I и телофаза I е една от отличителните особености на овоцитите от групи 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА, тъй като тези преходни мейотични стадии се срещат в единични клетки при останалите групи (*Таблица 1*). Макар да са част от мейотичното зреене на яйцеклетките преди овулацията, разликата в честотата им е характерна за групи, в които ФСХ е бил прилаган самостоятелно или преди старта на остеоартрита.

За групите, третирани с ФСХ по различни схеми, е характерен значимо по-висок добив на яйцеклетки за анализ. Качеството на клетките обаче е различно както от контролните групи, така и от групите, анализирани само за ефект на

КИОА (виж *Фигура 30*). Клетките в метафаза I са значимо по-малко при групите 10 ФСХ и 10 ФСХ + 30 КИОА, а овоцитите в метафаза II са значимо по-малко за всички третирани с ФСХ групи. Делът на М I овоцити при група 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ е относително голям и е съпроводен от нисък дял междинни мейотични стадии в тази група, но в нея е отчетен най-нисък процент М II яйцеклетки за трите ФСХ групи. В тези групи е регистриран и най-висок процент дегенерирали клетки (*Таблици 1* и *4*).

Особеностите на мейотичните вретена и подредбата на хромозомите в тях показват специфични дефекти, различни от всички останали анализирани групи. Макар тенденцията към удължено вретено да се запазва, ширината му остава близка до тази на контролите (с изключение на група 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$), вретеновите полюси са по-широки от тези при контролите, но по-фокусирани спрямо полюсите на вретената при овоцити на животни с КИОА, комбиниран с естрадиол. Третираните с ФСХ групи имат най-висок процент дезорганизирани вретена, като при 10 ФСХ + 30 КИОА те достигат до около 3/4 от анализираните клетки. Делът на клетки с дегенерирал хроматин също е най-висок при тази група (виж *Фигура 36*). Характерна особеност на овоцитите от ФСХ групите е и наличие на облак от деполимеризиран тубулин в екваториалната област (виж *Фигура 34*). Тази аномалия е най-често срещана при 10 ФСХ + 30 КИОА и при 10 ФСХ, като този факт корелира с високия процент неподредени хромозоми при тези групи.

Отличителни за 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ са дефекти на микротубулите, които остават неприкачени към вретеното и остават извън подредената структура от полярни и кинетохорни нишки (виж *Фигура 32*). Тубулиновият цитоскелет на 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ групата показва и най-висок процент астери в цитоплазмата, макар делът им да е по-малък от групите с 30 КИОА и естрадиол. Тубулинови звезди не се регистрират при останалите ФСХ групи. Групата 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$, въпреки дефектите на вретеното, има относително висок процент подредени метафазни хромозоми спрямо другите две групи. Подредбата на хромозомите остава добра в тази група дори при дезорганизирано вретено.

Регистрираните аномалии на мейотичните вретена са съпроводени с най-малките актинови шапки, значимо по-малки от тези на контролите (виж *Фигура 37*). Актинов ореол се среща рядко при групи 10 ФСХ и 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$, но все пак присъства в значим процент от яйцеклетките на група 10 ФСХ + 30 КИОА (виж *Фигура 38*). В овоцитите с тубулинов облак около хромозомите двата цитоскелетни елемента колокализират и актиновите аномалии явно са свързани с нарушения на нормалното мейотично зреене. Проблеми при свързването на кинетохорните микротубули с метафазните хромозоми на овоцита биха възпрепятствали подредбата им и тяхната бъдеща сегрегация. Вероятно това е главната причина за цялостното засягане на тубулиновия, актиновия цитоскелет и неподредените метафазни пластинки при тези групи. При група 30 КИОА$^{10\ ФСХ}$ обаче се наблюдава добро подреждане на хромозомите на фона на високия процент дезорганизирани вретена и вретена с откачени нишки (необичайно при сравнение с другите две ФСХ групи). Подобни резултати водят до предположението, че поне част от вретеновите дефекти, а вероятно и част от общите цитоскелетни аномалии могат да се отнасят към увреждания, настъпили след сглобяването на мейотичното вретено. Регистрирани към момента на овулация обаче, те правят овоцитите от тези групи неспособни за оплождане и завършване на мейозата изобщо.

Получените резултати за групите с ФСХ като цяло очертават връзка на големия брой овоцити за анализ с влошеното качество на мейотичните вретена и метафазните пластинки. Предвид основната функция на ФСХ да стимулира и да подкрепя развитието на преантрални и антрални фоликули (Candelaria et al., 2020), екзогенното му прилагане самостоятелно, преди КИОА и паралелно с него предполага развитие на по-голям от видово-специфичния брой ранни фоликули в рамките на това третиране. Комбинирано с КИОА и стимулацията за добив на овоцити, действието на гонадотропния ефект се кумулира и удължава за времето на експеримента. Проучване на ефекта от прекомерна ФСХ стимулация установява нарушения в диференцирането на гранулозните и кумулусните клетки, разлики в размера на преовулаторните фоликули и преждевременна лутеинизация при млади говеда (юници) като модел на пациенти с намален овариален резерв

(Clark et al., 2022). При мишки с точкова мутация в гена за инхибин, която нарушава обратната връзка от яйчника към хипофизата и регулацията на синтеза на ФСХ, ефектът води до повишени нива на ФСХ и овариална хиперстимулация на животните (Walton et al., 2022). Изследвания на ефекта от висока концентрация на ФСХ, добавен при култивирането на овоцити *in vitro*, показват нарушения в подредбата на хромозомите през прометафаза и метафаза с уголемяване на мейотичните вретена (Roberts et al., 2005). Подобни изследвания, установяващи връзка на повишените ФСХ нива и аномалии в хромозомната сегрегация при мейоза, са провеждани и за човешки овоцити (Xu et al., 2011).

Като хетеродимерен гликопротеинов комплекс, ФСХ може да съществува в различни изоформи според количеството присъединени към олигозахаридната им част остатъци сиалова киселина, което леко модулира хормоналното действие. Тези изоформи могат до известна степен да варират през различните фази от фоликулното и овоцитното зреене. Слабо киселинните, с кратък полуживот ФСХ изоформи подпомагат зреенето на яйцеклетките и, ако бъдат добавени в *in vitro* условия, могат да активират овоцитното зреене. По време на фоликулогенезата изоформите с кратък полуживот се редуват с по-киселинни изоформи на ФСХ, отговорни за ранната фоликулогенеза. Двата типа изоформи са зависими по различен начин от серумния естрадиол: нискокиселинните са свързани с по-високи нива на естрадиола, докато по-киселинните са характерни за понижено ниво на естрадиола (Yding Andersen, 2002). В настоящото изследване третирането на животните с ФСХ е проведено със стандартна търговска форма на хормона в повторяема концентрация. Физиологични ефекти от колебания на циркулиращи ендогенни ФСХ изоформи (както и спрегнатите с гонадотропната стимулация естрогенови нива) биха могли да окажат влияние върху хода на мейозата и вероятно могат да доведат до неочаквано често срещаните мейотични стадии извън метафазния арест на първата и втората мейоза. Дали и до каква степен вариации в ФСХ изоформите са свързани с овоцити извън метафазния арест на първата и втората мейоза обаче изисква бъдещи детайлни изследвания на този, всъщност, доста интригуващ проблем.

Установена е и възрастова разлика на гликоформите на ФСХ, преобладаващи в хипофизната яйчникова стимулация: в млада възраст нискогликозирираните форми водят до получаване на по-качествени овоцити спрямо по-високогликозилираните (нарастващи с напредване на възрастта) при сравняване в *in vitro* култивирани миши фоликули. Ефектът на нискогликозилираната ФСХ форма се свързва с по-адекватна подкрепа на фоликулното зреене, повишена продукция на естрадиол във фоликулите и по-добра комуникация между гранулозните клетки в периода на фоликулния растеж и овоцитното зреене (Converse et al., 2023). Изследването обаче установява и добра преживяемост на фоликулите при култура с високогликозириран ФСХ, както и производство на нормални MII яйцеклетки. Като се има предвид, че в асистираната репродукция се прилагат препарати, съдържащи главно високогликозилираната форма на ФСХ както в уринарните, така и в рекомбинантните им варианти (Bousfield et al., 2014; Butnev et al., 2015), въпросите, които поставят тези изследвания, са свързани с главните протоколи за овариална стимулация.

Намесата на екзогенно добавения в настоящото изследване ФСХ, макар за ограничен до 10-дневен период, представлява еднотипно и относително продължително третиране по отношение на репродуктивния период при мишка. Този екзогенен ФСХ би могъл да наруши финия баланс на ендогенните форми на ФСХ (както различните изоформи през фазите на фоликулогенезата, така и различно гликозилираните възрастово-обусловени гликоформи) и зависимите от тях естрадиолови нива. Характерните особености на групите с ФСХ вероятно отразяват подобни несъвършенства в контрола на гонадотропната стимулация, когато влияние отвън наклони везните към по-неблагоприятни за мейотичното зреене на овоцитите варианти в структурата на хормона.

3.1. Наличие на овоцити след метафаза II при групите с ФСХ

Интересна находка е наличието на овоцити на стадий анафаза II или телофаза II) в групите, третирани с ФСХ. Нормално неоплодените овоцити не излизат от втория мейотичен арест в метафаза II, така че не се очаква да достигнат такива късни стадии. В литературата обаче има множество съобщения за овоцити, които преминават метафаза II без оплождане (Jurisicova et al., 2006). Обикновено това са клетки, които имат дефекти, претърпели са увреждащо въздействие или са в края на своя жизнен път в резултат на т. нар. постовулационно стареене (Perez et al., 1999; Prasad et al., 2015). По-старите източници описват събитието като партеногенетична активация, а по-новите – като апоптоза. Причината умиращите метафазни клетки да преминават към анафаза и телофаза е, че пълноценното осъществяване на апоптозата изисква изход от М-фазата. Ако клетката е в метафаза, каспазите и зависимата от тях ендонуклеаза могат да се активират, но не се осъществява фрагментация до апоптозни телца. След прехода към анафаза овоцитът може да се фрагментира (Perez et al., 1999), макар че при него фрагментацията не може да изпълни своята обичайна функция, т.е. да раздели умиращата клетка на заградени с мембрана части, достатъчно малки, за да бъдат успешно погълнати от фагоцитите. Засега не е ясно защо метафазата не позволява да се осъществи пълната програма на апоптозата, но тази несъвместимост не е свойствена само на овоцитната мейоза. Соматичните клетки, в които се задейства апоптоза, докато се делят чрез митоза, също преминават към крайните стадии, преди да умрат – явление, наречено митотична катастрофа (Vakifahmetoglu et al., 2008). Въз основа на тези литературни данни и нашите резултати може да се заключи, че екзогенният ФСХ, приложен по описания протокол, предизвиква апоптоза при част от овоцитите.

Третирането на животните с ФСХ за оценка на влиянието му върху овогенезата разкрива аспекти на негативно влияние на екзогенния ФСХ, комбиниран с остеоартрит. Получените резултати показват влошено качество на яйцеклетките и дефекти на мейотичното им зреене, които насочват вниманието

към въпроса за прецизиране на формите и редуциране на дозите ФСХ, прилагани в асистираната репродукция в случаи на пациентки с остеоартрит.

4. Ефект на режима на прилагане на простагландин *F2α*

Както беше посочено по-горе, предполагаемият механизъм, чрез който остеоартритът се отразява на овогенезата, е чрез медиатори на възпалението. Сложните и до известна степен разнопосочни резултати, получени за овоцитите от мишки с КИОА, ни накараха да потърсим начин за проучване на ефектите на възпалението в друга, максимално опростена моделна система. Като медиатор беше избран простагландин *F2α*, защото за разлика от други свързани с възпалението молекули като простагландин *E2* не е известно за негово участие в овулацията или други процеси от нормалната овогенеза. Всъщност простагландин *F2α* има роля в репродуктивния цикъл, но тя е свързана с лутеолизата (дегенерацията на жълтото тяло), а при човек и други примати и с излющването на ендометриума при настъпването на менструацията. Следователно поне към настоящия момент този простагландин в женската полова система се асоциира с процеси на клетъчна смърт и разпадане на тъканите. Изследователски колективи, третирали зреещи овоцити с простагландин *F2α*, установяват понижаване на процента узрели овоцити и техния потенциал за развитие (Bromfield & Sheldon, 2011; Soto et al., 2003). Тези автори обаче не съобщават за конкретни нарушения в овоцитната морфология, което поставя въпроса дали и при третираните с простагландин овоцити като при тези от КИОА-мишките е засегнат цитоскелетът. За да получим отговор, култивирахме овулирани овоцити за кратък период (3 часа) в среда с две различни концентрации на простагландин *F2α*. Тъй като целта ни беше да проучим въздействието му в максимално опростена моделна система, не приложихме простагландина към зреещи овоцити, предпочитайки да оставим този интересен опит за по-късни изследвания.

Наблюдаваните в контролните клетки при нашето изследване цитоскелетни структури – мейотично вретено и кортикален слой от фибриларен актин,

образуващ върху него шапка, са характерни за нормалните метафазни овоцити. Тази нормална морфология се наблюдава при фиксиране на клетките веднага след извличането им от ампулите на яйцепроводите (група Контроли *Fix*) и се запазва след три часа инкубация на овоцитите в хранителна среда (Контроли 0 *PGF2α*). За разлика от тях третираните с простагландин *F2α* клетки се отличават с дегенерация както на вретеното, така и на актиновата шапка. Тези промени на цитоскелета са зависими от дозата.

В групата 50 *PGF2α*, т.е. третираните с 50 *ng*/*ml* простагландин овоцити, вретената са видимо нормални, но функцията им явно е увредена, доколкото се наблюдават отклонения в подреждането на хромозомите. Можем да направим аналогия с овоцитите при КИОА: повечето от тях притежават мейотични вретена, голяма част от които имат като цяло нормален вид, но успехът на мейотичното зреене е понижен, което предполага фини дефекти на вретеното, задействане на вретеновата контролна точка и спиране на мейозата в метафаза I. Актиновият кортекс и шапка на третираните с простагландин овоцити светят по-слабо, отколкото при контролните овоцити, което отново напомня промените при КИОА-овоцитите с изключение на липсата на „ореол“.

Известните ни литературни източници не съобщават за специфично действие на простагландин *F2α* върху микротубулите или микрофиламентите, макар че неотдавна е установено, че той дезорганизира интермедиерните филаменти в тека-клетките на жълтото тяло (S.-H. Lee & Lee, 2021). Може да се предположи, че третирането с простагландин ускорява постовулационното стареене на овоцитите, за което е известно, че води до разрушаване на мейотичното вретено и подреждането на хромозомите и намалява количеството фибриларен актин в клетъчния кортекс (Miao et al., 2018). Наблюдаваното разпръсване на хромозомите би могло да се обясни с увреждане и разпадане на вретеното. Интересно е наблюдението, че овоцитите, третирани с по-ниската концентрация на простагландин (50 *ng*/*ml*), съчетават видимо съхранено мейтично вретено с несъвършена подредба на хромозомите. Би могло да се допусне, че тези

вретена въпреки нормалния си вид са претърпели известна степен на увреждане, която не им позволява да поддържат добре подредена метафазна пластинка.

При по-високата доза простагландин – 100 *ng*/*ml* (групата 100 *PGF2α*) дегенеративните промени в овоцитния цитоскелет са очевидни и при част от клетките стигат до пълен разпад на вретеното, кортекса и актиновата шапка. Хромозомите показват дезорганизация в подреждането си, която следва да се обясни със загубата на осигурената от вретеновите нишки опора, макар че е възможно и дегенерацията на актиновия цитоскелет да играе известна роля. Следва да се има предвид и възможността хромозомите под действието на простагландина да се откачат от все още интактното вретено, а на по-късен етап микротубулите, лишени от стабилизиращото свързване с кинетохорите, да се разпадат.

Редица автори съобщават, че кумулусните клетки ускоряват стареенето на овоцитите (Zhu et al., 2015) и опосредстват нарушаването на овоцитната мейоза в присъствие на липополизахарид (Bromfield & Sheldon, 2011), както и че гените за простагландиновия рецептор се експресират в овоцитите слабо или изобщо не се експресират (Rodrigues et al., 2020). В нашето изследване обаче не се наблюдават разлики между овоцитите, инкубирани с простагландин преди или след отстраняването на кумулуса. Този резултат може да се обясни с използването на овулирани овоцити, при които мейотичното зреене е напреднало или завършило, доколкото е известно, че комуникацията между овоцита и кумулусните клетки нормално намалява на този етап (Shimada, 2012). Следователно наблюдаваните ефекти на простагландин *F2α* се основават на пряко въздействие върху овоцита.

В заключение нашето изследване показа за първи път, че простагландин *F2α*, приложен върху овулирани миши овоцити, причинява бърза дегенерация на тяхното мейотично вретено и кортикален актинов цитоскелет, както и загуба на нормалното подреждане на хромозомите и вътреклетъчните мембранни градиенти, като тези ефекти са зависими от дозата и очевидно не се опосредстват от кумулусните клетки.

5. Заключение

Резултатите от това изследване представят данни за връзка между привидно отдалечени физиологични явления – възпаление при остеоартрит и мейотично зреене на овоцитите. В контекста на хормоналната зависимост на двата процеса от взаимодействията на хипофизната стимулация чрез ФСХ и овариалния естрогенен отговор и обратна връзка, репродуктивните хормони влияят доста неоднозначно върху главните събития в яйчника – фоликулогенезата и овоцитното зреене. Използваният миши модел на КИОА предоставя възможност за оценка на влиянието както на възпалението, съпътстващо остеоартрита, така и на екзогенното третиране с репродуктивни хормони по различни схеми. Установените специфични особености на ефекта на тези фактори върху сглобяването на мейотичните вретена, подредбата на хромозомите в тях и участието на актина при създаване на полярност по време на овоцитната мейоза доказват значението на сложните взаимодействия при самостоятелно и комбинирано действие на КИОА с естрадиол и ФСХ. Особеностите на регистрираните аномалии в различните групи анализирани овоцити отразяват различни аспекти на нарушенията във фината регулация на овогенезата след третиране на КИОА животните с естрадиол и ФСХ, като отчитат и влиянието на възпалителните процеси, включително на простагландин *F2α* върху овоцитните структури. Изследванията върху комбинираното влияние на КИОА и репродуктивните хормони биха могли в бъдеще да намерят приложение за разработване на оптимални подходи при случаи на асистирана репродукция за пациентки в репродуктивна възраст и остеоартрит.

ИЗВОДИ

1. Колагеназно-индуцираният остеоартрит, като състояние на възпаление, оказва влияние върху мейотичната зрялост и цитоскелета на овулираните миши овоцити както при самостоятелно въздействие, така и след комбинирано третиране на животните с естрадиол и фоликуло-стимулиращ хормон по различни схеми.

2. Самостоятелното въздействие на КИОА причинява характерен набор от аномалии в размерите на мейотичните вретена и състоянието на актиновия цитоскелет, но въпреки това в КИОА овоцитите все пак се образуват мейотични вретена, които осигуряват правилно подреждане на хромозомите в екваториалната област през метафаза I и метафаза II.

3. Въздействието с естрадиол най-общо намалява броя получени овоцити, когато е самостоятелно или паралелно с 30-дневен КИОА, и се отразява на мейотичната зрялост и овоцитната дегенерация при всички групи с комбинирано въздействие.

4. Въздействието на естрадиол при КИОА се отразява най-меко върху цитоскелета на овоцитите: то засяга в по-ниска степен структурата на мейотичните вретена, а актиновите шапки са с морфология и размери, близки до тези при контролите.

5. Изследването установява висок добив на овоцити след третирането на животните с ФСХ по различните схеми, като същевременно качеството на овогенезата е най-силно засегнато.

6. Аномалиите на мейотичните вретена при ФСХ-групите са от различен тип, често със засягане на контактите с метафазните хромозоми, като делът дегенерирали вретена е висок. Актиновият цитоскелет е относително по-слабо засегнат.

7. При въздействие с ФСХ и КИОА се проявяват и особена група дефекти (необичайни за овулирани яйцеклетки мейотични стадии в анафаза II и телофаза II) с предполагаема апоптозна етиология, както и значим процент овоцити в преход от първо към второ мейотично делене.

8. Изследването на влиянието на медиатор на възпалението показва, че простагландин *F2α*, приложен върху овулирани миши овоцити, причинява бърза дегенерация на тяхното мейотично вретено и кортикален актинов цитоскелет, както и загуба на нормалното подреждане на хромозомите, като тези ефекти са зависими от дозата и очевидно не се опосредстват от кумулусните клетки.

ПРИНОСИ

1. Резултатите от това изследване са оригинални и, доколкото ни е известно, за първи път установяват влиянието на остеоартрит (КИОА самостоятелно и в комбинации с прилагани репродуктивни хормони) върху овогенезата и е с потенциално значение за пациентки с остеоартрит в репродуктивна възраст.

2. При миши модел на КИОА са установени специфични аномалии на овогенезата в условия на предизвикано от болестния процес възпаление, които засягат тубулиновия и актиновия цитоскелет на овулираните овоцити.

3. При третирането на опитните животни с естрадиол и ФСХ по различни схеми е установена зависимост на овогенезата от екзогенното хормонално влияние с ясно отличими и характерни особености на аномалиите в овоцитния цитоскелет и подредбата на метафазните хромозоми както при двата типа третиране, така и в групите, третирани по различни схеми с двата хормона.

4. Установените различни, но специфични за всеки от двата типа репродуктивни хормони влияния върху овогенезата при КИОА поставят въпроса за внимателно прецизиране на асистираните репродуктивни подходи в случаи на пациентки с остеоартрит.

5. Доказано е дегенеративното влияние на медиатора на възпалението простагландин *F2α* върху качеството на овулирани миши овоцити.

Приносите на работата са оригинални и имат научно-приложен характер.

ФИНАНСИРАНЕ

Изследванията са финансирани по следните научни проекти:

1. Проект № Н13/43/2017 г., Договор № ДН 13/6, 15.12.2017 г., финансиран от Фонд „Научни изследвания“ - МОН

2. Проект № 8357/ 20.11.2019 г., Договор № Д-97/ 24.06.2020, финансиран от Съвета за медицинска наука при МУ-София

3. Националната програма за научни изследвания „Млади учени и постдокторанти“, подкрепена от МОН

ПУБЛИКАЦИИ

Публикации, свързани с работата по дисертацията:

Kolarov, A., Chakarova, I., Hadzhinesheva, V., Nikolova, V., Delimitreva, S., Markova, M., & Zhivkova, R. (2022). Oocyte Morphology in a Mouse Model of Collagenase-Induced Osteoarthritis. *Acta Morphologica et Anthropologica*, *29*(3–4). https://doi.org/10.7546/AMA.29.3-4.2022.26

Kolarov, A. I., Chakarova, I. V., Hadzhinesheva, V. P., Nikolova, V. P., Delimitreva, S. M., Markova, M. D., & Zhivkova, R. S. (2021). Osteoarthritis Affects Mammalian Oogenesis: Effects of Collagenase-Induced Osteoarthritis on Oocyte Cytoskeleton in a Mouse Model. *International Journal of Inflammation*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/8428713

Kolarov, A. I., Hadzhinesheva, V. P., Chakarova, I. V., Zhivkova, R. S., Delimitreva, S. M., Markova, M. D., Mourdjeva, M. S., & Nikolova, V. P. (2021). Prostaglandin F2α Causes Fast Degenerative Changes in Ovulated Mouse Oocytes. *Folia Biologica (Czech Republic)*, *67*(5–6). https://doi.org/10.14712/FB2021067050208

ЛИТЕРАТУРА

Български език

Ганева З. Да преоткрием статистиката с IBM SPSS Statistics. Елестра, София, 2016.

Делимитрева С. Мейотично зреене на овоцитите – взаимодействие на хроматина и цитоскелетните елементи. Акушерство и гинекология. 2010; 49 (5): 51-58.

Живкова РС. За мишките и хората при изучаване на овогенезата: Роля на мишите модели в изучаването на овоцитната мейоза при бозайници – нашият опит. Реко, София, 2021.

Хаджинешева ВП. Асиметрия и полярност на овоцити от бозайници в условия на клетъчно диференциране и патология. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор". Медицински университет – София, 2018.

Английски език

Al Jord, A., Letort, G., Chanet, S., Tsai, F. C., Antoniewski, C., Eichmuller, A., Da Silva, C., Huynh, J. R., Gov, N. S., Voituriez, R., Terret, M. É., & Verlhac, M. H. (2022). Cytoplasmic forces functionally reorganize nuclear condensates in oocytes. Nature Communications, 13(1). https://doi.org/10.1038/s41467-022-32675-5

Alfaro-Aco, R., Thawani, A., & Petry, S. (2017). Structural analysis of the role of TPX2 in branching microtubule nucleation. Journal of Cell Biology, 216(4), 983–997. https://doi.org/10.1083/jcb.201607060

Almonacid, M., Ahmed, W. W., Bussonnier, M., Mailly, P., Betz, T., Voituriez, R., Gov, N. S., & Verlhac, M. H. (2015). Active diffusion positions the nucleus in mouse oocytes. Nature Cell Biology, 17(4), 470–479. https://doi.org/10.1038/ncb3131

Almonacid, M., Al Jord, A., El-Hayek, S., Othmani, A., Coulpier, F., Lemoine, S., Miyamoto, K., Grosse, R., Klein, C., Piolot, T., Mailly, P., Voituriez, R., Genovesio, A., & Verlhac, M. H. (2019). Active Fluctuations of the Nuclear Envelope Shape the Transcriptional Dynamics in Oocytes. Developmental Cell, 51(2), 145-157.e10. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.09.010

Amoako, A. O., & Pujalte, G. G. A. (2014). Osteoarthritis in young, active, and athletic individuals. In Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders (Vol. 7, pp. 27–32). Libertas Academica Ltd. https://doi.org/10.4137/CMAMD.S14386

Angioi, M., Maffulli, G. D., Mccormack, M., Morrissey, D., Chan, O., & Maffulli, N. (2013). Early Signs of Osteoarthritis in Professional Ballet Dancers: A Preliminary Study. www.cjsportmed.com

Appiah Adu-Gyamfi, E., Tanam Djankpa, F., Nelson, W., Czika, A., Kumar Sah, S., Lamptey, J., Ding, Y. Bin, & Wang, Y. X. (2020). Activin and inhibin signaling: From regulation of physiology to involvement in the pathology of the female reproductive system. In Cytokine (Vol. 133). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155105

Azoury, J., Lee, K. W., Georget, V., Rassinier, P., Leader, B., & Verlhac, M. H. (2008). Spindle Positioning in Mouse Oocytes Relies on a Dynamic Meshwork of Actin Filaments. Current Biology, 18(19), 1514–1519. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.044

Babaei, M., Javadian, Y., Narimani, H., Ranaei, M., Heidari, B., Basereh, H., Gholinia, H., & Firouzjahi, A. (2019). Correlation between systemic markers of inflammation and local synovitis in knee osteoarthritis. Caspian Journal of Internal Medicine, 10(4), 383–387. https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.383

Balboula, A. Z., Nguyen, A. L., Gentilello, A. S., Quartuccio, S. M., Drutovic, D., Solc, P., & Schindler, K. (2016). Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. Journal of Cell Science, 129(19), 3648–3660. https://doi.org/10.1242/jcs.189340

Balboula, A. Z., & Schindler, K. (2014). Selective Disruption of Aurora C Kinase Reveals Distinct Functions from Aurora B Kinase during Meiosis in Mouse Oocytes. PLoS Genetics, 10(2). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004194

Banerjee, J., Sharma, R., Agarwal, A., Maitra, D., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2012). Il-6 and mouse oocyte spindle. PLoS ONE, 7(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035535

Baumann, C., Wang, X., Yang, L., & Viveiros, M. M. (2017). Error-prone meiotic division and subfertility in mice with oocyte-conditional knockdown of pericentrin. Journal of Cell Science, 130(7), 1251–1262. https://doi.org/10.1242/jcs.196188

Beaudet, D., Pham, N., Skaik, N., & Piekny, A. (2020). Importin binding mediates the intramolecular regulation of anillin during cytokinesis. Molecular Biology of the Cell, 31(11), 1124–1139. https://doi.org/10.1091/MBC.E20-01-0006

Belenska-Todorova, L., Zhivkova, R., Markova, M., & Ivanovska, N. (2021). Follicle stimulating hormone and estradiol alter immune response in osteoarthritic mice in an opposite manner. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 35. https://doi.org/10.1177/20587384211016198

Bennabi, I., Terret, M. E., & Verlhac, M. H. (2016). Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. Journal of Cell Biology, 215(5), 611–619. https://doi.org/10.1083/jcb.201607062

Berenbaum, F., Eymard, F., & Houard, X. (2013). Osteoarthritis, inflammation and obesity. In Current Opinion in Rheumatology (Vol. 25, Issue 1, pp. 114–118). https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835a9414

Biggers, J. D. (2012). IVF and embryo transfer: Historical origin and development. In Reproductive BioMedicine Online (Vol. 25, Issue 2, pp. 118–127). https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.04.011

Black, A. L., & Clark, A. L. (2022). Sexual dimorphism in knee osteoarthritis: Biomechanical variances and biological influences. In Journal of Orthopaedics (Vol. 32, pp. 104–108). Reed Elsevier India Pvt. Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jor.2022.05.016

Boots, C. E., & Jungheim, E. S. (2015). Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. Seminars in Reproductive Medicine, 33(4), 270–275. https://doi.org/10.1055/s-0035-1554928

Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Suwik, K., Staszkiewicz-Chodor, J., Jaworska, J., Lukaszuk, K., & Woclawek-Potocka, I. (2020). Prostaglandin E2 affects in vitro maturation of bovine oocytes. Reproductive Biology and Endocrinology, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12958-020-00598-9

Bousfield, G. R., Butnev, V. Y., Rueda-Santos, M. A., Brown, A., Hall, A. S., & Harvey, D. J. (2014). Macro- and Micro-heterogeneity in Pituitary and Urinary Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation. Journal of Glycomics & Lipidomics, 4. https://doi.org/10.4172/2153-0637.1000125

Bromfield, J. J., & Sheldon, I. M. (2011). Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. Endocrinology, 152(12), 5029–5040. https://doi.org/10.1210/en.2011-1124

Brunet, S., Dumont, J., Lee, K. W., Kinoshita, K., Hikal, P., Gruss, O. J., Maro, B., & Verlhac, M. H. (2008). Meiotic regulation of TPX2 protein levels governs cell cycle progression in mouse oocytes. PLoS ONE, 3(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003338

Butnev, V. Y., Butnev, V. Y., May, J. V, Shuai, B., Tran, P., White, W. K., Brown, A., Smalter Hall, A., Harvey, D. J., & Bousfield, G. R. (2015). Production, purification, and characterization of recombinant hFSH glycoforms for functional studies. Molecular and Cellular Endocrinology, 405, 42–51. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.026

Cadenas, J., Poulsen, L. C., Nikiforov, D., Grøndahl, M. L., Kumar, A., Bahnu, K., Englund, A. L. M., Malm, J., Marko-Varga, G., Pla, I., Sanchez, A., Pors, S. E., & Yding Andersen, C. (2023). Regulation of human oocyte maturation in vivo during the final maturation of follicles. Human Reproduction, 38(4), 686–700. https://doi.org/10.1093/humrep/dead024

Candelaria, J. I., Rabaglino, M. B., & Denicol, A. C. (2020). Ovarian preantral follicles are responsive to FSH as early as the primary stage of development. Journal of Endocrinology, 247(2), 153–168. https://doi.org/10.1530/JOE-20-0126

Cao, Y. K., Zhong, Z. S., Chen, D. Y., Zhang, G. X., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2005). Cell cycle-dependent localization and possible roles of the small GTPase Ran in

mouse oocyte maturation, fertilization and early cleavage. Reproduction, 130(4), 431–440. https://doi.org/10.1530/rep.1.00391

Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): From easy rider to the godfather of mitosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(12), 789–803. https://doi.org/10.1038/nrm3474

Charpigny, G., Marquant-Le Guienne, B., Richard, C., Adenot, P., Dubois, O., Gélin, V., Peynot, N., Daniel, N., Brochard, V., & Nuttinck, F. (2021). PGE2 Supplementation of Oocyte Culture Media Improves the Developmental and Cryotolerance Performance of Bovine Blastocysts Derived From a Serum-Free in vitro Production System, Mirroring the Inner Cell Mass Transcriptome. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.672948

Cheeseman, L. P., Boulanger, J., Bond, L. M., & Schuh, M. (2016). Two pathways regulate cortical granule translocation to prevent polyspermy in mouse oocytes. Nature Communications, 7. https://doi.org/10.1038/ncomms13726

Chen, M. H., Liu, Y., Wang, Y. L., Liu, R., Xu, B. H., Zhang, F., Li, F. P., Xu, L., Lin, Y. H., He, S. W., Liao, B. Q., Fu, X. P., Wang, X. X., Yang, X. J., & Wang, H. L. (2016). KIF2A regulates the spindle assembly and the metaphase I-Anaphase i transition in mouse oocyte. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep39337

Clark, Z. L., Ruebel, M. L., Schall, P. Z., Karl, K. R., Ireland, J. J., & Latham, K. E. (2022). Follicular Hyperstimulation Dysgenesis: New Explanation for Adverse Effects of Excessive FSH in Ovarian Stimulation. Endocrinology (United States), 163(9). https://doi.org/10.1210/endocr/bqac100

Clarke, P. R., & Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. In Nature Reviews Molecular Cell Biology (Vol. 9, Issue 6, pp. 464–477). https://doi.org/10.1038/nrm2410

Clift, D., & Schuh, M. (2015). A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. Nature Communications, 6. https://doi.org/10.1038/ncomms8217

Conduit, P. T., Wainman, A., & Raff, J. W. (2015). Centrosome function and assembly in animal cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16(10), 611–624. https://doi.org/10.1038/nrm4062

Converse, A., Liu, Z., Patel, J. C., Shakyawar, S., Guda, C., Bousfield, G. R., Kumar, T. R., & Duncan, F. E. (2023). Oocyte quality is enhanced by hypoglycosylated FSH through increased cell-to-cell interaction during mouse follicle development. Development, 150(22), dev202170. https://doi.org/10.1242/dev.202170

Couse, J. F., Yates, M. M., Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2005). Estrogen receptor-β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. Endocrinology, 146(8), 3247–3262. https://doi.org/10.1210/en.2005-0213

Danfeng, D., Ke, D., Dengxuan, F., Xuelian, L., & Congjian, X. (2023). Oocyte quality is impaired in a hyperandrogenic PCOS mouse model by increased Foxo1 expression. Reproductive Biology, 23(4), 100812. https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2023.100812

Dehapiot, B., Carrière, V., Carroll, J., & Halet, G. (2013). Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion and asymmetric division in mouse oocytes. Developmental Biology, 377(1), 202–212. https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2013.01.029

Deng, M., Suraneni, P., Schultz, R. M., & Li, R. (2007). The Ran GTPase Mediates Chromatin Signaling to Control Cortical Polarity during Polar Body Extrusion in Mouse Oocytes. Developmental Cell, 12(2), 301–308. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.11.008

Drummond, A. E., & Findlay, J. K. (1999). The role of estrogen in folliculogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology, 151(1–2), 57–64. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00038-6

Drutovic, D., Duan, X., Li, R., Kalab, P., & Solc, P. (2020). Ran GTP and importin β regulate meiosis I spindle assembly and function in mouse oocytes . The EMBO Journal, 39(1). https://doi.org/10.15252/embj.2019101689

Duan, X., Li, Y., Yi, K., Guo, F., Wang, H. Y., Wu, P. H., Yang, J., Mair, D. B., Morales, E. A., Kalab, P., Wirtz, D., Sun, S. X., & Li, R. (2020). Dynamic organelle distribution initiates actin-based spindle migration in mouse oocytes. Nature Communications, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-14068-3

Duan, X., & Sun, S. C. (2019). Actin cytoskeleton dynamics in mammalian oocyte meiosis. Biology of Reproduction, 100(1), 15–24. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy163

Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., & Curry, T. E. (2019). Ovulation: Parallels with inflammatory processes. In Endocrine Reviews (Vol. 40, Issue 2, pp. 369–416). Oxford University Press. https://doi.org/10.1210/er.2018-00075

Dumont, J., Petri, S., Pellegrin, F., Terret, M. E., Bohnsack, M. T., Rassinier, P., Georget, V., Kalab, P., Gruss, O. J., & Verlhac, M. H. (2007). A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. Journal of Cell Biology, 176(3), 295–305. https://doi.org/10.1083/jcb.200605199

Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., & Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ERα) and β (ERβ) on mouse reproductive phenotypes. Development, 127(19), 4277–4291. https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4277

Eitner, A., Hofmann, G. O., & Schaible, H. G. (2017). Mechanisms of osteoarthritic pain. Studies in humans and experimental models. In Frontiers in Molecular Neuroscience (Vol. 10). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00349

Espey, L. L. (1980). Ovulation as an Inflammatory Reaction - A Hypothesis. Biology of Reproduction, 22(1), 73–106. https://doi.org/10.1095/biolreprod22.1.73

Fei, C., & Zhou, L. (2022). Gene mutations impede oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. BioEssays, 44(10), 2200007. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bies.202200007

Feng, Y., Qi, J., Xue, X., Li, X., Liao, Y., Sun, Y., Tao, Y., Yin, H., Liu, W., Li, S., & Huang, R. (2022). Follicular free fatty acid metabolic signatures and their effects on oocyte competence in non-obese PCOS patients. Reproduction, 164. https://doi.org/10.1530/REP-22-0023

Ferin, M. (2008). The Hypothalamic-Hypophyseal-Ovarian Axis and the Menstrual Cycle. The Global Library of Women's Medicine. https://doi.org/10.3843/glowm.10283

FOWLER, R. E., & EDWARDS, R. G. (1957). INDUCTION OF SUPEROVULATION AND PREGNANCY IN MATURE MICE BY GONADOTROPHINS. Journal of Endocrinology, 15(4), 374–384. https://doi.org/10.1677/joe.0.0150374

Galvão, A. M., Skarzynski, D., & Ferreira-Dias, G. (2018). Luteolysis and the Auto-, Paracrine Role of Cytokines From Tumor Necrosis Factor α and Transforming Growth Factor β Superfamilies. In Vitamins and Hormones (Vol. 107, pp. 287–315). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.001

Ganova, P., Belenska, L., & Ivanovska, N. (2023). Effect of Estradiol on Chondrocytes in the Active Stage of Collagenase- Induced Osteoarthritis. Current Bioactive Compounds, 19. https://doi.org/10.2174/1573407218666220118094935

George, O., Johnston, M. A., & Shuster, C. B. (2006). Aurora B Kinase Maintains Chromatin Organization During the MI to MII Transition in Surf Clam Oocytes. Cell Cycle, 5(22), 2648–2656. https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3444

Gruss, O. J. (2018). Animal female meiosis: The challenges of eliminating centrosomes. Cells, 7(7). https://doi.org/10.3390/cells7070073

Guo, J., Zhang, T., Guo, Y., Sun, T., Li, H., Zhang, X., Yin, H., Cao, G., Yin, Y., Wang, H., Shi, L., Guo, X., Sha, J., Eppig, J. J., & Su, Y. Q. (2018). Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(23), E5326–E5333. https://doi.org/10.1073/pnas.1800352115

Guo, Z., & Yu, Q. (2019). Role of mTOR Signaling in Female Reproduction. In Frontiers in Endocrinology (Vol. 10). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00692

Hackney, A. J., Klinedinst, N. J., Resnick, B., & Johantgen, M. (2019). Association of Systemic Inflammation and Fatigue in Osteoarthritis: 2007−2010 National Health and Nutrition Examination Survey. Biological Research For Nursing, 21(5), 532–543. https://doi.org/10.1177/1099800419859091

Harasimov, K., Uraji, J., Mönnich, E. U., Holubcová, Z., Elder, K., Blayney, M., & Schuh, M. (2023). Actin-driven chromosome clustering facilitates fast and complete chromosome capture in mammalian oocytes. Nature Cell Biology, 25(3), 439–452. https://doi.org/10.1038/s41556-022-01082-9

Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. In Journal of Endocrinology (Vol. 238, Issue 3, pp. R173–R183). BioScientifica Ltd. https://doi.org/10.1530/JOE-18-0108

Hartshorne, G. M., Lyrakou, S., Hamoda, H., Oloto, E., & Ghafari, F. (2009). Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: What are the criteria for oocyte selection? Molecular Human Reproduction, 15(12), 805–819. https://doi.org/10.1093/molehr/gap055

Hauf, S., & Watanabe, Y. (2004). Kinetochore Orientation in Mitosis and Meiosis. Cell, 119(3), 317–327. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.014

Hayes, E., Winston, N., & Stocco, C. (2024). Molecular crosstalk between insulin-like growth factors and follicle-stimulating hormone in the regulation of granulosa cell function. In Reproductive Medicine and Biology (Vol. 23, Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/rmb2.12575

Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2015). Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. Science, 348(6239), 1143–1147. https://doi.org/10.1126/science.aaa9529

Holubcová, Z., Howard, G., & Schuh, M. (2013). Vesicles modulate an actin network for asymmetric spindle positioning. Nature Cell Biology, 15(8), 937–947. https://doi.org/10.1038/ncb2802

Hunzicker-Dunn, M., & Mayo, K. (2015). Gonadotropin Signaling in the Ovary. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set, 1, 895–945. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00020-X

Hussain, S. M., Ackerman, I. N., Wang, Y., Zomer, E., & Cicuttini, F. M. (2018). Could low birth weight and preterm birth be associated with significant burden of hip osteoarthritis? A systematic review. In Arthritis Research and Therapy (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13075-018-1627-7

Hussain, S. M., Wang, Y., Giles, G. G., Graves, S., Wluka, A. E., & Cicuttini, F. M. (2018). Female Reproductive and Hormonal Factors and Incidence of Primary Total Knee Arthroplasty Due to Osteoarthritis. Arthritis & Rheumatology, 70(7), 1022–1029. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/art.40483

Ishikawa-Yamauchi, Y., Emori, C., Mori, H., Endo, T., Kobayashi, K., Watanabe, Y., Sagara, H., Nagata, T., Motooka, D., Ninomiya, A., Ozawa, M., & Ikawa, M. (2024). Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice. Communications Biology, 7(1). https://doi.org/10.1038/s42003-024-07305-z

Ismail, N., Garas, P., & Blaustein, J. D. (2011). Long-term effects of pubertal stressors on female sexual receptivity and estrogen receptor-α expression in CD-1 female mice. Hormones and Behavior, 59(4), 565–571. https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2011.02.010

Ito, H., Emori, C., Kobayashi, M., Maruyama, N., Fujii, W., Naito, K., & Sugiura, K. (2022). Cooperative effects of oocytes and estrogen on the forkhead box L2 expression in mural granulosa cells in mice. Scientific Reports, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-24680-x

Ivanovska, N., & Dimitrova, P. (2011). Bone resorption and remodeling in murine collagenase-induced osteoarthritis after administration of glucosamine. Arthritis Research and Therapy, 13(2). https://doi.org/10.1186/ar3283

Jing, L., & Kwok, H. F. (2022). The intricate roles of RCC1 in normal cells and cancer cells. Biochemical Society Transactions, 50(1), 83–93. https://doi.org/10.1042/BST20210861

Jo, Y. J., Jang, W. I., Kim, N. H., & Namgoong, S. (2016). Tropomodulin-3 is essential in asymmetric division during mouse oocyte maturation. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep29204

Joukov, V., Walter, J. C., & De Nicolo, A. (2014). The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. Molecular Cell, 55(4), 578–591. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.016

Jurisicova, A., Lee, H. J., D'Estaing, S. G., Tilly, J., & Perez, G. I. (2006). Molecular requirements for doxorubicin-mediated death in murine oocytes. Cell Death and Differentiation, 13(9), 1466–1474. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401819

Kalichman, L., & Kobyliansky, E. (2007). Age, body composition, and reproductive indices as predictors of radiographic hand osteoarthritis in Chuvashian women. Scandinavian Journal of Rheumatology, 36(1), 53–57. https://doi.org/10.1080/03009740600902460

Kanda, S. (2019). Evolution of the regulatory mechanisms for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates–hypothesis from a comparative view. General and Comparative Endocrinology, 284, 113075. https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2018.11.014

Kim, H. M., Kang, M. K., Seong, S. Y., Jo, J. H., Kim, M. J., Shin, E. K., Lee, C. G., & Han, S. J. (2023). Meiotic Cell Cycle Progression in Mouse Oocytes: Role of Cyclins. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 24, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms241713659

Kincade, J. N., Hlavacek, A., Akera, T., & Balboula, A. Z. (2023). C E L L B I O LO G Y Initial spindle positioning at the oocyte center protects against incorrect kinetochore-microtubule attachment and aneuploidy in mice.

Knight, P. G., Satchell, L., & Glister, C. (2012). Intra-ovarian roles of activins and inhibins. Molecular and Cellular Endocrinology, 359(1–2), 53–65. https://doi.org/10.1016/J.MCE.2011.04.024

Knights, A. J., Redding, S. J., & Maerz, T. (2023). Inflammation in osteoarthritis: The latest progress and ongoing challenges. In Current Opinion in Rheumatology (Vol. 35, Issue 2, pp. 128–134). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000923

Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L., & Agard, D. A. (2011). Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. In Nature Reviews Molecular Cell Biology (Vol. 12, Issue 11, pp. 709–721). https://doi.org/10.1038/nrm3209

Kotak, S., & Gönczy, P. (2013). Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight. Current Opinion in Cell Biology, 25(6), 741–748. https://doi.org/10.1016/J.CEB.2013.07.008

Kristensen, S. G., Mamsen, L. S., Jeppesen, J. V., Bøtkjær, J. A., Pors, S. E., Borgbo, T., Ernst, E., Macklon, K. T., & Andersen, C. Y. (2018). Hallmarks of human small antral follicle development: Implications for regulation of ovarian steroidogenesis and selection of the dominant follicle. Frontiers in Endocrinology, 8(JAN). https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00376

Kyogoku, H., & Kitajima, T. S. (2017). Large Cytoplasm Is Linked to the Error-Prone Nature of Oocytes. Developmental Cell, 41(3), 287-298.e4. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2017.04.009

Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E. V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I. K., Dontas, I., & Papaioannou, N. A. (2014). Useful animal models for the research of osteoarthritis. In European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology (Vol. 24, Issue 3, pp. 263–271). Springer-Verlag France. https://doi.org/10.1007/s00590-013-1205-2

Lee, C., & Oh, J. S. (2025). Novel BRCA1–PLK1–CIP2A axis orchestrates homologous recombination-mediated DNA repair to maintain chromosome integrity during oocyte meiosis. Nucleic Acids Research, 53(2). https://doi.org/10.1093/nar/gkae1207

Lee, I.-W., Jo, Y.-J., Jung, S.-M., Wang, H.-Y., Kim, N.-H., & Namgoong, S. (2018). Distinct roles of Cep192 and Cep152 in acentriolar MTOCs and spindle formation during mouse oocyte maturation. The FASEB Journal, 32(2), 625–638. https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.201700559RR

Lee, S.-H., & Lee, S. (2021). Prostaglandin F2 Alpha Triggers the Disruption of Cell Adhesion with Cytokeratin and Vimentin in Bovine Luteal Theca Cells. Animals, 11(4), 1073. https://doi.org/10.3390/ani11041073

Li, H., Guo, F., Rubinstein, B., & Li, R. (2008). Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. Nature Cell Biology, 10(11), 1301–1308. https://doi.org/10.1038/ncb1788

Liao, W., & Lauga, E. (2024). Hydrodynamic mechanism for stable spindle positioning in meiosis II oocytes. https://doi.org/10.1103/PRXLife.2.043003

Liu, X. J. (2012). Polar body emission. Cytoskeleton, 69(10), 670–685. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cm.21041

Liu, Y., Min, Y., Liu, Y., & Watanabe, Y. (2024). Phosphorylation of Rec8 cohesin complexes regulates mono-orientation of kinetochores in meiosis I. Life Science Alliance, 7(5). https://doi.org/10.26508/lsa.202302556

Liu, Y., Zhang, M., Kong, D., Wang, Y., Li, J., Liu, W., Fu, Y., & Xu, J. (2020). High follicle-stimulating hormone levels accelerate cartilage damage of knee osteoarthritis in postmenopausal women through the PI3K/AKT/NF-κB pathway. FEBS Open Bio, 10(10), 2235–2245. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12975

Londoño-Vásquez, D., Rodriguez-Lukey, K., Behura, S. K., & Balboula, A. Z. (2022). Microtubule organizing centers regulate spindle positioning in mouse oocytes. Developmental Cell, 57(2), 197-211.e3. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.12.011

Lopes, E. B. P., Filiberti, A., Husain, S. A., & Humphrey, M. B. (2017). Immune Contributions to Osteoarthritis. In Current Osteoporosis Reports (Vol. 15, Issue 6, pp. 593–600). Current Medicine Group LLC 1. https://doi.org/10.1007/s11914-017-0411-y

Lorenz, J., & Grässel, S. (2014). Experimental osteoarthritis models in mice. Methods in Molecular Biology, 1194, 401–419. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1215-5_23

Lu, W., & Gelfand, V. I. (2023). Go with the flow – bulk transport by molecular motors. In Journal of Cell Science (Vol. 136, Issue 5). Company of Biologists Ltd. https://doi.org/10.1242/jcs.260300

Maro, B., Howlett, S. K., & Webb, M. (n.d.). Non-Spindle Microtubule Organizing Centers in Metaphase II-arrested Mouse Oocytes.

Marston, A. L., & Wassmann, K. (2017). Multiple duties for spindle assembly checkpoint kinases in meiosis. In Frontiers in Cell and Developmental Biology (Vol. 5, Issue DEC). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00109

Martins, N. F. E., Seixas, M. I., Pereira, J. P., Costa, M. M., & Fonseca, J. E. (2017). Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. Clinical Rheumatology, 36(12), 2853–2854. https://doi.org/10.1007/s10067-017-3797-0

Matzuk MM, K. T. S. W. C. K. L. A. B. R. F. M. (1996). Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. Recent Progress in Hormone Research., 51(51:123-54; discussion 155-7.), 123–157.

Mazerbourg, S., & Monget, P. (2018). Insulin-like growth factor binding proteins and IGFBP proteases: A dynamic system regulating the ovarian folliculogenesis. In Frontiers in Endocrinology (Vol. 9, Issue MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00134

McNally, F. J. (2013). Mechanisms of spindle positioning. In Journal of Cell Biology (Vol. 200, Issue 2, pp. 131–140). https://doi.org/10.1083/jcb.201210007

Meng, L., Park, J.-E., Kim, T.-S., Lee, E. H., Park, S.-Y., Zhou, M., Bang, J. K., & Lee, K. S. (2015). Bimodal Interaction of Mammalian Polo-Like Kinase 1 and a Centrosomal Scaffold, Cep192, in the Regulation of Bipolar Spindle Formation. Molecular and Cellular Biology, 35(15), 2626–2640. https://doi.org/10.1128/mcb.00068-15

Miao, Y., Zhou, C., Cui, Z., Zhang, M., ShiYang, X., Lu, Y., & Xiong, B. (2018). Postovulatory aging causes the deterioration of porcine oocytes via induction of oxidative stress. FASEB Journal, 32(3), 1328–1337. https://doi.org/10.1096/fj.201700908R

Mitchison, T. J. (2020). Cell Biology: Size Scaling of Mitotic Spindles. In Current Biology (Vol. 30, Issue 24, pp. R1476–R1478). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.047

Mogessie, B., & Schuh, M. (2017). Actin protects mammalian eggs against chromosome segregation errors. Science, 357(6353). https://doi.org/10.1126/science.aal1647

Montaville, P., Jégou, A., Pernier, J., Compper, C., Guichard, B., Mogessie, B., Schuh, M., Romet-Lemonne, G., & Carlier, M. F. (2014). Spire and Formin 2 Synergize and Antagonize in Regulating Actin Assembly in Meiosis by a Ping-Pong Mechanism. PLoS Biology, 12(2). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001795

Mora, J. M., Fenwick, M. A., Castle, L., Baithun, M., Ryder, T. A., Mobberley, M., Carzaniga, R., Franks, S., & Hardy, K. (2012). Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. Biology of Reproduction, 86(5). https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096156

Namgoong, S., Kim, N. H., & Christenson, L. K. (2018). Meiotic spindle formation in mammalian oocytes: Implications for human infertility. In Biology of Reproduction (Vol. 98, Issue 2, pp. 153–161). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/biolre/iox145

Namwanje, M., & Brown, C. W. (2016). Activins and inhibins: Roles in development, physiology, and disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8(7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021881

Nascimento, B. C., Ferreira, C. S., Oliveira, S. P., Pereira, L. A. A. C., Lopes, G. A., Nogueira, J. M., Paula, R. S., Jorge, E. C., & Campos-Junior, P. H. A. (2024). Naproxen administration affects murine late folliculogenesis, reduces granulosa cell proliferation and the number of ovulated oocytes. Reproductive Toxicology, 124, 108527. https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2023.108527

Nguyen, A. L., Marin, D., Zhou, A., Gentilello, A. S., Smoak, E. M., Cao, Z., Fedick, A., Wang, Y., Taylor, D., Scott, R. T., Xing, J., Treff, N., & Schindler, K. (2017). Identification and characterization of aurora kinase B and C variants associated with maternal aneuploidy. Molecular Human Reproduction, 23(6), 406–416. https://doi.org/10.1093/molehr/gax018

Nikalayevich, E., & Terret, M. E. (2023). Meiosis: Actin and microtubule networks drive chromosome clustering in oocytes. Current Biology, 33(7), R272–R274. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2023.02.061

Nikolova, V., Zhivkova, R., Markova, M., & Delimitreva, S. (2012). Characterization of mouse oocytes and oocyte-cumulus complexes extracted for nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF). 149–152.

Nippoldtt, T. B., Reame, N. E., Kelch, R. P., & Marshall, J. C. (1989). The Roles of Estradiol and Progesterone in Decreasing Luteinizing Hormone Pulse Frequency in the Luteal Phase of the Menstrual Cycle*. In Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Copyright© (Vol. 69, Issue 1).

Orlowsky, E. W., & Kraus, V. B. (2015). The role of innate immunity in osteoarthritis: When our first line of defense goes on the offensive. In Journal of Rheumatology (Vol. 42, Issue 3, pp. 363–371). Journal of Rheumatology. https://doi.org/10.3899/jrheum.140382

Otani, Y., Ichii, O., Otsuka-Kanazawa, S., Chihara, M., Nakamura, T., & Kon, Y. (2015). MRL/MpJ-Faslpr mice show abnormalities in ovarian function and morphology with the progression of autoimmune disease. Autoimmunity, 48(6), 402–411. https://doi.org/10.3109/08916934.2015.1031889

Padmanabhan, V., Battaglia, D., Brown, M. B., Karsch, F. J., Lee, J. S., Pan, W., Phillips, D. J., & Cleeff, J. Van. (2002). Neuroendocrine Control of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Secretion: II. Is Follistatin-Induced Suppression of FSH Secretion Mediated via Changes in Activin Availability and Does It Involve Changes in Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion? 1. In BIOLOGY OF REPRODUCTION (Vol. 66). http://www.biolreprod.org

Palinska-Rudzka, K., & Mathur, R. (2023). Principles of controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, 33(4), 91–96. https://doi.org/10.1016/J.OGRM.2023.01.006

Patterson, B. E., Girdwood, M. A., West, T. J., Bruder, A. M., Øiestad, B. E., Juhl, C., & Culvenor, A. G. (2023). Muscle strength and osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. In Skeletal Radiology (Vol. 52, Issue 11, pp. 2085–2097). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00256-022-04266-4

Peng, L., He, Y., Wang, W., Dai, J., Li, Q., & Ju, S. (2024). PAK1-Dependent Regulation of Microtubule Organization and Spindle Migration Is Essential for the Metaphase I–Metaphase II Transition in Porcine Oocytes. Biomolecules, 14(2). https://doi.org/10.3390/biom14020237

Perez, G. I., Tao, X.-J., & Tilly, J. L. (1999). Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. Molecular Human Reproduction, 5(5), 414–420. https://doi.org/10.1093/molehr/5.5.414

Peshkova, M., Lychagin, A., Lipina, M., Di Matteo, B., Anzillotti, G., Ronzoni, F., Kosheleva, N., Shpichka, A., Royuk, V., Fomin, V., Kalinsky, E., Timashev, P., & Kon, E. (2022). Gender-Related Aspects in Osteoarthritis Development and Progression: A Review. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 23, Issue 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms23052767

Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., & Schuh, M. (2011). Spire-type actin nucleators cooperate with formin-2 to drive asymmetric oocyte division. Current Biology, 21(11), 955–960. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.029

Poulet, B. (2016). Non-invasive Loading Model of Murine Osteoarthritis. In Current Rheumatology Reports (Vol. 18, Issue 7). Current Medicine Group LLC 1. https://doi.org/10.1007/s11926-016-0590-z

Prasad, S., Tiwari, M., Koch, B., & Chaube, S. K. (2015). Morphological, cellular and molecular changes during postovulatory egg aging in mammals. In Journal of Biomedical Science (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12929-015-0143-1

Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M. K., Cooper, C., Diez-Perez, A., & Arden, N. K. (2014). Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: Influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. Annals of the Rheumatic Diseases, 73(9), 1659–1664. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203355

Prodanova Hadzhinesheva, V., Valcheva Chakarova, I., Metodieva Delimitreva, S., Dyankova Markova, M., Pantaleeva Nikolova, V., Sergeeva Mourdjeva, M., Istiliyanov Rashev, P., & Stefanova Zhivkova, R. (2018a). Centriolar satellites associate with condensed chromatin in early mouse oocytes and undergo redistribution during transition to dictyate. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 32(6), 1622–1626. https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1541761

Prodanova Hadzhinesheva, V., Valcheva Chakarova, I., Metodieva Delimitreva, S., Dyankova Markova, M., Pantaleeva Nikolova, V., Sergeeva Mourdjeva, M., Istiliyanov Rashev, P., & Stefanova Zhivkova, R. (2018b). Centriolar satellites associate with condensed chromatin in early mouse oocytes and undergo redistribution during transition to dictyate. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 32(6), 1622–1626. https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1541761

Rieckhoff, E. M., Berndt, F., Elsner, M., Golfier, S., Decker, F., Ishihara, K., & Brugués, J. (2020). Spindle Scaling Is Governed by Cell Boundary Regulation of Microtubule Nucleation. Current Biology, 30(24), 4973-4983.e10. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.10.093

Roberts, R., Iatropoulou, A., Ciantar, D., Stark, J., Becker, D. L., Franks, S., & Hardy, K. (2005). Follicle-Stimulating Hormone Affects Metaphase I Chromosome Alignment and Increases Aneuploidy in Mouse Oocytes Matured in Vitro1.

Biology of Reproduction, 72(1), 107–118. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032003

Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. In Nature Reviews Rheumatology (Vol. 12, Issue 10, pp. 580–592). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.136

Rodrigues, S. A. D., Pontelo, T. P., Kussano, N. R., Kawamoto, T. S., Leme, L. O., Caixeta, F. M. C., Pfeifer, L. F. M., Franco, M. M., & Dode, M. A. N. (2020). Effects of Prostaglandins E2 and F2α on the in vitro maturation of bovine oocytes. Domestic Animal Endocrinology, 72. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106447

Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Largo, R., & Herrero-Beaumont, G. (2009). Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. In Arthritis Research and Therapy (Vol. 11, Issue 5). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/ar2791

Saatcioglu, H. D., Cuevas, I., & Castrillon, D. H. (2016). Control of Oocyte Reawakening by Kit. PLoS Genetics, 12(8). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006215

Samvelyan, H. J., Hughes, D., Stevens, C., & Staines, K. A. (2021). Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. In Calcified Tissue International (Vol. 109, Issue 3, pp. 243–256). Springer. https://doi.org/10.1007/s00223-020-00670-x

Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1822(12), 1896–1912. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013

Schuh, M. (2011). An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. Nature Cell Biology, 13(12), 1431–1436. https://doi.org/10.1038/ncb2353

Schuh, M., & Ellenberg, J. (2007). Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. Cell, 130(3), 484–498. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.025

Schuh, M., & Ellenberg, J. (2008). A New Model for Asymmetric Spindle Positioning in Mouse Oocytes. Current Biology, 18(24), 1986–1992. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.022

Segal, N. A., Nilges, J. M., & Oo, W. M. (2024). Sex differences in osteoarthritis prevalence, pain perception, physical function and therapeutics. Osteoarthritis and Cartilage, 32(9), 1045–1053. https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2024.04.002

Sen, A., Prizant, H., Light, A., Biswas, A., Hayes, E., Lee, H. J., Barad, D., Gleicher, N., & Hammes, S. R. (2014). Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b

expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(8), 3008–3013. https://doi.org/10.1073/pnas.1318978111

Severson, A. F., von Dassow, G., & Bowerman, B. (2016). Oocyte Meiotic Spindle Assembly and Function. In Current Topics in Developmental Biology (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.031

Sharif, B., Na, J., Lykke-Hartmann, K., McLaughlin, S. H., Laue, E., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2010). The chromosome passenger complex is required for fidelity of chromosome transmission and cytokinesis in meiosis of mouse oocytes. Journal of Cell Science, 123(24), 4292–4300. https://doi.org/10.1242/jcs.067447

Sheibani-Rad, S., Wolfe, S., & Jupiter, J. (2013). Hand disorders in musicians. The Bone & Joint Journal, 95-B(2), 146–150. https://doi.org/doi:10.1302/0301-620X.95B2.30092

Shimada, M. (2012). Regulation of oocyte meiotic maturation by somatic cells. In Reproductive Medicine and Biology (Vol. 11, Issue 4, pp. 177–184). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1007/s12522-012-0130-0

Shimizu, T., Kayamori, T., Murayama, C., & Miyamoto, A. (2012). Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC. Biochemical and Biophysical Research Communications, 417(2), 869–873. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.12.064

Shirasu-Hiza, M., Perlman, Z. E., Wittmann, T., Karsenti, E., & Mitchison, T. J. (1941). Eg5 Causes Elongation of Meiotic Spindles When Flux-Associated Microtubule Depolymerization Is Blocked of a lack of reagents blocking depolymerization at poles. Xenopus extracts recapitulate egg meiosis II spindle. Current Biology, 14. https://doi.org/10.1016/j

Silva, M. S. B., & Giacobini, P. (2021). New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. In Cellular and Molecular Life Sciences (Vol. 78, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x

Simerly, C., Manil-Ségalen, M., Castro, C., Hartnett, C., Kong, D., Verlhac, M. H., Loncarek, J., & Schatten, G. (2018). Separation and Loss of Centrioles From Primordidal Germ Cells To Mature Oocytes In The Mouse. Scientific Reports, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-31222-x

Solc, P., Kitajima, T. S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J., & Ellenberg, J. (2015). Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. PLoS ONE, 10(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116783

Son WY, D. M. S.-P. E. H. H. (2011). Mechanisms of follicle selection and development. Minerva Ginecologica, 63(2), 89–102.

Soto, P., Natzke, R. P., & Hansen, P. J. (2003). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F 2a , and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, 50, 263–272.

Stevens-Lapsley, J. E., & Kohrt, W. M. (2010). Osteoarthritis in women: Effects of estrogen, obesity and physical activity. In Women's Health (Vol. 6, Issue 4, pp. 601–615). https://doi.org/10.2217/whe.10.38

Sugino, N., Karube-Harada, A., Taketani, T., Sakata, A., & Nakamura, Y. (2004). Withdrawal of Ovarian Steroids Stimulates Prostaglandin F2α Production Through Nuclear Factor-κB Activation via Oxygen Radicals in Human Endometrial Stromal Cells: Potential Relevance to Menstruation. In Journal of Reproduction and Development (Vol. 50, Issue 2).

Sun, Q., Liu, F., Mo, X., Yao, B., Liu, G., Chen, S., & Ren, Y. (2023). Shugoshin Regulates Cohesin, Kinetochore-Microtubule Attachments, and Chromosomal Instability. In Cytogenetic and Genome Research (Vol. 162, Issue 6, pp. 283–296). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000528141

Sun, S. C., Gao, W. W., Xu, Y. N., Jin, Y. X., Wang, Q. L., Yin, X. J., Cui, X. S., & Kim, N. H. (2012). Degradation of actin nucleators affects cortical polarity of aged mouse oocytes. Fertility and Sterility, 97(4), 984–990. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.101

Sun, S. C., Wang, Z. B., Xu, Y. N., Lee, S. E., Cui, X. S., & Kim, N. H. (2011). Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. PLoS ONE, 6(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018392

Torkashvand, H., Shabani, R., Artimani, T., Amiri, I., Pilehvari, S., Torkashvand, L., Mehdizadeh, R., & Mehdizadeh, M. (2024). Oocyte competence develops: nuclear maturation synchronously with cytoplasm maturation. In Zygote. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/S0967199424000169

Turathum, B., Gao, E. M., & Chian, R. C. (2021). The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. In Cells (Vol. 10, Issue 9). MDPI. https://doi.org/10.3390/cells10092292

Uraji, J., Scheffler, K., & Schuh, M. (2018). Functions of actin in mouse oocytes at a glance. Journal of Cell Science, 131(22), 1–6. https://doi.org/10.1242/jcs.218099

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: Mitotic catastrophe. In Cell Death and Differentiation (Vol. 15, Issue 7, pp. 1153–1162). https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47

Vogt, E., Sanhaji, M., Klein, W., Seidel, T., Wordeman, L., & Eichenlaub-Ritter, U. (2010). MCAK is present at centromeres, midspindle and chiasmata and involved in silencing of the spindle assembly checkpoint in mammalian oocytes. Molecular Human Reproduction, 16(9), 665–684. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq025

Walters, K. A., Middleton, L. J., Joseph, S. R., Hazra, R., Jimenez, M., Simanainen, U., Allan, C. M., & Handelsman, D. J. (2012). Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. Biology of Reproduction, 87(6). https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102012

Walton, K. L., Goney, M. P., Peppas, Z., Stringer, J. M., Winship, A., Hutt, K., Goodchild, G., Maskey, S., Chan, K. L., Brûlé, E., Bernard, D. J., Stocker, W. A., & Harrison, C. A. (2022). Inhibin Inactivation in Female Mice Leads to Elevated FSH Levels, Ovarian Overstimulation, and Pregnancy Loss. Endocrinology (United States), 163(4). https://doi.org/10.1210/endocr/bqac025

Wang, H. Y., Choe, M. H., Lee, I. W., Namgoong, S., Kim, J. S., Kim, N. H., & Oh, J. S. (2017). CIP2A acts as a scaffold for CEP192-mediated microtubule organizing center assembly by recruiting Plk1 and aurora a during meiotic maturation. Development (Cambridge), 144(20), 3829–3839. https://doi.org/10.1242/dev.158584

Wang, Q., Racowsky, C., & Deng, M. (2011). Mechanism of the chromosome-induced polar body extrusion in mouse eggs. Cell Division, 6. https://doi.org/10.1186/1747-1028-6-17

Wang, T., & He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. Cytokine & Growth Factor Reviews, 44, 38–50. https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2018.10.002

Wautier, J. L., & Wautier, M. P. (2023). Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: A Mini Review. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 24, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms24119647

Wei, Z., Greaney, J., Zhou, C., & A. Homer, H. (2018). Cdk1 inactivation induces post-anaphase-onset spindle migration and membrane protrusion required for extreme asymmetry in mouse oocytes. Nature Communications, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-06510-9

Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2000). Morphology and Physiology of the Ovary (A. B. B. M. Feingold KR, Ed.; [Updated 2012]). Endotext . South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/

Winterhager, E., & Kidder, G. M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: Implications for women's reproductive health. Human Reproduction Update, 21(3), 340–352. https://doi.org/10.1093/humupd/dmv007

Wright, S. P. (1992). Adjusted P-Values for Simultaneous Inference. Biometrics, 48(4), 1005–1013. https://doi.org/10.2307/2532694

Wu, G., Li, C., Tao, J., Liu, Z., Li, X., Zang, Z., Fu, C., Wei, J., Yang, Y., Zhu, Q., Zhang, J. Q., Shen, M., & Liu, H. (2022). FSH mediates estradiol synthesis in hypoxic granulosa cells by activating glycolytic metabolism through the HIF-1α–

AMPK–GLUT1 signaling pathway. Journal of Biological Chemistry, 298(5). https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101830

Xu, Y. W., Peng, Y. T., Wang, B., Zeng, Y. H., Zhuang, G. L., & Zhou, C. Q. (2011). High follicle-stimulating hormone increases aneuploidy in human oocytes matured in vitro. Fertility and Sterility, 95(1), 99–104. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.037

Yang, C. F., Tsai, W. Y., Chen, W. A., Liang, K. W., Pan, C. J., Lai, P. L., Yang, P. C., & Huang, H. C. (2016). Kinesin-5 Contributes to Spindle-length Scaling in the Evolution of Cancer toward Metastasis. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep35767

Yao, L. L., Hou, W. D., Liang, Y., Li, X. dong, & Ji, H. H. (2024). Spire2 and Rab11a synergistically activate myosin-5b motor function. Biochemical and Biophysical Research Communications, 703, 149653. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2024.149653

Yding Andersen, C. (2002). Effect of FSH and its different isoforms on maturation of oocytes from pre-ovulatory follicles. In Reproductive biomedicine online (Vol. 5, Issue 3, pp. 232–239). https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61826-3

Yen, S. S. (1977). Regulation of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in women. Journal of Reproduction and Fertility, 51(1), 181–191. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0510181

Yi, K., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Guo, F., Slaughter, B. D., & Li, R. (2013). Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. Journal of Cell Biology, 200(5), 567–576. https://doi.org/10.1083/jcb.201211068

Yi, K., Unruh, J. R., Deng, M., Slaughter, B. D., Rubinstein, B., & Li, R. (2011). Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. Nature Cell Biology, 13(10), 1252–1258. https://doi.org/10.1038/ncb2320

Yomogita, H., Miyasaka, N., & Kanai-Azuma, M. (2022). A Review of Delayed Delivery Models and the Analysis Method in Mice. In Journal of Developmental Biology (Vol. 10, Issue 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/jdb10020020

Young, J. M., & McNeilly, A. S. (2012). Inhibin removes the inhibitory effects of activin on steroid enzyme expression and androgen production by normal ovarian thecal cells. Journal of Molecular Endocrinology, 48(1), 49–60. https://doi.org/10.1530/JME-11-0134

Zhou, M., Chen, J., Wang, D., Zhu, C., Wang, Y., & Chen, W. (2018). Combined effects of reproductive and hormone factors and obesity on the prevalence of knee osteoarthritis and knee pain among middle-aged or older Chinese women: A cross-sectional study. BMC Public Health, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12889-018-6114-1

Zhu, J., Zhang, J., Li, H., Wang, T.-Y., Zhang, C.-X., Luo, M.-J., & Tan, J.-H. (2015). Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas Ligand in mice. Scientific Reports, 5(1), 8683. https://doi.org/10.1038/srep08683

Zickler, D. (2020). Diter von Wettstein and The Meiotic Program of Pairing and Recombination. In S. Rustgi & H. Luo (Eds.), Biolistic DNA Delivery in Plants: Methods and Protocols (pp. 19–35). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_2