

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

Антон Иванов Коларов

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

АВТОРЕФЕРАТ

на 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

Дисертационният труд съдържа 164 страници и е илюстриран с 55 фигури, включващи 1 схема, 25 микрофотографии, 25 графики и 4 таблици. Цитирани са 197 литературни източника на латиница и 4 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден от разширен катедрен съвет в Катедра Биология към Медицински факултет, Медицински университет – София.

Експериментите, свързани с дисертационния труд, са проведени в „Лаборатория по *in vitro* оплождане и предимплантационна ембриология“ в Катедра Биология на Медицинския университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.07.2025г. от 11:00 часа в сградата на Медико-биологичен комплекс, ул. „Здраве“ 2, МФ, МУ – София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София.

НАУЧНО ЖУРИ

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Димитрина Кирилова Димитрова – Диканарова, дм, Катедра Биология, МФ, МУ - София.

Външни членове:

1. Доц. Милена Сергеева Мурджева-Андонова, дб – Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“

2. Доц. Иван Миладинов Бочев, дб – Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“

3. Проф. Милена Атанасова Атанасова, дб, Катедра по Анатолия, хистология, цитология и биология, МУ – Плевен

4. Доц. Маргарита Нешова Топашка-Анчева, дб, пенсионер

Резервни членове:

1. Проф. д-р Радка Кирилова Тафраджийска-Хаджиолова, дм, вътрешен член, Катедра по Физиология и патофизиология, МФ, МУ-София

2. Доц. Кирилка Стефанова Младенова, Катедра по Биохимия, БФ, СУ „Св. Климент Охридски“.

Списък на съкращенията

- АМХ – анти-мюлеров хормон
- БАБХ – Българската агенция по безопасност на храните
- БАН – Българска академия на науките
- 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
-
- 17 β -HSD* – 17 β -хидростероид-дехидрогеназа
- ANOVA* – еднофакторен дисперсионен анализ (*Analysis of Variance*)
- BSA* – *bovine serum albumin*
- CDK1* – *cyclin-dependent kinase 1*
- COC* – кумулус-овоцитен комплекс
- CYP19A1* – цитохром *P450* монооксигеназа (ароматаза)
- Eg5* – *kinesin family member 11 (KIF11)*
- FITC* – *fluorescein isothiocyanate* (флуорохром за зелен цвят)
- GH* – *Games-Howell* статистически пост-хок тест
- GV* – *germinal vesicle*; стадий с герминален везикул
- GVBD* – *germinal vesicle breakdown*
- ICR* – порода лабораторни мишки *Institute of Cancer Research*
- IL-1* – интерлевкин 1
- 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

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*)

MW – *Mann-Whitney* статистически тест

PBS – *phosphate buffered saline*

PGF2 α – простагландин *F2 α*

Ran – *ras-related nuclear protein*

SAC – *spindle assembly checkpoint*

TNF- α – *tumor necrosis factor α*

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

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията	3
ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Експериментални животни	8
1.1. Групи за оценка на влиянието на КИОА, Е2 и ФСХ.....	9
1.2. Групи за оценка на влиянието на простагландин $F2\alpha$	12
2. Хормонална овариална стимулация, изолиране и фиксиране на овоцитите за анализ	13
3. Имунофлуоресцентно оцветяване на овоцитите.....	14
4. Специфични консумативи и апаратура.....	14
5. Изследване на овоцитите – епифлуоресценция и лазерна сканираща конфокална микроскопия	15
6. Статистическа обработка на данните.....	16
РЕЗУЛТАТИ	16
1. Общ брой и разпределение на анализиранияте овоцити.....	16
2. Микроскопски анализ на овоцитите	17
2.1. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ.....	17
2.2. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на простагландин $F2\alpha$	20
3. Статистически анализ на данните, получени за овоцитите при въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол и ФСХ.....	20
ОБСЪЖДАНЕ	47
1. Влияние на КИОА върху цитоскелета и хроматина на овоцитите.....	48
2. Влияние на третирането на животните с естрадиол върху върху цитоскелета и хроматина на овоцитите	54
3. Влияние на третирането на животните с ФСХ върху цитоскелета и хроматина на овоцитите	59
3.1. Наличие на овоцити след метафаза II при групите с ФСХ	64
4. Ефект на режима на прилагане на простагландин $F2\alpha$	65
ИЗВОДИ	68
ПРИНОСИ	69
ФИНАНСИРАНЕ	69
ПУБЛИКАЦИИ	70

ВЪВЕДЕНИЕ

Овогенезата на бозайниците е процес, в който са въввлечени прецизни механизми на координация между диференцирането на женските гамети и спецификата на ембрионалния, постембрионалния и репродуктивния период с техните хормонални флукутации 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 $F2\alpha$. 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 $F2\alpha$, 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.

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 $F2\alpha$) като предполагаем механизъм на въздействието на артритата.

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, колагеназа-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 (E2) 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/ μ l колагеназа (от *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich, Germany) в тибияталарната 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-тибияталарно със стерилена PBS вместо с колагеназа.

Третирането с естрадиол (*17 β -estradiol*, Sigma-Aldrich) е прилагано *per os* в доза 4 μ g в 0,300 μ l 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 стерилена PBS, е инжектиран интраперитонеално на животните в доза 2 IU/мишка/ден (0,2 ml) за 10-дневен период.

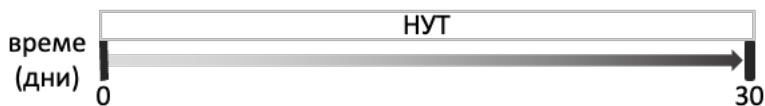
Животните с КИОА и различен режим на прилагане на репродуктивните хормони, получени от Института по микробиология към БАН, са разпределени в групи и се включват в настоящото изследване за оценка на въздействието на Е2 и ФСХ върху прицелните овоцитни структури: актинов и тубулинов цитоскелет, и състояние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

Разпределение по групи (за удобство представени и графично):

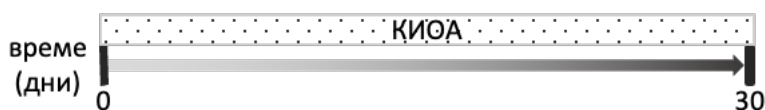
1. Контроли – овоцити, добити от животни без КИОА, но на възраст, сравнима с тези, третирани по различните схеми по-долу. Тази група е наречена чисти **Контроли**;



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**;



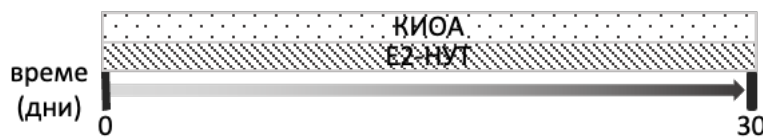
4. Яйцеклетки от животни с 30 дневен КИОА на които паралелно е даван само течен шоколад: **30 КИОА^{Нут}**;



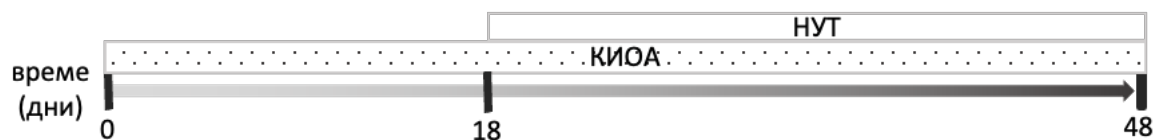
5. Група овоцити от женски, третирани 30 дни с естрадиол (E2) от едномесечна възраст, даван им посредством течен шоколад: Група **E2^{Нут}**;



6. Овоцити, получени от животни с 30 дневен КИОА и паралелно третирани 30 дни с естрадиол (E2), даван им чрез течен шоколад: **30 КИОА + E2^{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}**;



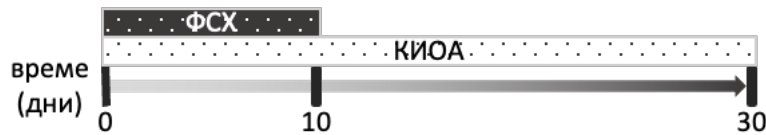
8. Овоцити, получени от животни с КИОА, които от 18-я ден на артрит са третирани за 30 дни с естрадиол (E2), даван им чрез течен шоколад: **18 КИОА + E2^{Нут}**;



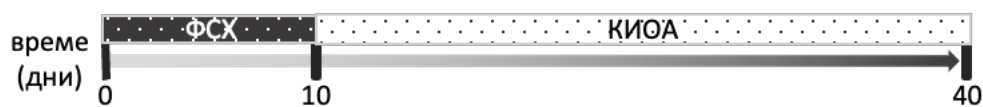
9. Овоцити, получени след 10 дневно третиране с ФСХ без да е индуциран КИОА, но обработени за анализ 30 дни след началото на ФСХ третирането. Групата е наречена **10 ФСХ**;



10. Група яйцеклетки, изолирани от животни с индуциран КИОА, като през първите 10 дни на артрит е прилаган ФСХ, а животните са използвани за добив след 30-я ден на артрит. Групата е наречена **30 КИОА¹⁰ ФСХ**;



11. Яйцеклетки, получени от животни, третирано 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 $F2\alpha$

За оценка на влиянието на простагландин $F2\alpha$ 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 $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), 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 $PGF2\alpha$** ;

14. Овоцити, инкубирани в среда с добавен $PGF2\alpha$ в концентрация 50 ng/ml за 3 часа: **50 $PGF2\alpha$** ;

15. Яйцеклетки, инкубирани в среда с добавен $PGF2\alpha$ в концентрация 100 ng/ml за 3 часа: **100 $PGF2\alpha$** .

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 *PGF2 α* – 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; Chorionon, 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 *Chorionon* 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 *PGF2 α* **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 *PGF2 α* (*PGF2 α Tris salt, Sigma-Aldrich, Germany*) за 3 h на 37°C и 5% CO₂.

Всички овоцити са фиксирани с 2% параформалдехид в пермеабилзиращ 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 миеш буфер (*PBS, pH 7.2, с 0,3% BSA и 1 μ l/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 μ g/ml*) за визуализиране на F-актин и Hoechst (*Hoechst 33258 в работна концентрация 8 μ g/ml или Hoechst 33342 в работна концентрация 5 μ g/ml, Sigma-Aldrich*) за визуализиране на хроматин. За яйцеклетките от групите с КИОА е приложен Hoechst 33258, тъй като техните мембрани са пермеабилizирани при фиксирането, докато за яйцеклетките от групите PGF2 α е предпочетен Hoechst 33342, който преминава през интактни мембрани. След флуоресцентното оцветяване овоцитите са двукратно промити за по 10 min с миеш 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 μ 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 пастъорки,

източени на пламък непосредствено преди работа, с изключително тънък и леко закривен връх. Средите и разтворите за клетките са филтрирани през $0,22\mu\text{m}$ 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 $5\% \text{CO}_2$ 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 $0.1 \mu\text{m}$ 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 анализираниите 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](#)).

При 364 яйцеклетки са изследвани дегенеративни ефекти на стареене на тези структури в различни условия на култивиране с простагландин *F2 α* .

Разпределението на овоцитите по групи с данни за мейотичния им статус към момента на фиксиране, са представени на [Таблица 2](#).

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.

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. Елифлуоресцентни образи за тази група са показани на *Фигури 2А* и *2В*.

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%МІІ за **30 КИОА**) спрямо чистите Контроли, с които тази група е сравнявана (55.50% МІІ). 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 МІ и 52.94% от МІІ) 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.

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*).

5. Група овоцити от женски, третирани 30 дни с естрадиол (E2) от едномесечна възраст, даван им посредством течен шоколад: Група **E2^{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.

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

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 7А* и *7В*), а тубулинови астери се срещат относително рядко и само в М 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.

8. Овоцити, получени от животни с КИОА, които от 18-я ден на артрит 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 8А* и *8В*). Групата показва най-високия процент дегенерирал хроматин. Актиновите шапки са по-малки от тези на Контролите.

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.

10. Група яйцеклетки, изолирани от животни с индуциран КИОА, като през първите 10 дни на артрит е прилаган ФСХ, а животните са използвани за добив след 30-я ден на артрит. Групата е наречена **30 КИОА¹⁰ ФСХ**. Наблюдават се по-големи вретена спрямо другите ФСХ-групи със средни морфометрични стойности, най-общо близки до останалите КИОА-групи (виж *Фигури 10А* и *10В*). 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.

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 11А* и *11В*). В групата е измерена най-малка средна ширина на актиновите шапки.

2.2. Морфологичните особености на овоцитите за оценка на въздействието на простагландин $F2\alpha$

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*).

В групата 50 $PGF2\alpha$ 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 $PGF2\alpha$ 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 $PGF2\alpha$.

3. Статистически анализ на данните, получени за овоцитите при въздействието на КИОА в комбинация с естрадиол 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 дялът овоцити с дегенериал 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](#)). Дялът на дегенериалния 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 дегенериал 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 $E2^{Hut}$ 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 М I, се доближават до тези на Контролите (виж [Фигури 15](#) и [23](#)). Групата $E2^{Hut}$ има по-малък дял на овоцити с дезорганизиран вретена спрямо групата 30 КИОА и ФСХ - третираните, както и от Контролите в М II (виж [Фигура 16](#)). Въпреки това, подобно на 18 КИОА^{Hut} , 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 М II тя се нарежда след 30 КИОА^{Hut} и $30\text{ КИОА} + E2^{Hut}$ (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 М I и М II е близко до това на Контролите (виж [Фигури 19](#) и [27](#)), а в М 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 остеоартрит, които не са третирани с ФСХ (виж [Фигури 28](#) и [37](#)).

За разлика от 18 КИОА^{Hut} , мейотичните вретена на овоцитите от $18\text{ КИОА} + E2^{Hut}$ са по-къси и по-тесни, но остават с широки полюси (виж [Фигура 23](#)). Също така при комбинацията на 18 КИОА с $E2^{Hut}$ се наблюдават по-малък дял на вретена с дефекти (виж [Фигура 24](#)). Процентът на тубулинови астери е по-висок от този на 18 КИОА^{Hut} , 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^{Hut} (виж [Фигура 26](#)), но има най-високия процент дегенериралия хроматин (виж [Фигура 27](#)). Актиновите шапки в група $18\text{ КИОА} + E2^{Hut}$ 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 овоците е най-малък, като от тях има най-нисък процент зрели и най-висок процент дегенерирани (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. Овоците 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](#)). Овоците 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 овоците 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 овоците на 30 КИОА^{10 ФСХ} се наблюдават вретена с откачени нишки, а тези с дезорганизиран вретена по стойност се доближават до 10 ФСХ. Процентът на дезорганизиран 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

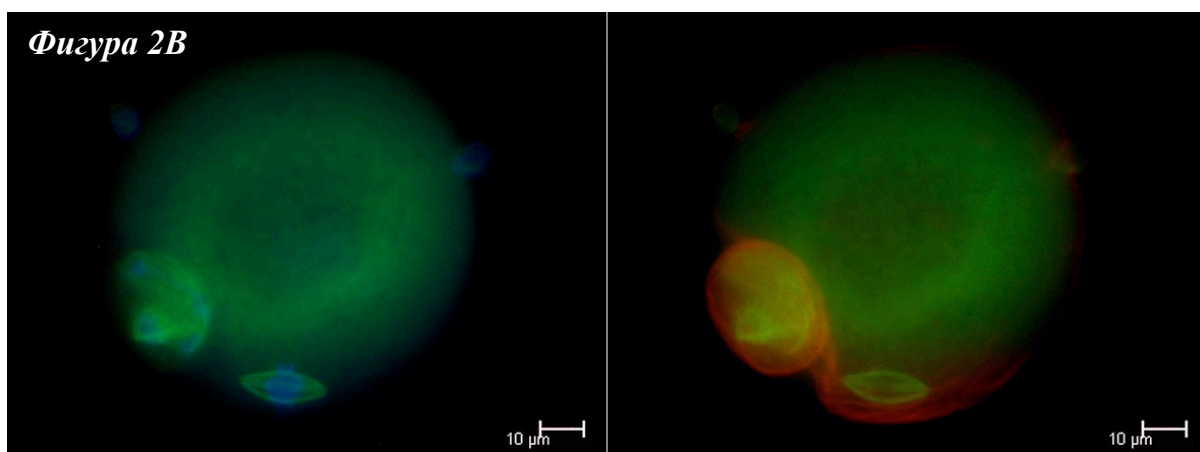
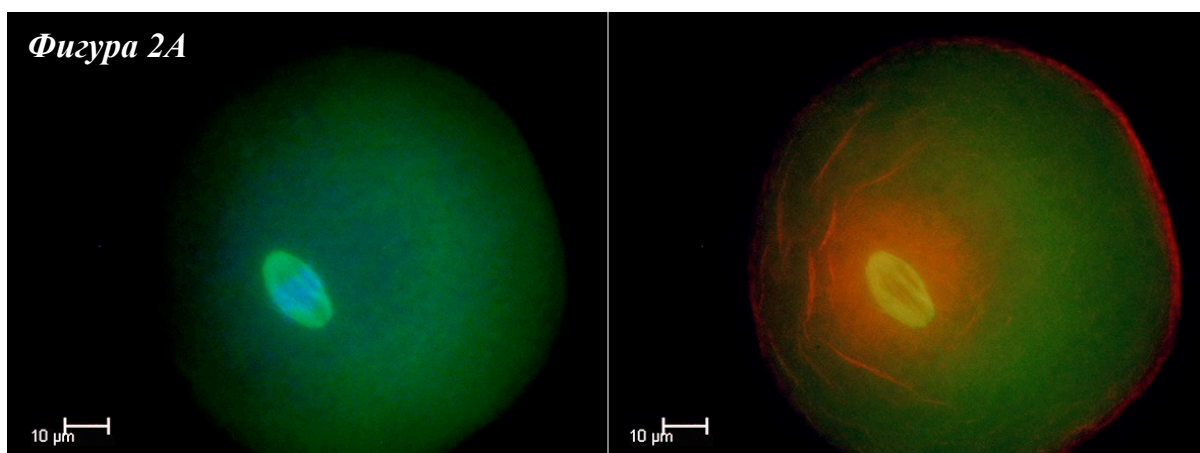
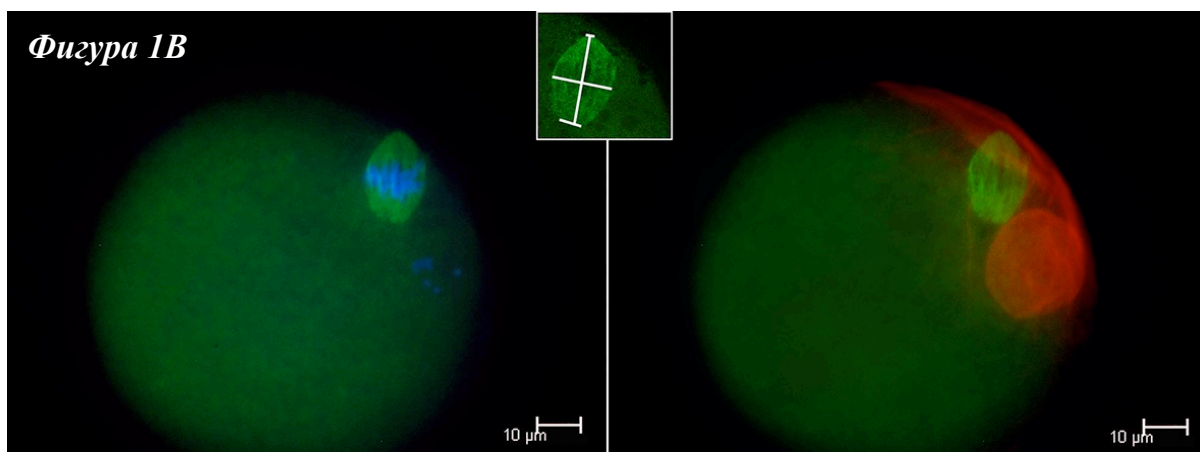
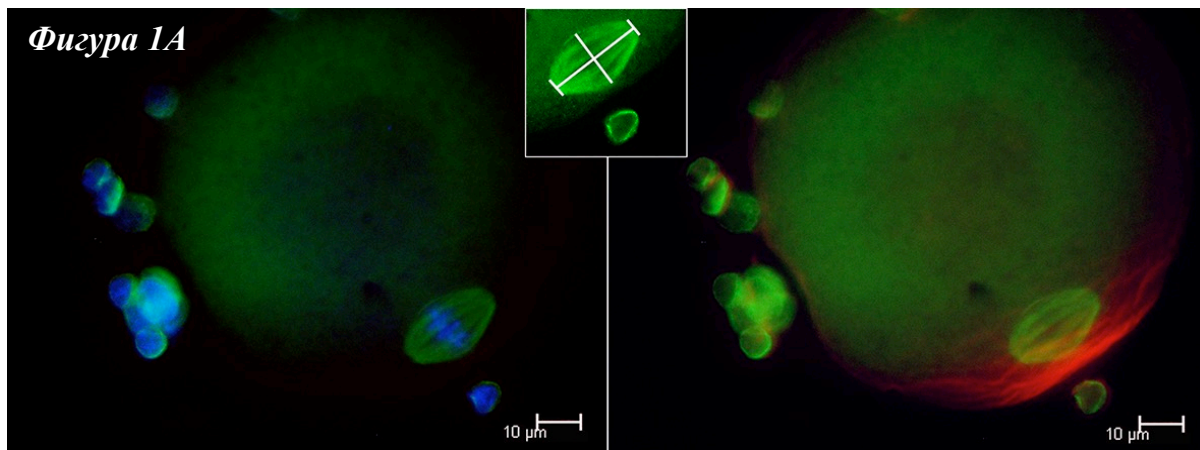
неподредени метафазни пластинки, като най-голям дял на подредени хромозоми има при 30 КИОА^{10 ФСХ} (виж [Фигура 35](#)). Тази група е и с най-ниския процент на дегенерирал хроматин, докато при останалите с ФСХ е сравнително по-висок спрямо други групи и 10 ФСХ + 30 КИОА е на второ място след 18 КИОА^{Нут} (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.

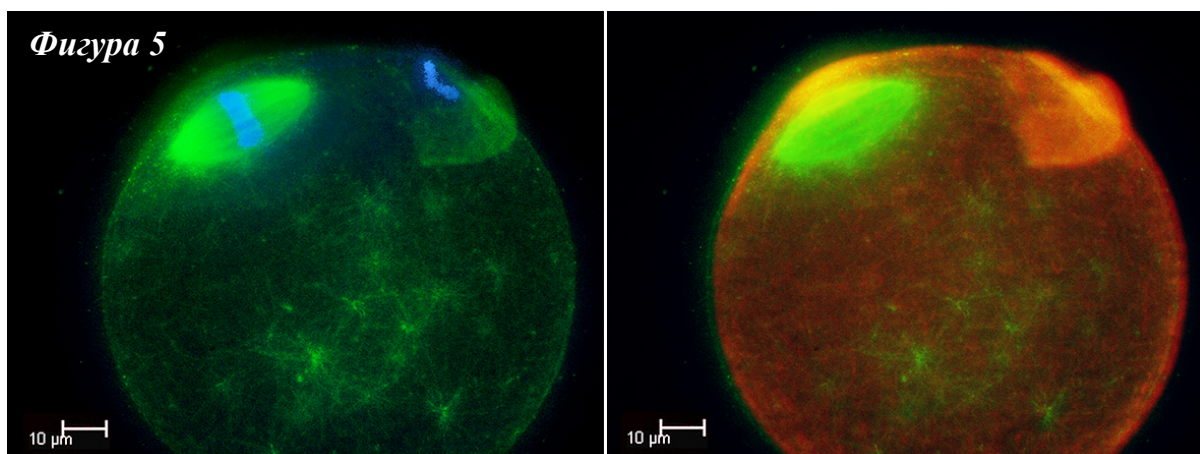
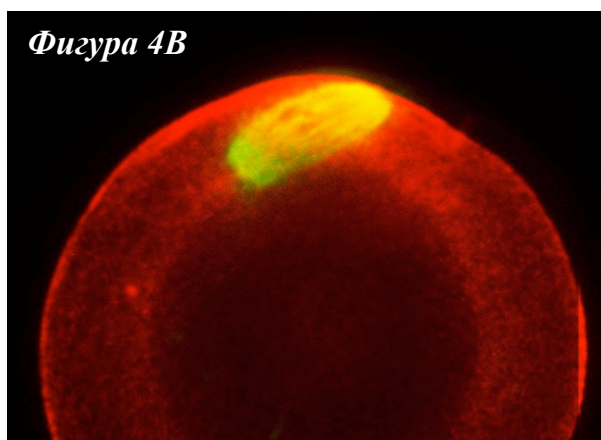
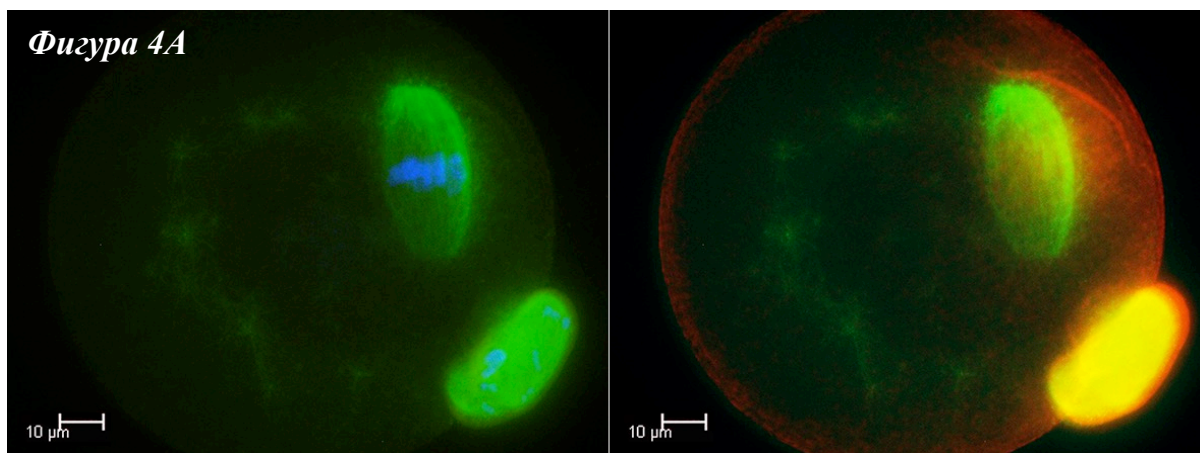
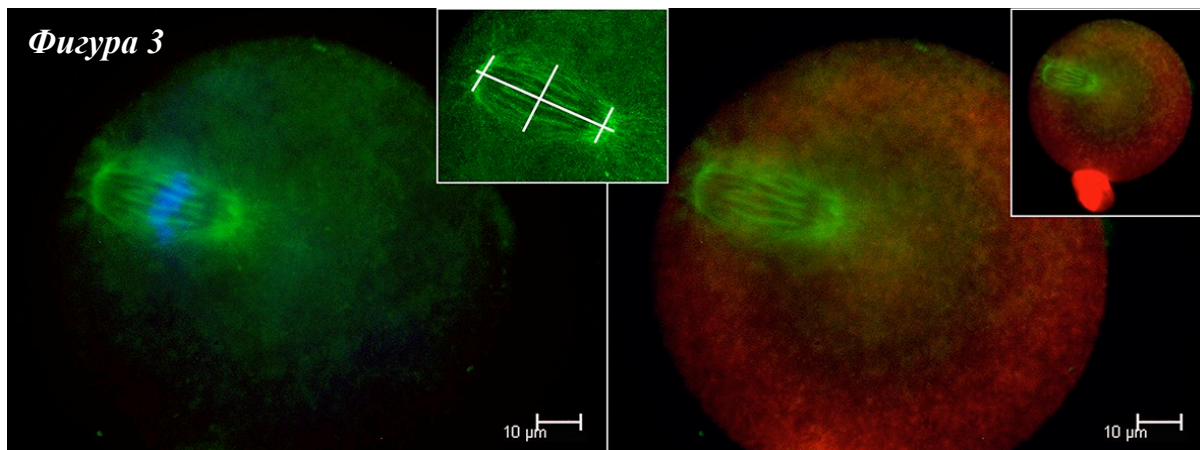
Таблица 1

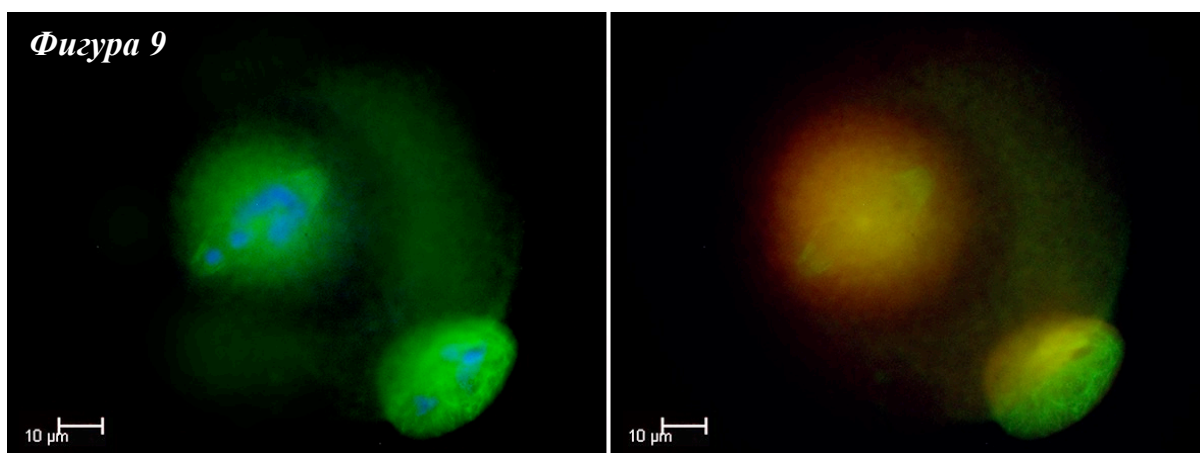
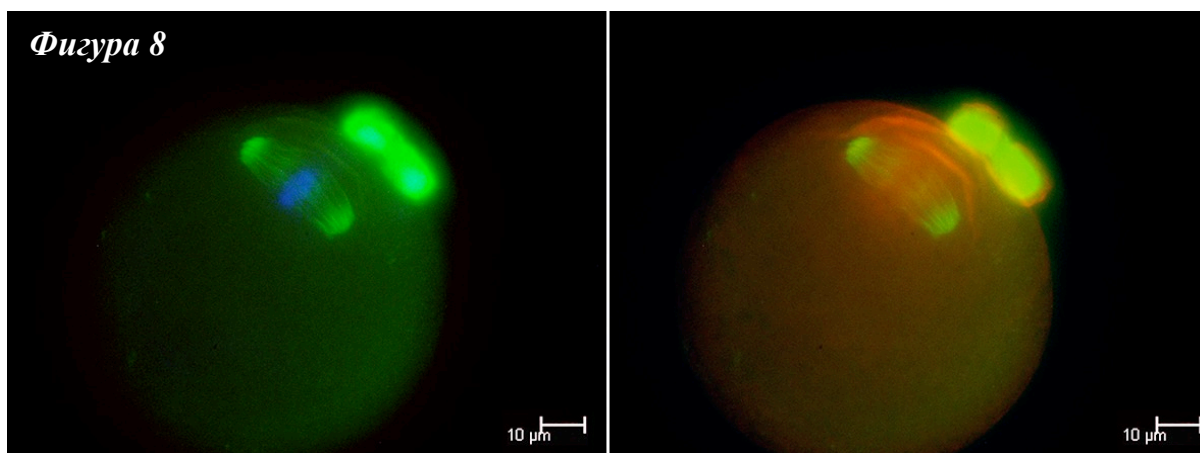
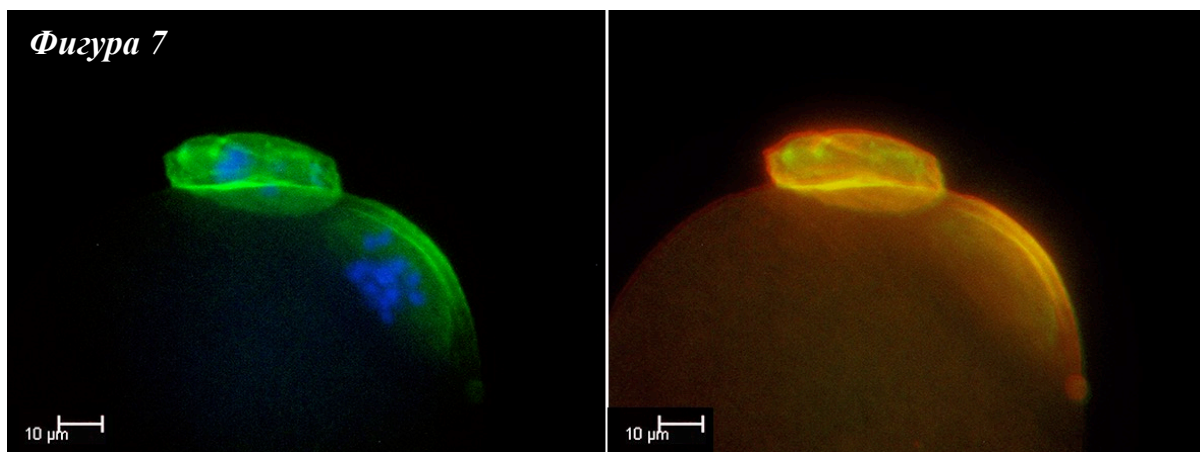
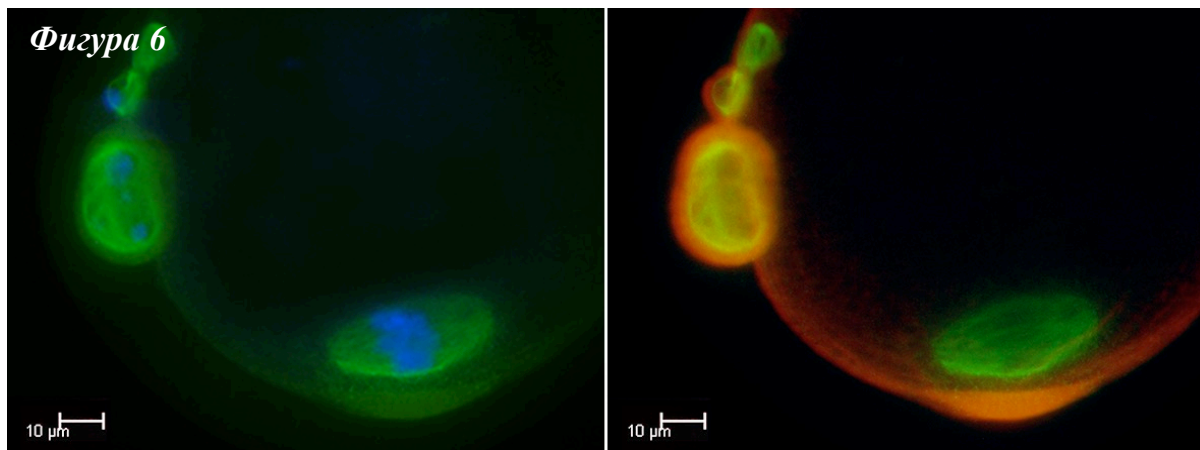
Групи	Общ брой	до М I брой (%)	М I брой (%)	Ана I / Тело I брой (%)	М II брой (%)	Ана II / Тело II брой (%)	D брой (%)
Контроли	209	3 (1,44%)	86 (41,15%)	2 (0,96%)	116 (55,50%)	0	2 (0,96%)
Контроли ^{Нут}	93	2 (2,15%)	40 (43,01%)	1 (1,08%)	49 (52,69%)	0	1 (1,08%)
30 КИОА	193	2 (1,04%)	139 (72,02%)	0	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%)

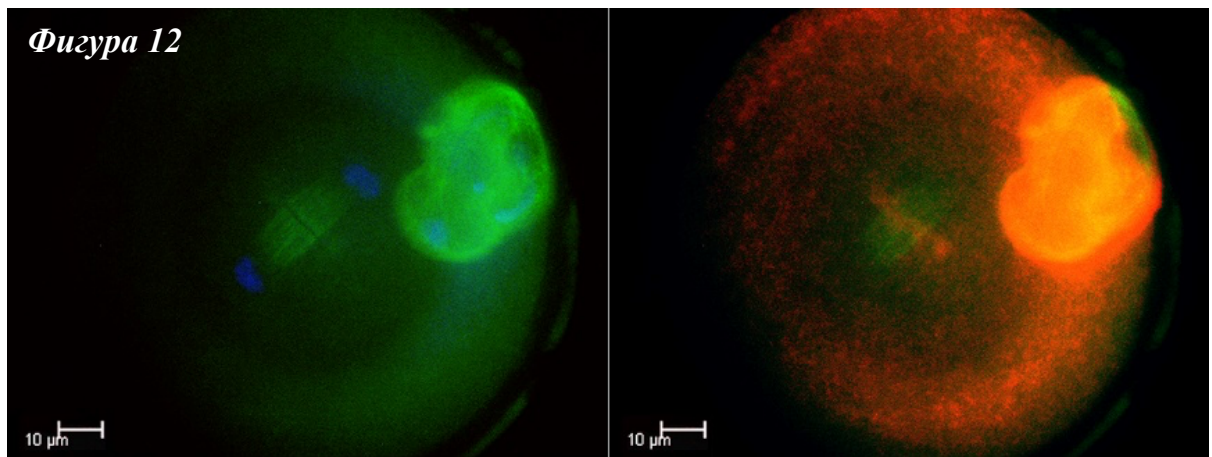
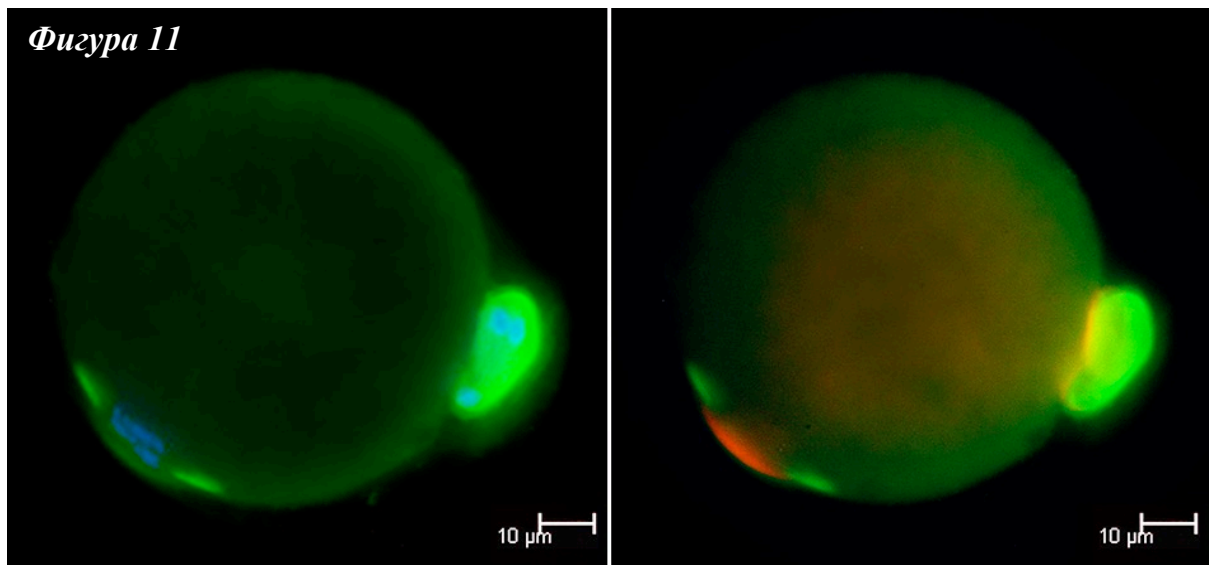
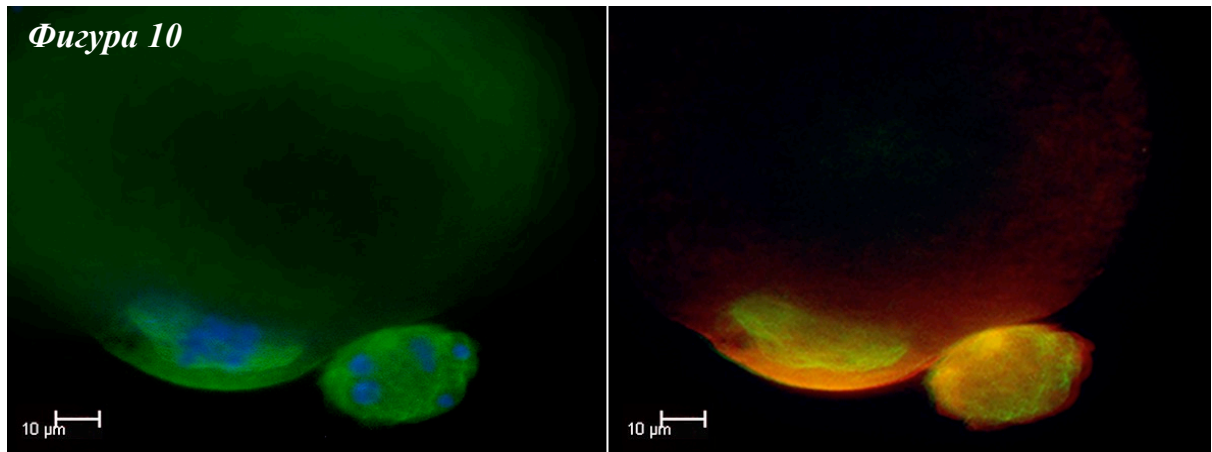
Таблица 2

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 <i>Fix</i>	72	2 (2,78%)	18 (25,00%)	0	50 (69,44%)	0	2 (2,78%)
Контроли 0 <i>PGF2α</i>	130	2 (1,54%)	52 (40,00%)	0	69 (53,08%)	0	7 (5,38%)
50 <i>PGF2α</i>	50	0	31 (62,00%)	0	17 (34,00)	0	2 (4,00%)
100 <i>PGF2α</i>	112	0	42 (37,50%)	0	54 (48,21%)	0	16 (14,29%)

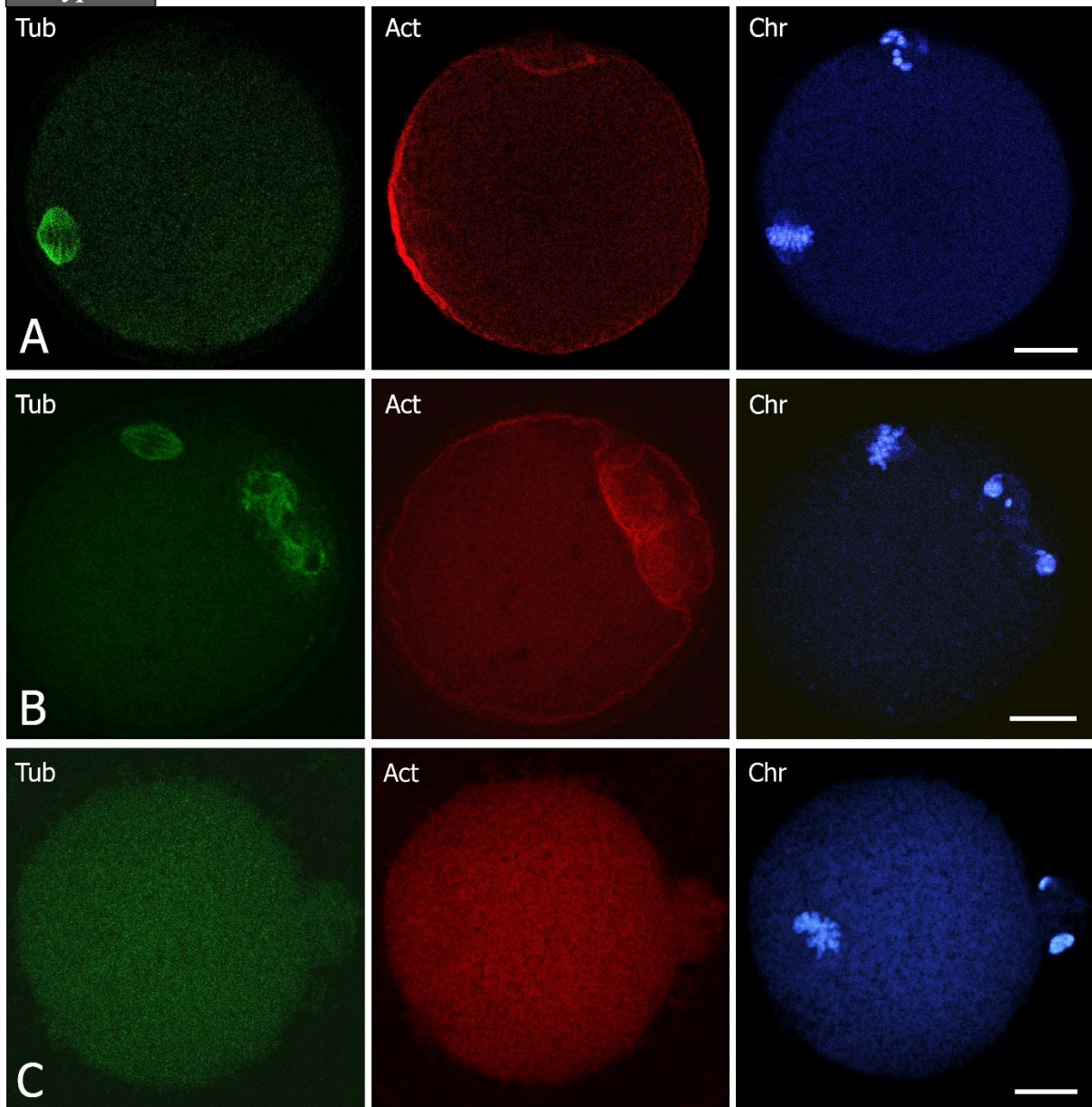








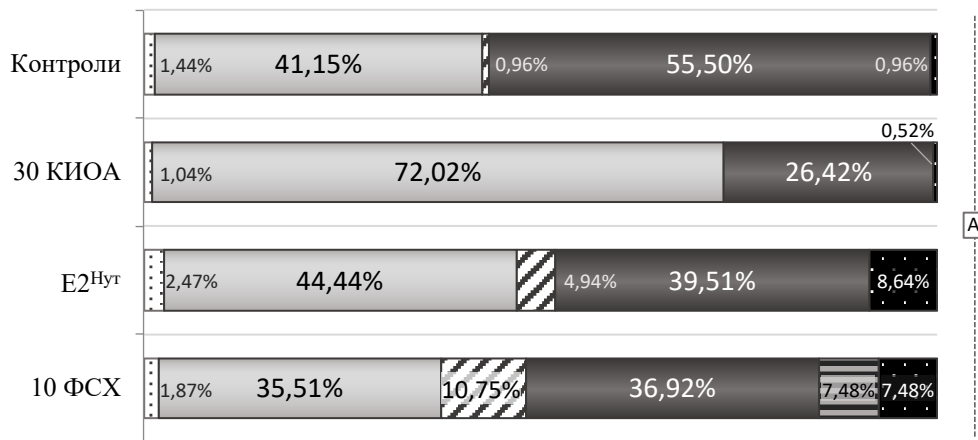
Φιζυρα 13



Фигура 14

Степен на зрялост

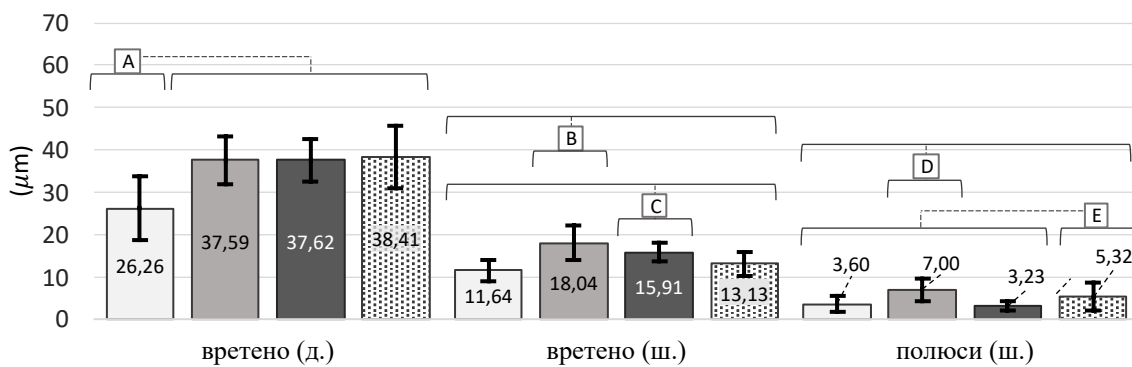
□ до М I □ М I ▨ Ана I/ Тело I ■ М II ▩ Ана II/ Тело II ■ D



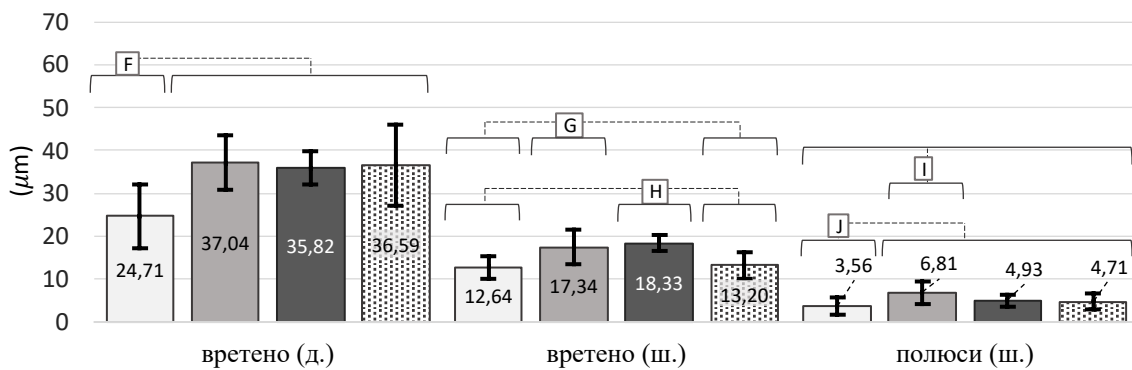
Фигура 15

Мейотично вретено на некомбинирани фактори за М I

□ Контроли □ 30 КИОА ■ E2Нут ▨ 10 ФСХ

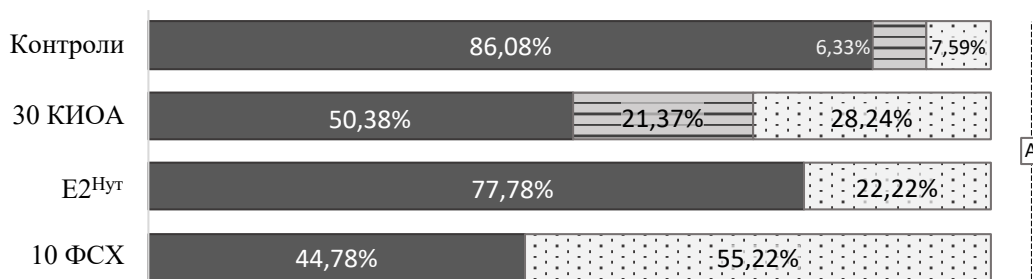


Мейотично вретено на некомбинирани фактори за М II

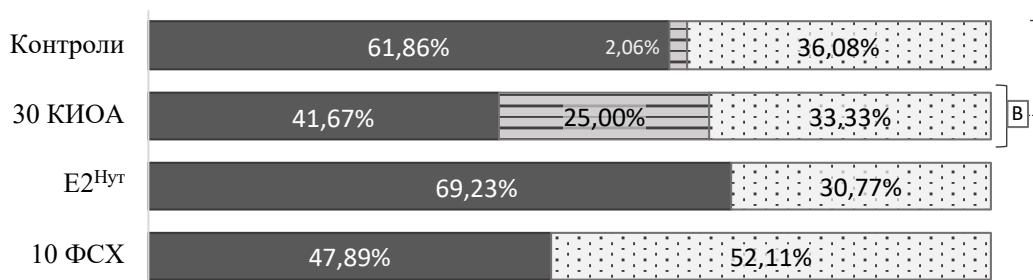


Фигура 16

Състояние на вретеното в М I



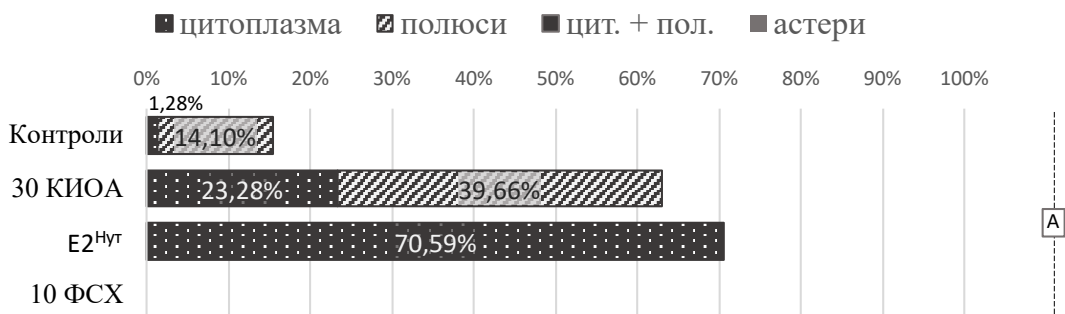
Състояние на вретеното в М II



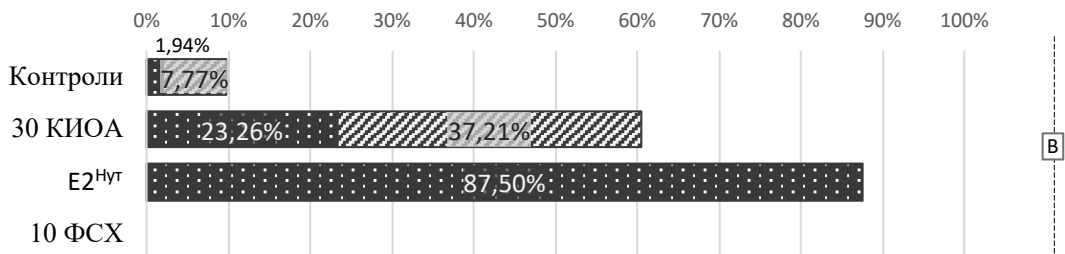
■ цяло ▨ откачени нишки ▩ дезорганизирано ▤ доп. вретено

Фигура 17

Тубулинови астери в М I

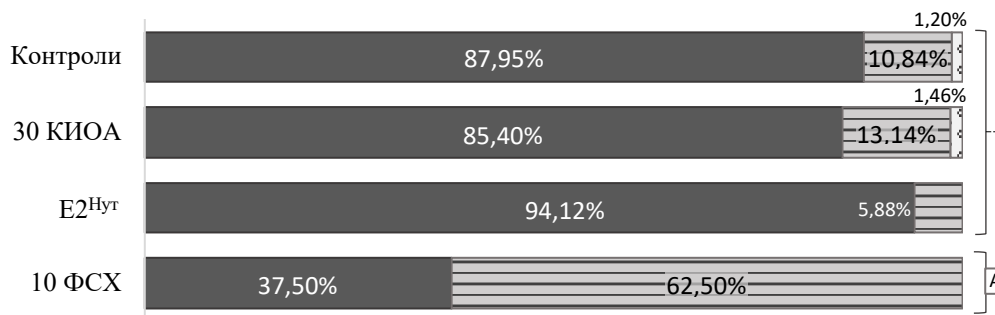


Тубулинови астери в М II

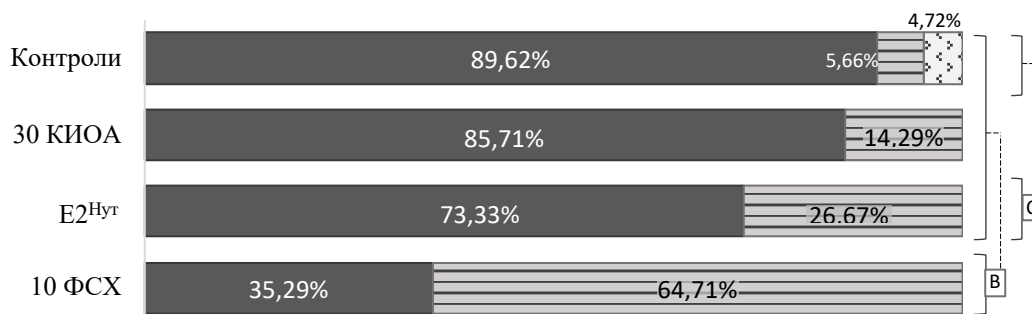


Фигура 18

Подредане на хромозомите в М I



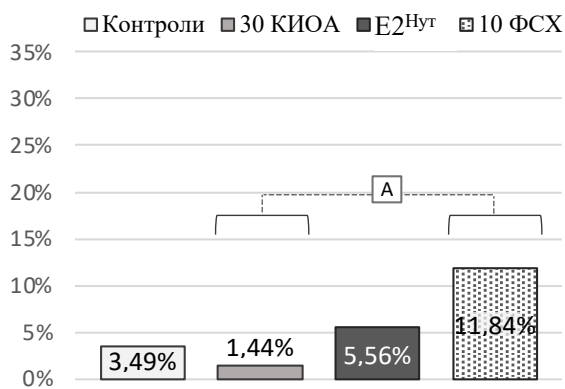
Подредане на хромозомите в М II



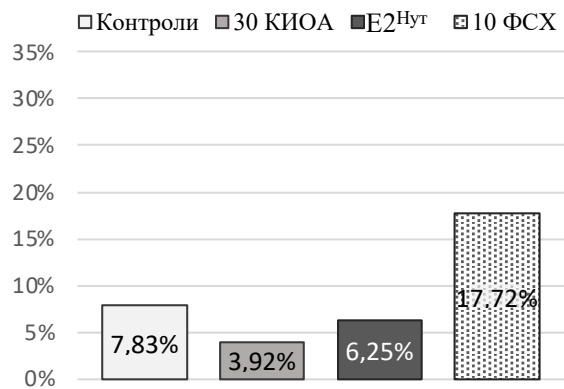
■ подредени ▨ неподредени ▩ извън вретеното

Фигура 19

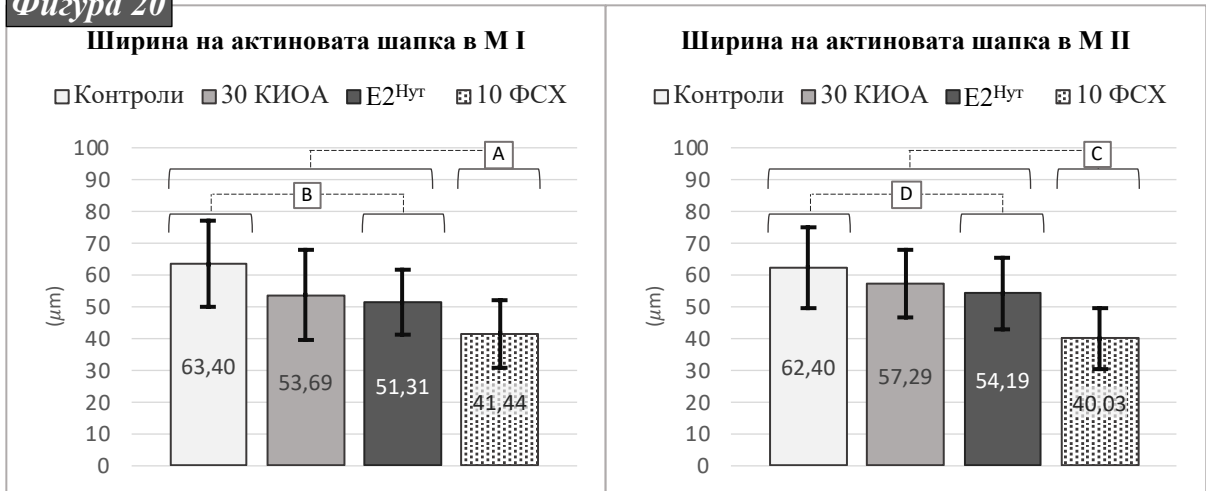
Дегенерирал хроматин в М I



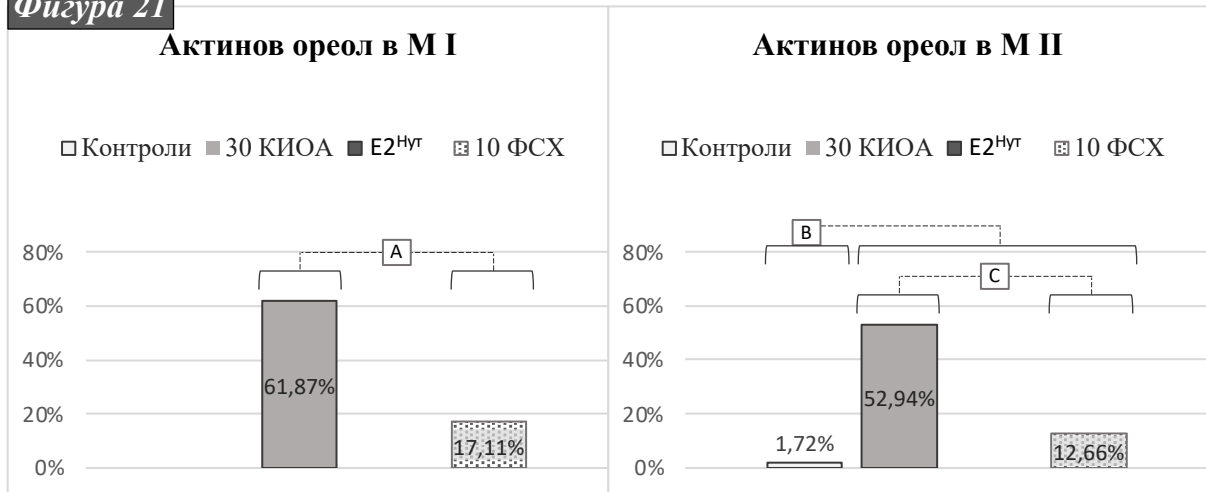
Дегенерирал хроматин в М II



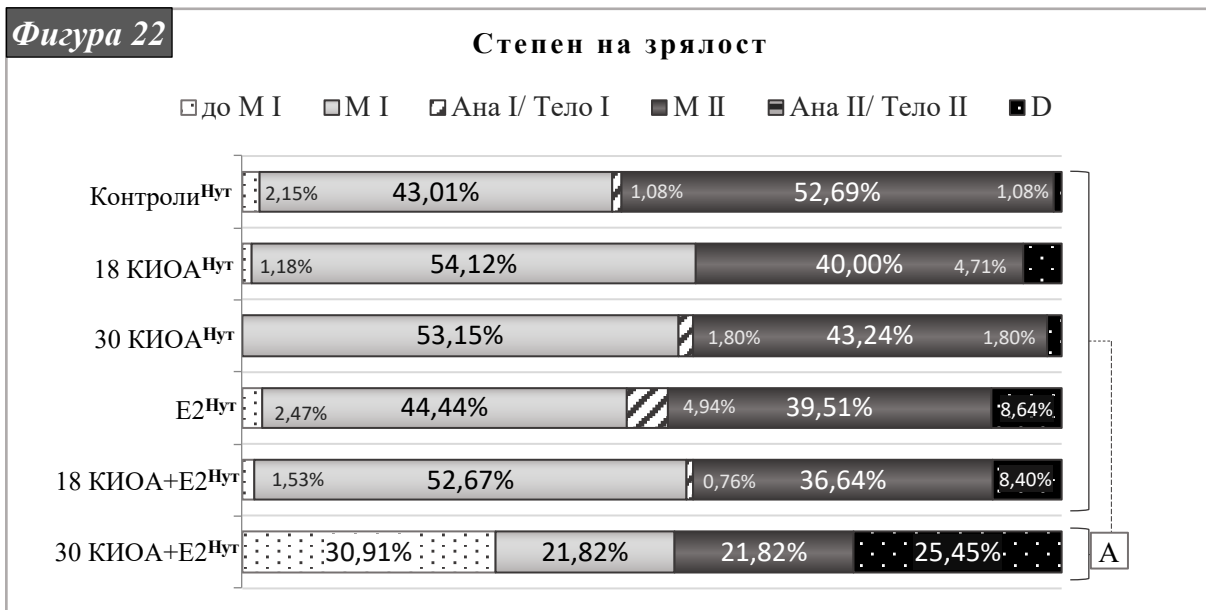
Фигура 20



Фигура 21

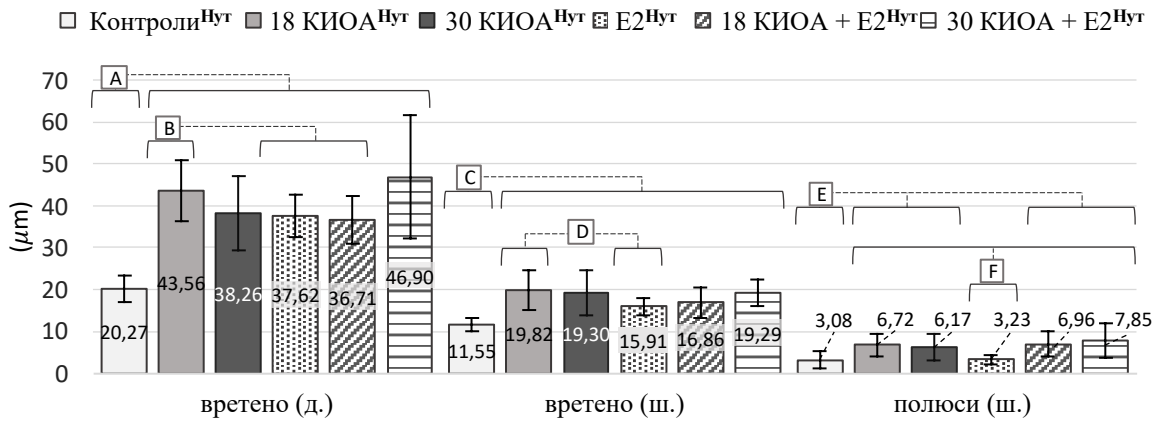


Фигура 22

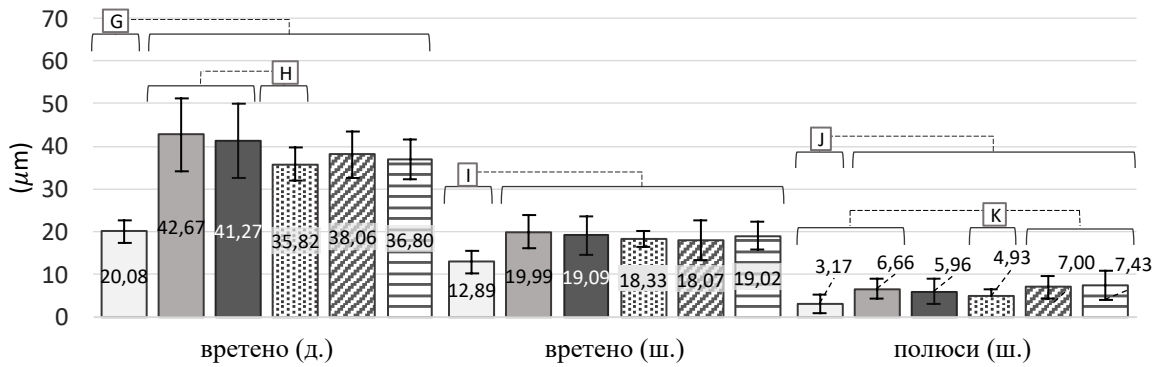


Фигура 23

Мейотично вретено в М I

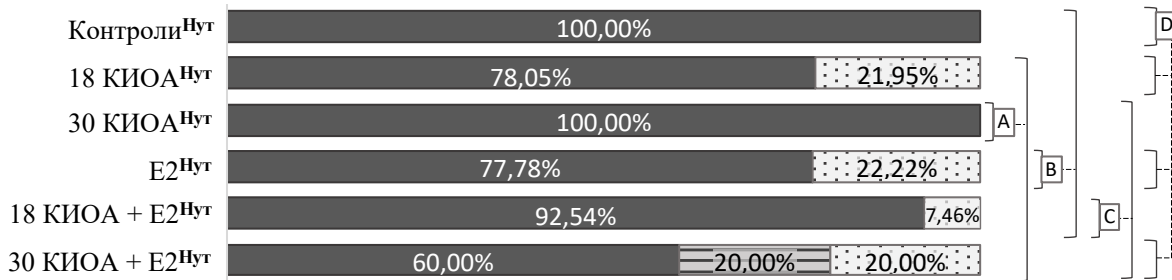


Мейотично вретено в М II

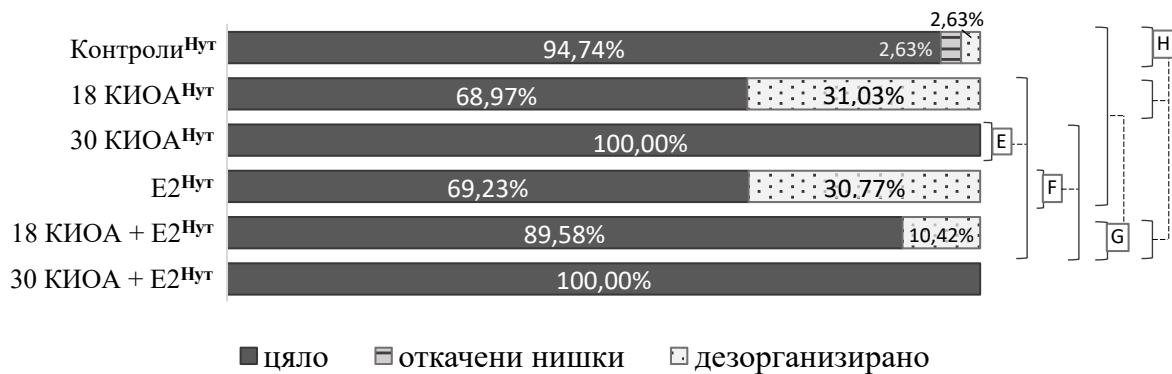


Фигура 24

Състояние на вретеното в М I

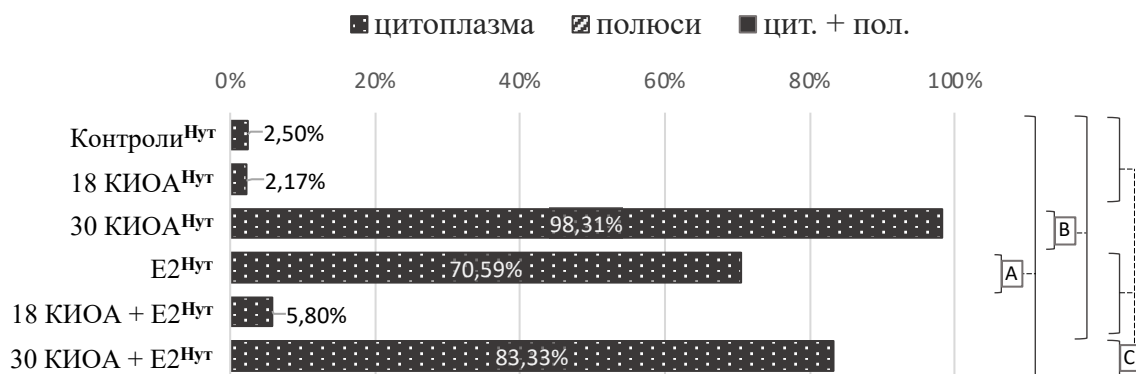


Състояние на вретеното в М II

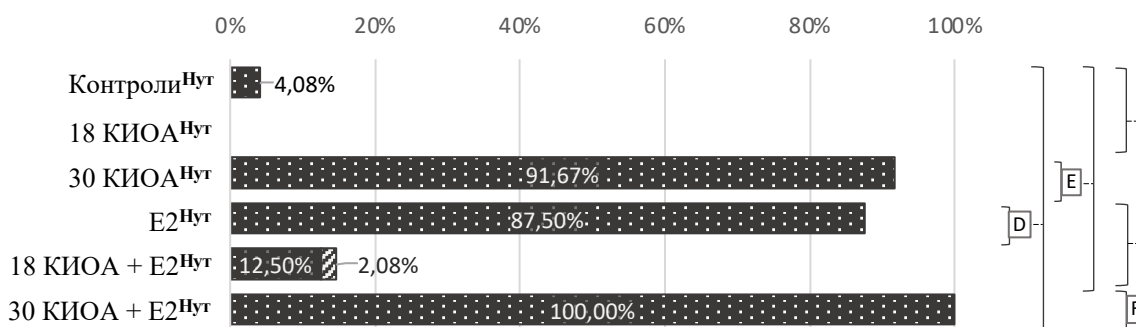


Фигура 25

Тубулинови астери в М I

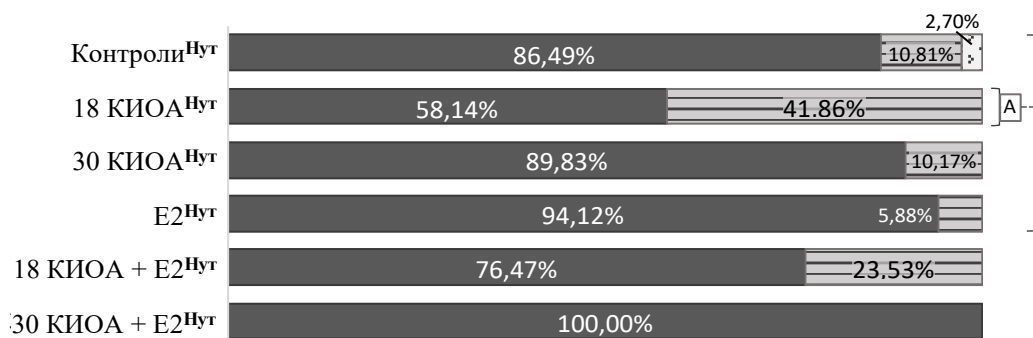


Тубулинови астери в М II

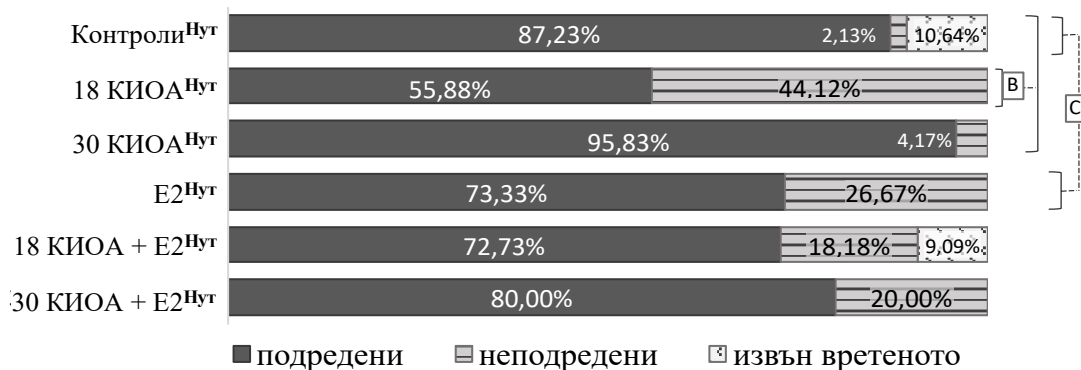


Фигура 26

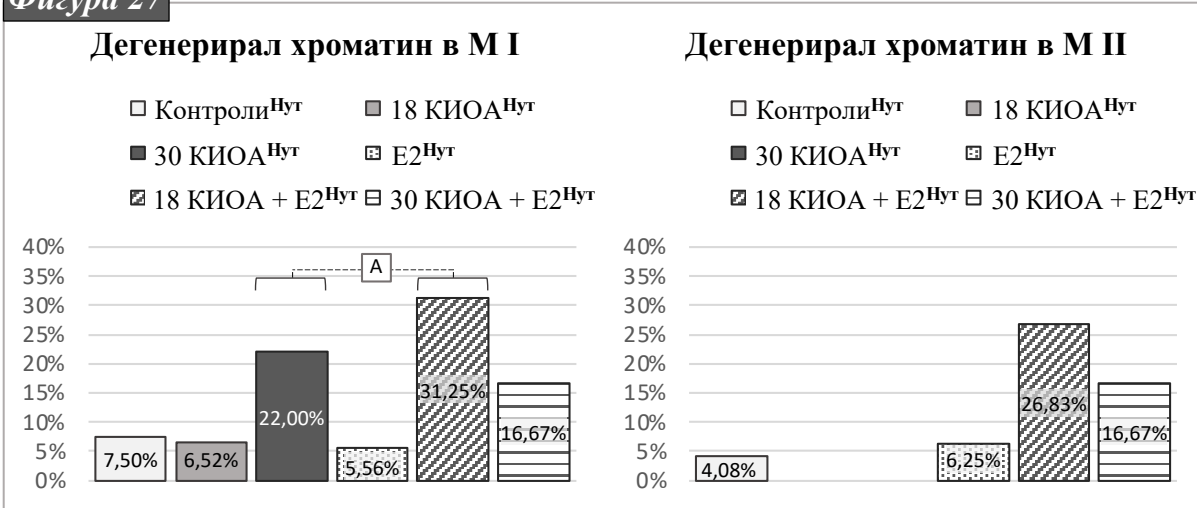
Подреждане на хромозомите в М I



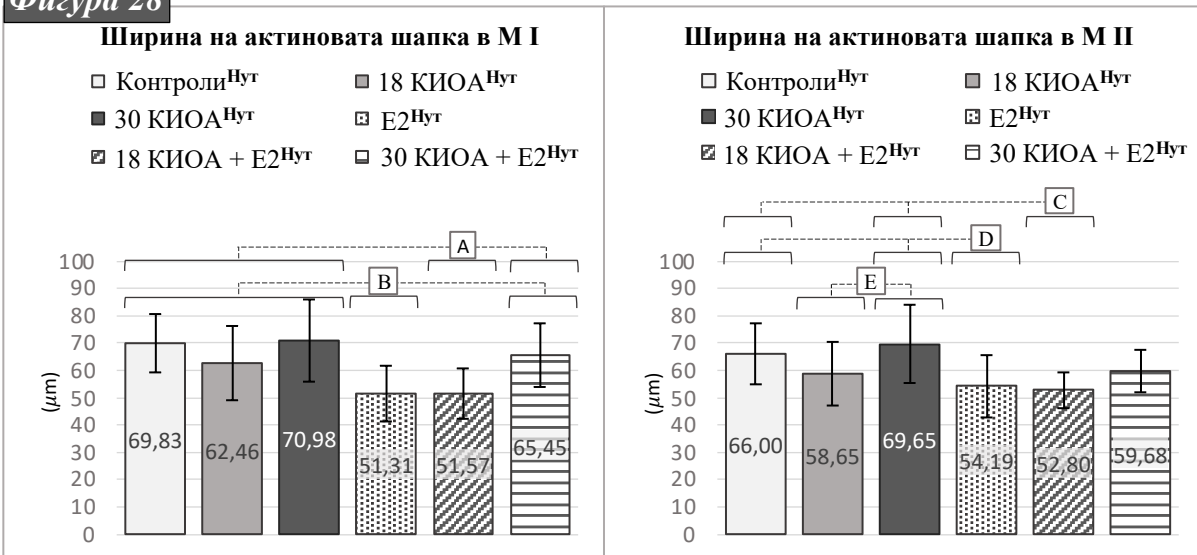
Подреждане на хромозомите в М II



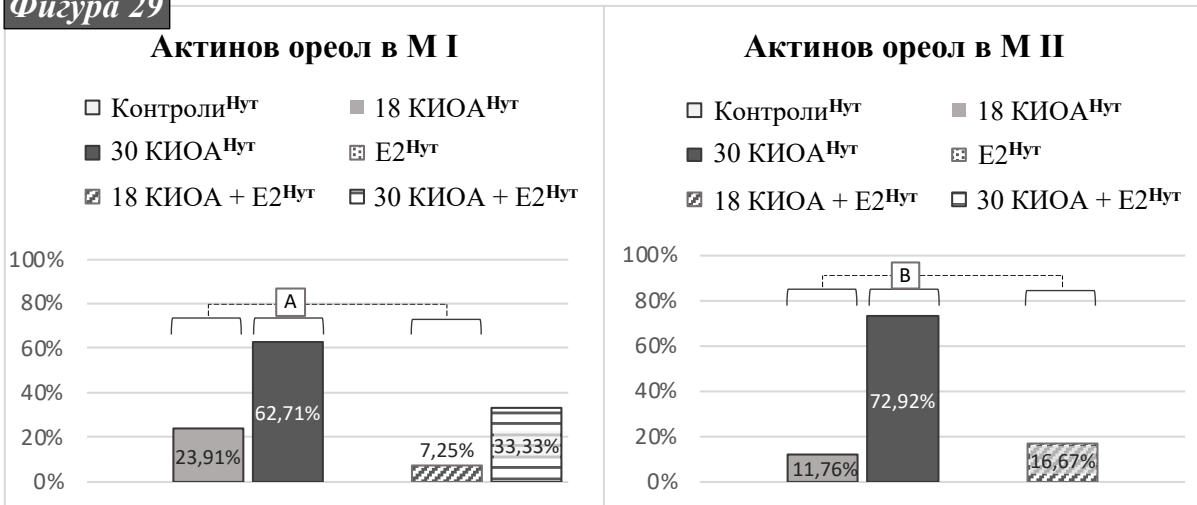
Фигура 27



Фигура 28

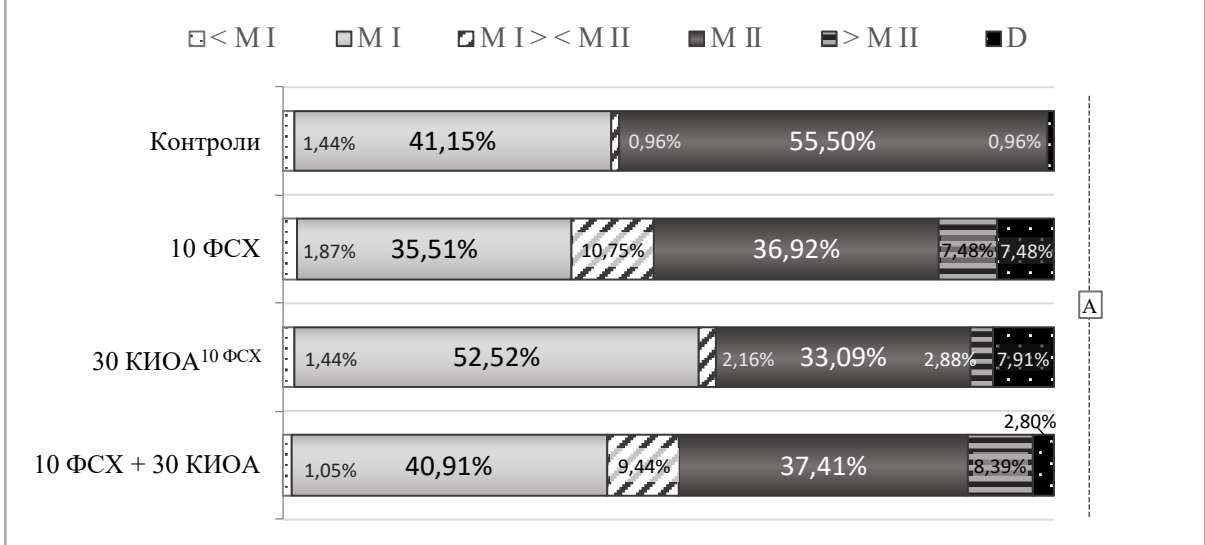


Фигура 29



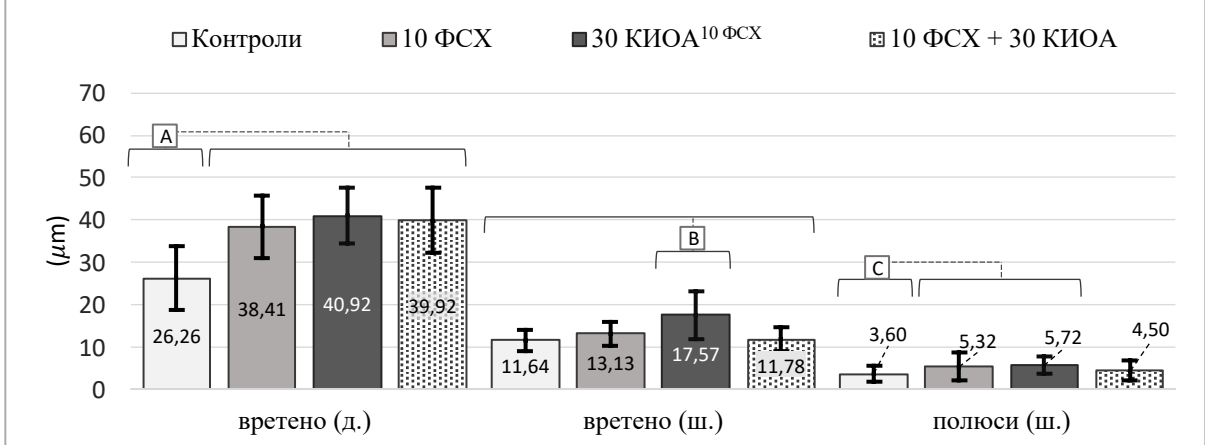
Фигура 30

Степен на зрялост

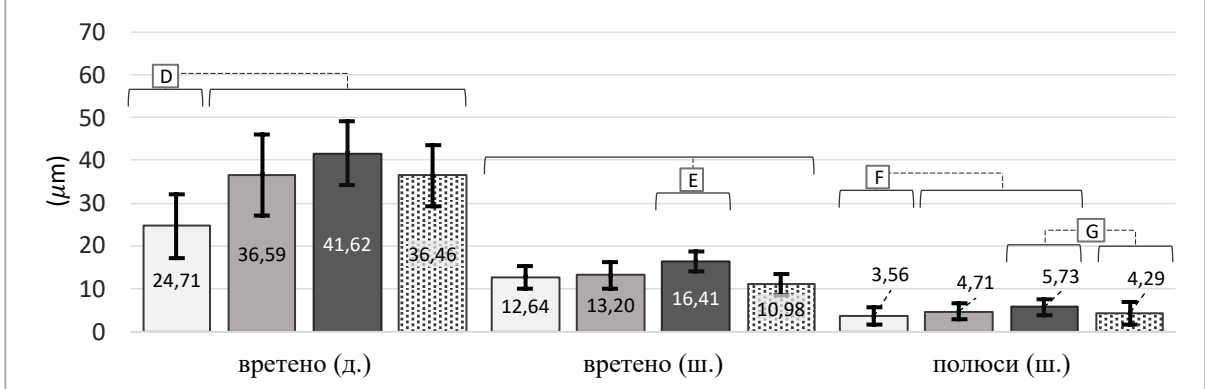


Фигура 31

Мейотично вретено в М I

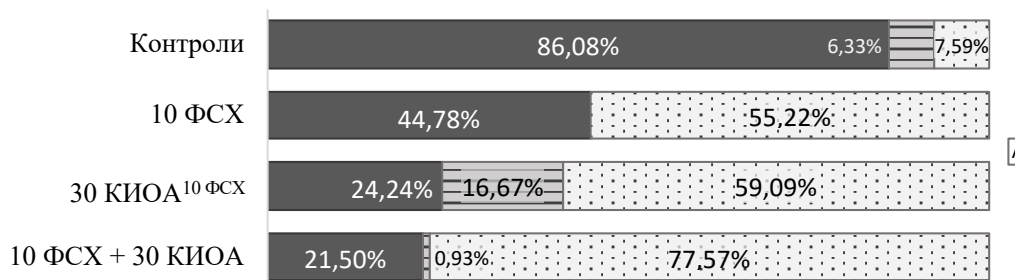


Мейотично вретено в М II

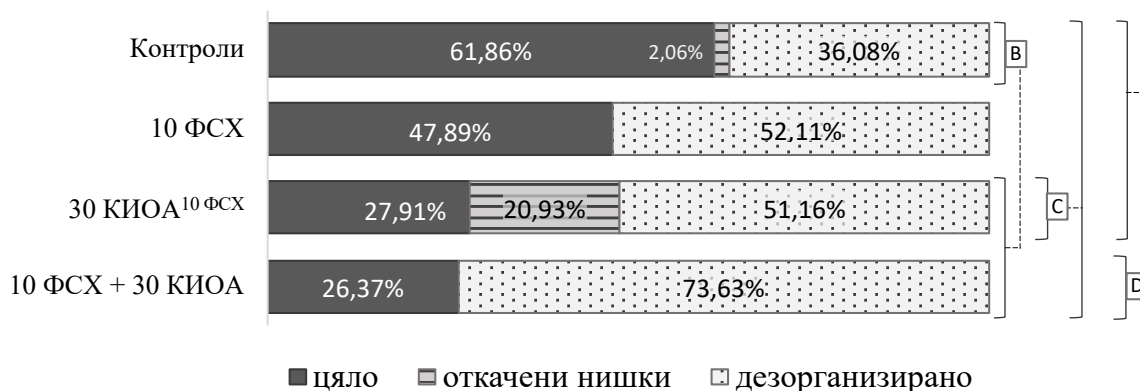


Фигура 32

Състояние на вретеното в М I

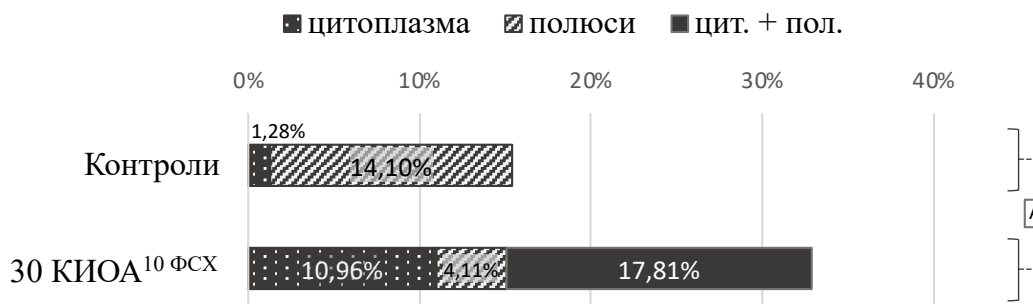


Състояние на вретеното в М II

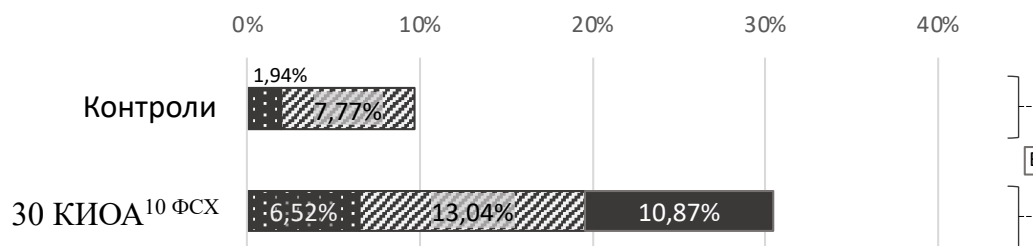


Фигура 33

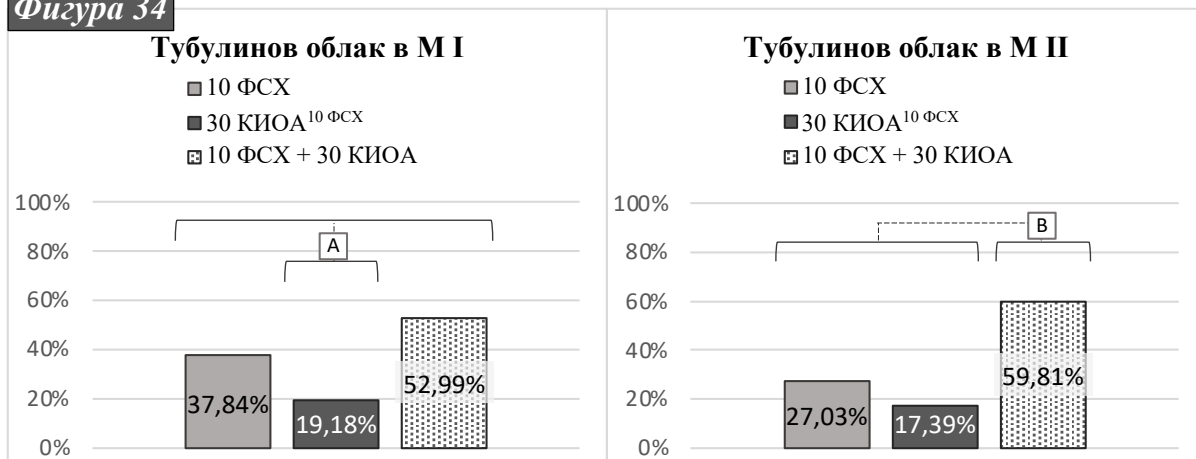
Тубулинови астери в М I



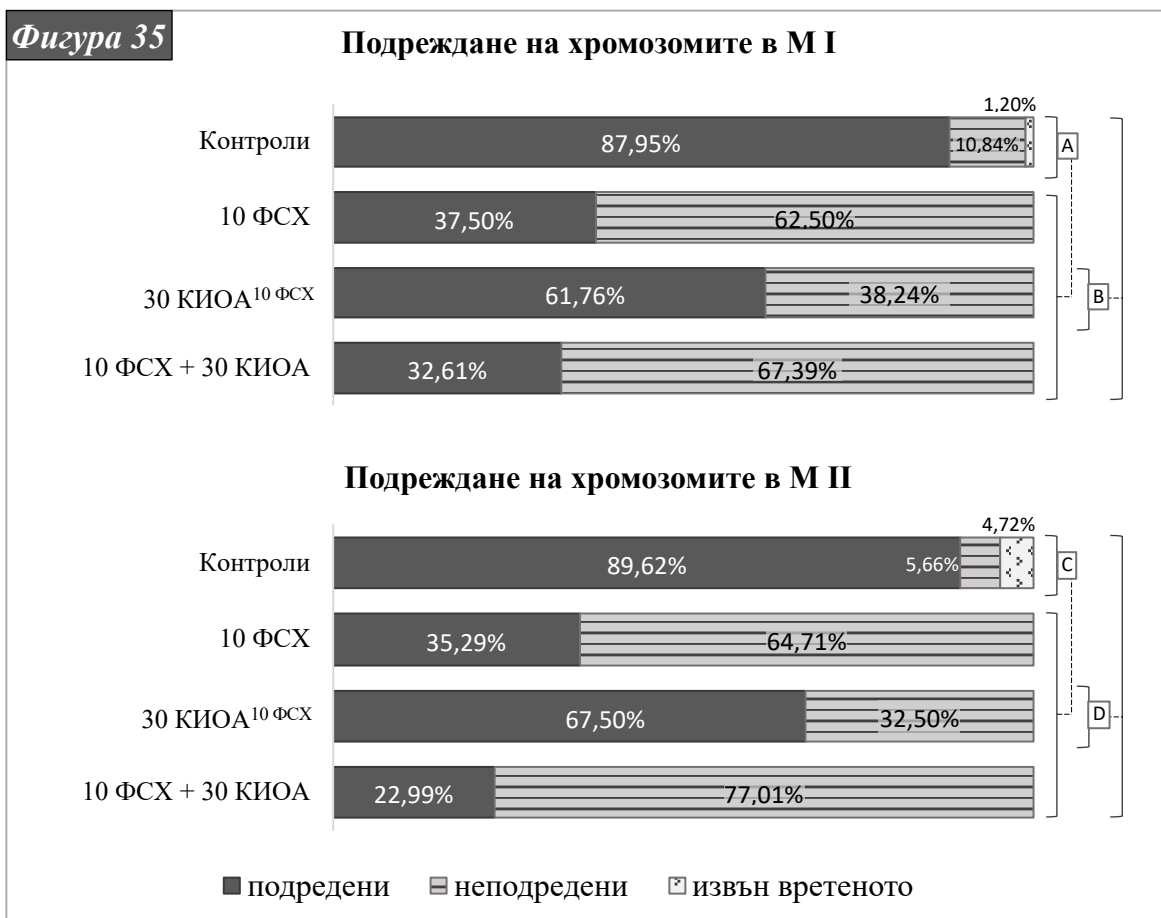
Тубулинови астери в М II



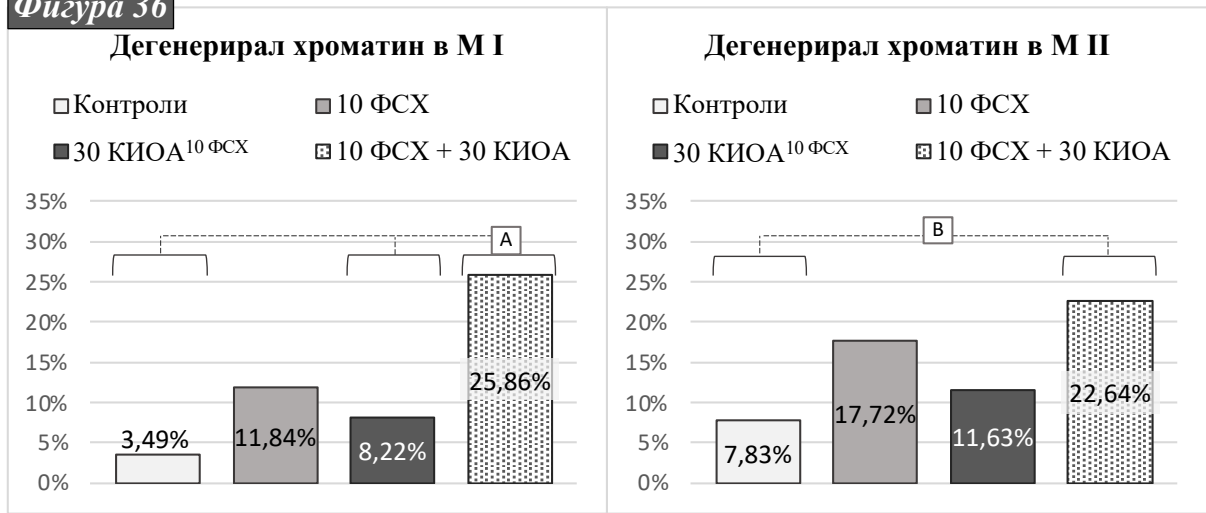
Фигура 34



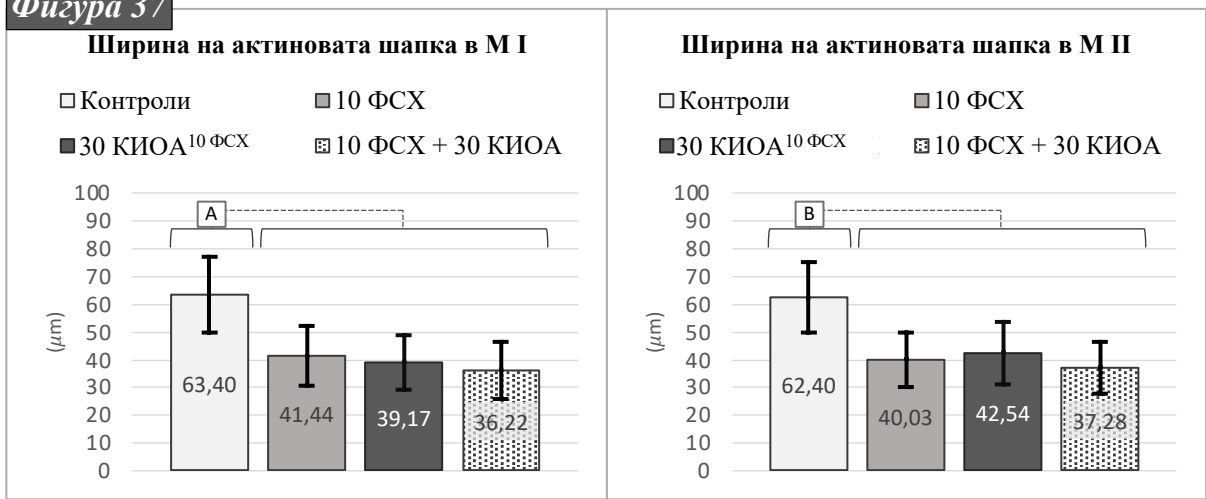
Фигура 35



Фигура 36



Фигура 37



Фигура 38

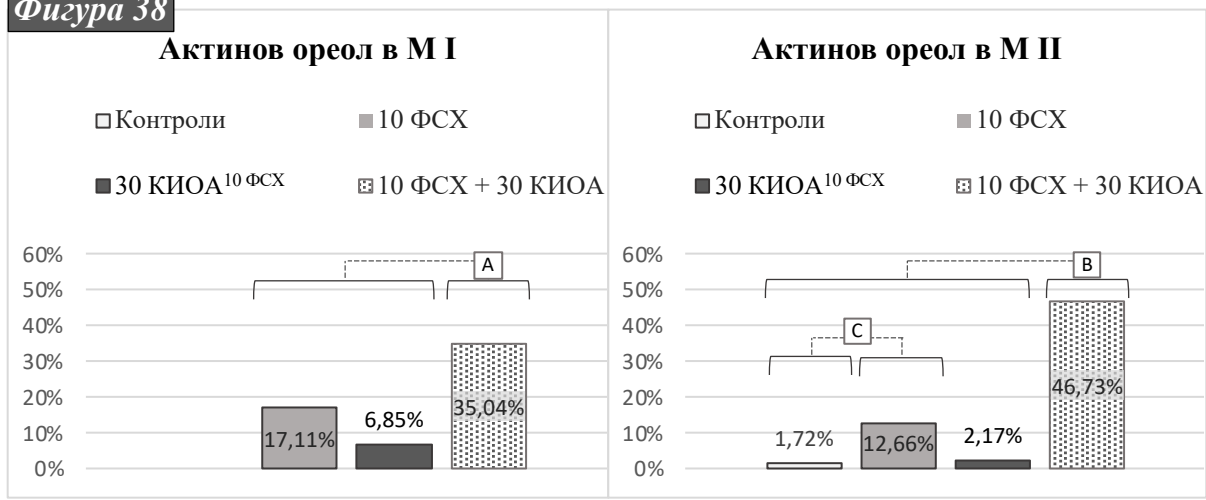


Таблица 1. Брой и относителен дял по стадии на овоцитите, свързани с КИОА. Обяснение на използваните категории: „до М I“ – стадии *GV /GVBD* (по-ранни от Метафаза I); „М I“ – Метафаза I; „Ана I/Тело I“ – стадии Анафаза I или Телофаза I (след Метафаза I); „М II“ – Метафаза II; „Ана II/Тело II“ – стадии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

Таблица 2. Брой и относителен дял по стадии на овоцитите, свързани с изследването за *PGF2 α* . 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.

Фигура 1А. Ляво: Епифлуоресценция - контролен овоцит в М I с нормално вретено (зелено), комбиниран образ с подредените хромозоми (синьо); Дясно: същото вретено с актиновата шапка (червено). епифлуоресцентни образи. Въмъкнатата 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 1000x. 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. Въмъкнатата 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 1000x. Бар = 10 μm .

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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 2В. Овоцит от група **Контроли**^{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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 3. 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. Въмъкнатата 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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 4А. 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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 4В. Актинов ореол в овоцитна метафаза първа, група **30 КИОА**^{Нут}. Находката е типична за яйцеклетките с 30-дневен остеоартрит.

Фигура 5. Яйцеклетка в М II от група **Е2**^{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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 6. Овоцит в М II от **30 КИОА + E2^{НУТ}**. 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 .

Фигура 7. Овоцит в М 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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 8. Метафаза II овоцит от група **18 КИОА + E2^{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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 9. 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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 10. Овоцит от група **30 КИОА¹⁰ 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 1000x. Бар = 10 μm .

Фигура 11. 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 1000x. 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 1000x. Бар = 10 μm .

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 1000x. Баровете са 20 μm . *A* – контролен овоцит в метафаза II (група **Контроли 0 PGF2 α**) 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 PGF2 α** (инкубация с 50 ng/ml простагландин *F2 α*). 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 PGF2 α** (инкубация с 100 ng/ml простагландин *F2 α*). Оцветяването за тубулин и актин е дифузно, няма мейотично вретено и кортикален актинов слой, а метафазната пластинка е дезорганизирана.

Фигура 14. Сравнение на степента на зрялост при некомбинираните фактори. Групите 30 КИОА, E2^{Hyт} и 10 ФСХ са сравнени по категории. А - 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.

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. А – сравнение на Контроли спрямо 30 КИОА и 10 ФСХ (ANOVA и GH: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли спрямо E2^{Hyт} (KW и MW: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). В – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли и 10 ФСХ (ANOVA и GH: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на 30 КИОА спрямо E2^{Hyт} (KW и MW: за всички $p_i < 0,05$ и $p_{Hoch} < 0,05$). С – сравнение на E2^{Hyт} 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^{Hyт} (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^{Hyт} (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^{Hyт} (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^{Hyт} 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^{Hyт} (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^{Hyт} (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.

Фигура 16. Сравнение на състоянието на мейотичното вретено при некомбинирани фактори. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. А – Между всяка група спрямо друга има статистически значима разлика ($p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. В – сравнение на 30 КИОА спрямо Контроли, E2^{Hyт} 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.

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.

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 E2^{Hyт} (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 E2^{Hyт} (за всички: $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,01$). С – сравнение на E2^{Hyт} 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.

Фигура 19. Наличие на дегенериран хроматин при групите с некомбиниран фактори. Отляво: дегенериран хроматин в М I. А – сравнение на 10 ФСХ спрямо 30 КИОА ($p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,05$). Отдясно: дегенериран 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.

Фигура 20. Ширина на актиновата шапка при групите с некомбиниран 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 $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,01$). В – сравнение на $E2^{Hyt}$ 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. С – сравнение на 10 ФСХ спрямо Контроли и 30 КИОА (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,05$), както и спрямо $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,01$). D – сравнение на $E2^{Hyt}$ спрямо Контроли (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,01$). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Фигура 21. Наличие на актинов ореол при групите с некомбиниран фактори. Отляво: наличие на актинов ореол в М I. А – сравнение на 30 КИОА спрямо 10 ФСХ ($p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). Отдясно: наличие на актинов ореол в М II. В – сравнение на 30 КИОА спрямо 10 ФСХ ($p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). С – 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.

Фигура 22. Сравнение на съотношението по стадии при комбиниране на остеоартрит и E2. Представени са групите от Таблица 3, сравнени по категории. А – сравнение на 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ 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.

Фигура 23. Сравнение на средните стойности за дължина, ширина и ширина на полюси на мейотичното вретено при комбиниране на остеоартрит и E2. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. А – сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо $E2^{Hyt}$ и 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). В – сравнение на 18 КИОА^{Hyt} спрямо $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,05$) и 18 КИОА^{Hyt} (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$). С – сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо $E2^{Hyt}$ и 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). D – сравнение на $E2^{Hyt}$ спрямо 18 КИОА^{Hyt} (*KW* и *MW*: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,05$). E – сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). F – сравнение на $E2^{Hyt}$ спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ и 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. G – сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо $E2^{Hyt}$ и 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). H – сравнение на $E2^{Hyt}$ спрямо 18 КИОА^{Hyt} и 30 КИОА^{Hyt} (*KW* и *MW*: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,05$). I – сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Hyt} спрямо $E2^{Hyt}$ и 30 КИОА + $E2^{Hyt}$ (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). J – сравнение на Контроли спрямо 18 КИОА^{Hyt}, 30 КИОА^{Hyt}, 18

КИОА + E2^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на Контроли^{Нут} спрямо E2^{Нут} и 30 КИОА + E2^{Нут} (*KW* и *MW*: за всички $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,001$). *K* – сравнение на E2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 18 КИОА + E2^{Нут} и 30 КИОА + E2^{Нут} (*KW* и *MW*: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,05$). p_i – точен тест на Фишър-Фрийман-Халтън; p_{Hoch} – корекция на p_i за множествени сравнения по метода на Хочбърг.

Фигура 24. Сравнение на състоянието на мейотичното вретено при комбиниране на остеоартрит и E2. Отгоре: Данни за мейотично вретено в М I. *A* – 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 E2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + E2^{Нут} (за всички: $p_i < 0,05$; $p_{Hoch} < 0,05$). *C* – сравнение на 18 КИОА + E2^{Нут} спрямо 30 КИОА^{Нут}, E2^{Нут}, 18 КИОА + E2^{Нут} (за всички: $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,01$) *D* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, E2^{Нут} и 30 КИОА + E2^{Нут}. Отдолу: Данни за мейотично вретено в М II. *E* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут}, E2^{Нут} и 18 КИОА + E2^{Нут} (за всички: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,01$). *F* – сравнение на E2^{Нут} спрямо 30 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + E2^{Нут} (за всички: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,01$). *G* – сравнение на 18 КИОА + E2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и E2^{Нут} (за всички: $p_i < 0,01$; $p_{Hoch} < 0,05$). *G* – сравнение на Контроли^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + E2^{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.

Фигура 25. Наличие на тубулинови астери в овоплазмата при комбиниране на остеоартрит и E2. 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.

Фигура 26. Подреждане на хромозомите в метафазното вретено при комбиниране на остеоартрит и E2. Отгоре: подреждане на хромозомите в М I. *A* – сравнение на 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и E2^{Нут} ($p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,05$). Отдолу: подреждане на хромозомите в М II. *B* – сравнение на 18 КИОА^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и E2^{Нут} ($p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,05$). *C* – сравнение на E2^{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 E2. Отгоре: дегенерирал хроматин в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА + E2^{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.

Фигура 28. Ширина на актиновата шапка при комбиниране на остеоартрит и E2. Отляво: обща средна ширина на актиновата шапка в М I. *A* – сравнение на 18 КИОА + E2^{Нут}

спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$); сравнение на 18 КИОА + E2^{Нут} спрямо и 30 КИОА + E2^{Нут} (*KW* и *MW*: $p_i < 0,001$; $p_{Hoch} < 0,01$). *B* – сравнение на E2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут}, 18 КИОА^{Нут}, 30 КИОА^{Нут} и 30 КИОА + E2^{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 + E2^{Нут} спрямо Контроли^{Нут} и 30 КИОА^{Нут} (*ANOVA* и *GH*: за всички $p_i < 0,001$). *D* – сравнение на E2^{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.

Фигура 29. Наличие на актинов ореол в овоцити при комбиниране на остеоартрит и E2. Отляво: наличие на актинов ореол в М I. *A* – сравнение на 30 КИОА^{Нут} спрямо 18 КИОА^{Нут} и 18 КИОА + E2^{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 + E2^{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.

Фигура 30. Сравнение на съотношението по стадии при комбинирането на остеоартрит и ФСХ. Представени са групите от Таблица 4, сравнени по категории. *A* – 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.

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 $p_i < 0,05$).

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.

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.

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.

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 $p_i < 0,001$).

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.

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 M I и за M 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.

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. Въпреки че в овоцитната мейоза *SAC* е по-малко точна и надеждна в сравнение с митозата (Kyogoku & Kitajima, 2017)(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 вретено 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 вретено 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 $TNF-\alpha$, $IL-1$ 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 (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 неотдашните 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 дезорганизиран микротубули, включително астрални микротубули, биха могли

да са резултат от абнормално усилен 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 двуполусно 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 М I и М 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 М 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. Намалването 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; Sun et al., 2012). Намалването 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 М I и неотделяне на първото полярно телце в миши овоцити (Chen et al., 2016). Такъв механизъм на дезорганизация би могъл да обясни увеличението дял на овоцити в М 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 дезорганизиранни нишки. Освен това актиновият цитоскелет в нашите КИОА овоцити образува характерен широк деполяризиран овоплазмен ореол както през М I, така и през М II.

С оглед на описаните резултати интерес представлява публикувано изследване на стареещи миши овоцити (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 М I, така и в М 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 М I и М 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 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 горесцитираните 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.

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+E2^{Нут} са регистрирани най-висок процент дегенерирани 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 II 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 артритата 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 е 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 дегенерирани 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 *МТОС*, 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 М I при 30 КИОА+Е2^{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 Е2^{Нут} и 18 КИОА+Е2^{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^{Hyt} и 18 КИОА+E2^{Hyt}) и възпалението – образуване на относително плътен актинов ореол, особено при група 30 КИОА^{Hyt}. 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 ѝ 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 17β -хидростероид-дехидрогеназа (*17\beta*-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 (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 третираня: 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 оплождане. 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 M 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 M II яйцеклетки за трите ФСХ групи. В тези групи е регистриран и най-висок процент дегенерирани клетки ([Таблица 1](#)).

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. Третирани с ФСХ групи имат най-висок процент дезорганизиран вретена, като при 10 ФСХ + 30 КИОА те достигат до около 3/4 от анализирани 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 група 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 ФХС групи. Групата 30 КИОА^{10 ФСХ}, въпреки дефектите на вретеното, има относително висок процент подредени

метофазни 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 зреење. Нарушения при свързването на кинетохорните микротубули с метафазата на овоцита биха нарушили подредбата на хромозомите и тяхната бъдеща сегрегация. Вероятно това е главната причина за цялостното засягане на тубулиновия, актиновия цитоскелет и подредбата на метафазите при тези групи. При група 30 КИОА^{10 ФСХ} обаче се наблюдава добро подреждане на хромозомите на фона на високия процент дезорганизиран 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).

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.

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 $F2\alpha$

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 $F2\alpha$, 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 $F2\alpha$ има роля в репродуктивния цикъл, но тя е свързана с лутеализата (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 $F2\alpha$, 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 $F2\alpha$. Тъй като целта ни беше да проучим въздействието му в максимално опростена моделна система, не приложихме простагландин 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 $PGF2\alpha$). За разлика от тях третираните с простагландин $F2\alpha$ клетки се отличават с

дегенерация както на вретеното, така и на актиновата шапка. Тези промени на цитоскелета са зависими от дозата.

В групата 50 *PGF2 α* , 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 *F2 α* върху микротубулите или микрофиламентите, макар че неотдавна е установено, че той дезорганизира интермедиерните филаменти в тека-клетките на жълтото тяло (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 мейотично 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 *PGF2 α*) 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 разпаднат.

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 $F2\alpha$ се основават на пряко въздействие върху овоцита.

В заключение нашето изследване показва за първи път, че простагландин $F2\alpha$, 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.

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 дегенерирани 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 $F2\alpha$, 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 асистирания репродуктивни подходи в случаи на пациентки с остеоартрит.

5. Доказано е дегенеративното влияние на медиатора на възпалението простагландин $F2\alpha$ 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 F2 α Causes Fast Degenerative Changes in Ovulated Mouse Oocytes. *Folia Biologica (Czech Republic)*, 67(5–6). <https://doi.org/10.14712/FB2021067050208>

Участия в научни форуми, свързани с работата по дисертацията:

Постери на национален форум на български език:

Коларов А., Чакърова И., Ганова П., Хаджинешева В., Делимитрева С., Николова В., Маркова М., Ивановска Н., Живкова Р. Влияние на естрадиол върху цитоскелета на овоцити от мишки с колагеназа-индуциран остеоартрит. XIII Национална конференция по медицинска биология, 13 – 15. 09. 2019 г., Варна.

Живкова Р., Коларов А., Ганова П., Чакърова И., Хаджинешева В., Николова В., Делимитрева С., Маркова М., Ивановска Н. Сравнение на ефекта от два различни режима на третиране с естрадиол върху цитоскелета в овоцити от мишки с експериментален остеоартрит. XIII Национална конференция по медицинска биология, 13 – 15. 09. 2019 г., Варна.

Постери на национален форум на английски език:

Kolarov A., Chakarova I., Hadzhinesheva V., Nikolova V., Kirilova V., Delimitreva S., Markova M., Zhivkova R.. Meiotic spindle and actin cap peculiarities in oocytes from mouse model of osteoarthritis after FSH treatment. XIV Национална Конференция по Медицинска Биология", 02 – 04 юни 2023г.,гр. Варна

Zhivkova R., Kolarov A., Chakarova I., Hadzhinesheva V., Nikolova V., Delimitreva S., Markova M.. Effect of two different variants of FSH treatment on the metaphase plate formation in mouse oocytes with experimental osteoarthritis. XIV Национална Конференция по Медицинска Биология", 02 – 04 юни 2023г.,гр. Варна

Kolarov A., Chakarova I., Hadzhinesheva V., Delimitreva S., Markova M., Nikolova V., Mourdjeva M., Zhivkova R.. Oocyte morphology in a mouse model of collagenase-induced osteoarthritis. VIII National Conference With International Participation „Morphological Days“. June 10-12, 2022, Sofia, Bulgaria

БЛАГОДАРНОСТИ

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

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