

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по биология и имунология на размножаването

„акад.К.Братанов”

Ивайло Методиев Вангелов

Анти-овариални антитела и инфертилитет

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на научно-образователна степен „Доктор”

Научен консултант: доц. Мария Д. Иванова

Рецензенти: проф. Димитрина Диканарова, доц. Милена Мурджева

Специалност Имунология 01.06.23

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 115 стр., илюстриран с 16 фигури и 18 таблици.
В библиографския списък са цитирани 250 литературни източника.
Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в ИБИР-БАН.

Публичната защитана дисертационния труд ще се състои на 11.04.2017г. от 11.30 часа в заседателната зала на ИБИР-БАН, София, бул. "Цариградско шосе" №73, София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН на открито заседание на научно жури в състав:

Проф. Димитрина Диканарова – рецензент
Доц. Милена Мурджева – рецензент
Акад. Богдан Петрунов – становище
Доц. Мария Иванова – становище
Доц. Таня Димова – становище

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, гр. София, бул. "Цариградско шосе" №73, както и на web страницата на ИБИР (<http://ibir.bas.bg>).

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците са същите както в дисертационния труд.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AOAs - anti-ovarian antibodies, антиовариални антитела
COS - controlled ovarian stimulation, контролирана овариална стимулация
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay, ензим-свързан имуносорбентен тест
ET - embryo transfer, ембрио трансфер
GLCs - granulosa luteinized cells, гранулоза лутеинизирани клетки
IFN - interferon, интерферон
IVF - in vitro fertilization, ин витро оплождане
OD - optical density, оптична плътност
OPD - ortho-phenylenediamine dihydrochloride, орто-фенилендиамин дихидрохлорид
PBS - phosphate buffered saline, фосфатно буфериран разтвор
POF - premature ovarian failure, преждевременна овариална недостатъчност
SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел електрофореза
TBS - Tris buffered saline, Tris буфериран разтвор
TNF - tumor necrosis factor, тумор некротизиращ фактор
ZP - zona pellucida, зона пелуцида

1. УВОД

Женското безплодие е комплексно явление, което включва влиянието на вродения и адаптивния имунитет с участието на програмираната клетъчна смърт (апоптозата) и на някои паракринни фактори. Важно място в имунологично обусловеното безплодие заема автоимунитетът срещу овариални, адренални и тиреоидни структури, който води до развитието на преждевременна овариална недостатъчност (POF). Освен с POF, овариалният автоимунитет е свързан с поликистозния овариален синдром, ендометриозата и със случаите на идиопатичното безплодие. Овариалният автоимунитет предизвиква дисфункция на растящите и зреещите фоликули, но не засяга примордиалния фоликулен пул. Хистопатологичната овариална находка включва селективно инфилтриране на мононуклеарни клетки в големите антрални фоликули и Т-клетъчно медирано увреждане на тека клетките, а в серума присъстват анти-овариални антитела (AOAs). Анти-овариални антитела срещу ооцити, зона пелуцида (ZP), тека интерна, тека гранулоза и срещу лутеални клетки могат да бъдат открити много преди клиничните симптоми на безплодието, което характеризира AOAs като независими “ранни” маркери за диагностика на овариалната недостатъчност. Гранулоза лутеинните клетки (GLCs) са основната популация соматични клетки в преовулаторния фоликул. В крайните етапи на своята диференциация, която се реализира под влияние на пика на лутеинизиращия хормон, те се характеризират с относителна резистентност към апоптоза. Абнормално повишената апоптоза на GLCs в преовулаторния фоликул е в състояние да доведе до нарушения в лутеогенезата, а поради прекия контакт на тези клетки с ооцита е възможно да наруши неговата компетентност за оплождане и развитие. В този аспект, особено важни са най-новите данни, които показват, че комуникацията между вродената и адаптивната имунна система в яйчника се инициира от сигнали за “опасност”, които отделят апоптичните цитокератин-негативни гранулозни клетки, и се направлява от специализирани цитокератин-позитивни гранулозни клетки, чиято диференциация е свързана с превръщането им в зрели дендритни клетки, способни да преработват и представят антигени и да “обучават” наивни Т клетки. Това беше важна предпоставка за насочване на нашето внимание и цел към **изследване на нивата и клиничното значение на антителата срещу антигени на преовулаторни GLCs и връзката им с апоптозата на GLCs и секрецията на провъзпалителни цитокини при инфертилни жени в програма за *ин витро* оплождане-ембрио трансфер (IVF-ET).** Формулирана беше работна

хипотеза, че преовулаторните GLCs са потенциален източник на прицелни антигени при някои от случаите на имунологично обусловеното безплодие при жената.

Работната хипотеза насочи изследванията ни към изясняване:

- Каква е честотата на анти-GLCs антителата при инфертилни жени в програми за IVF-ET и при фертилни жени?
- Кои са прицелните антигени на анти-GLCs антителата, проявяват ли тези антитела междувидова кръстосана реактивност и кой е изотипния им клас?
- Има ли връзка между наличието на анти-GLCs антителата, апоптозата на прицелните им клетки и провъзпалителната микросреда във фоликула?
- Какво е клиничното значение на анти-GLCs антителата при инфертилните жени в програмите за IVF-ET?

Отговора на тези въпроси е свързан с получаване на данни за биохимичната и имунологична характеристика на прицелните антигени на анти-GLCs антителата и за тяхната биологична роля, което ще е стъпка напред в характеризиране на овариалния автоимунитет и в дефиниране ролята на прицелните антигени, свързани с него. Получените резултати могат да са основа за изясняване някои страни в патологията на имунологично обусловената дисфункция на яйчника, както и за разработване на акуратни методи за нейното диагностициране.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на нивата и клиничното значение на антителата срещу антигени на преовулаторни гранулоза лутеинизирани клетки (анти-GLCs антитела) и връзката им с апоптозата на GLCs и секрецията на провъзпалителни цитокини при инфертилни жени в програмата за *in vitro* оплождане-ембрио трансфер.

За осъществяване на поставената цел предвидихме изпълнението на следните задачи:

1. Разработване и валидиране на индиректни имуно-ензимни тестове за установяване на анти-GLCs и анти-ZP антитела в серум и фоликулна течност.
2. Изследване на серуми и фоликулни течности от инфертилни жени в програми за IVF-ET за наличие на анти-овариални антитела – анти-GLCs и анти-ZP антитела.
3. Проучвания върху клиничното значение на анти-овариалните антитела при инфертилни жени в програми за IVF-ET.
4. Идентифициране на прицелните антигени на анти-GLCs антителата.
5. Проследяване на нивата на провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ във фоликулните течности на жени с овариална етиология за безплодие.
6. Проследяване на апоптичния индекс на GLCs при жени с овариална етиология за безплодие.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Проучвани групи жени

Обект на проучвания бяха 394 жени, които при отделните проследявания бяха категоризирани според фертилния статус, както следва:

- пациентски групи – инфертилни жени (n=296), контролни групи – фертилни жени (n=98, Схема 1).

Инфертилните жени допълнително бяха категоризирани последните критерии:

- етиологични причини за безплодие – пациентски групи с комбиниран, тубарен и с овариален стерилитет;
- отговор на контролирана овариална стимулация (COS) – пациентски групи с добъри с лош отговор на COS;
- ниво на IVF – пациентски групи с високо и с ниско ниво на IVF.

Контролираната овариална стимулация беше проведена във II САГБАЛ “Шейново” и в МЦ “РепроБиоМед”, както следва:

- “Къс протокол” на COS – Decapeptyl (Ipsen) (подкожно, 0.1 mg/ден) и Humegon (Organon), или
- “дълъг протокол” на COS – Decapeptyl (Ipsen) и рекомбинантен FSH (Puregon) (Merck Sharp).

От инфертилните жени бяха получени фоликулни аспирати и серуми, съпроводени с индивидуални данни за възрастта, етиологичните причини за безплодието, броя на пунктираните фоликули, броя на получените ооцити и броя на оплодените ооцити. Фоликулни аспирати от инфертилни жени, в програми за асистирана репродукция към I АГ болница “Св. София” и МЦ “Вяра”, бяха използвани за изолиране на GLCs, от които след това беше подготвен антигенен материал за имуно-ензимните тестове.

От 73 фертилни жени, всяка от които беше клинично-здрава кръводарителка, имаше нормален менструален цикъл и беше родила поне 1 дете в годината на съответното проучване, бяха получени серуми, а фоликулни аспирати бяха получени от 25 фертилни жени с нормален менструален цикъл, всяка от които беше партньорка в семейна двойка с мъжки фактор за безплодието. За всяка фертилна жена бяха получени данни за възрастта. Всеки биологичен материал беше получен след информирано съгласие, а проучванията бяха проведени след разрешение от комисиите по медицинска етика към съответните медицински заведения. За нито една инфертилна или фертилна жена нямаше данни да е имала или да има към момента на съответното изследване диагностицирано аутоимунно заболяване. Експерименталната част на всички проучвания беше реализирана в лабораториите към секция “Имунобиология на Размножаването” и секция “Молекулярна Имунология” на Институт по Биология и Имунология на Размножаването “Акад. Кирил Братанов”.

3.2. Изолиране на гранулоза лутеинизирани клетки и на зона пелуцида

3.2.1. Гранулоза лутеинизирани клетки

Човешките GLCs бяха изолирани от фоликулни аспирати, неконтаминирани с кръв. Изолирането беше проведено при +20°C. Фоликулният аспират беше центрофугиран на 200×g (10 min) и фоликулната течност беше събрана и съхранена на -20°C за последващо изследване за анти-GLCs антитела и/или на -80°C за последващо измерване на концентрациите на TNFα и IFNγ. Клетъчната пелетка беше ресуспендирана в HAM F-10 (Sigma-Aldrich) и надслоена върху Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). След центрофугиране на 300×g (30 min), агрегатите от GLCs бяха събрани от интерфазата, ресуспендирани във фосфатно-буферен разтвор (PBS, pH 7.2) и промити чрез центрофугиране на 200 ×g(10 min). Седиментирани GLCs бяха ресуспендирани в минимален обем PBS (pH 7.2) и съхранени на -20°C. Свинските и говеждите GLCs бяха изолирани от яйчници (кланичен материал). С игла No. 19 и с игла No. 18 бяха пунктирани преовулаторни фоликули с диаметър 8-10 mm и 15 mm съответно. Фоликулните аспирати бяха събрани в стерилни

спринцовки (обем, 10 ml). От всеки аспират, под стерео микроскоп бяха събрани кумулус-ооцитните комплекси, след което GLCs бяха изолирани по методичния протокол, описан в предходния параграф.

3.2.2. Зона пелуцида

Зона пелуцида беше изолирана от свински яйчници (кланичен материал). Яйчниците бяха смлени при +4°C. През редица от сита (диаметър на пори, 200/125/75 µm) смленият материал беше промит с охладен до +4°C PBS (pH 7.2). Изолираната ZP беше събрана под стерео микроскоп, в минимален обем PBS (pH 7.4). За солюбилизирането на ZP беше следван определен методичен протокол (Ivanova et al., 1985).

3.3. Подготовка на антигенен материал за имуно-ензимни тестове

3.3.1. Подготвяне на антигенен материал от гранулоза лутеинизирани клетки за индиректен ELISA

Антигенният материал за индиректен ELISA се приготвя от GLCs на 15 инфертилни жени или от GLCs от преовулаторните фоликули в 20 свински или говежди яйчника. Методичният протокол, който е описан по-долу, се изпълнява при +4°C. Гранулоза лутеинизирани клетки бяха ресуспендирани в PBS (pH 7.2) с протеазни инхибитори (Sigma-Aldrich) и бяха седиментирани на 10000 ×g (10 min). Клетъчната пелетка беше инкубирана със суплементиран с протеазни инхибитори RIPA буфер (Sigma-Aldrich) за 2 h, през които беше вортексирана за 10 sec на всеки 10 min. Екстрахираните GLC антигени бяха събрани след центрофугиране на 10 000 × g (10 min). От тях беше отделена 0.02 ml аликвота за определяне на концентрацията на протеина, а останалата част беше съхранена на -20°C.

3.3.2. Подготвяне на антигенен материал от гранулоза лутеинизирани клетки за имуноблот

Антигенният материал за имуноблот се приготвя от GLCs на 3 инфертилни жени, след като се определи концентрацията на виталните клетки в 1 ml суспензия. Гранулоза лутеинизирани клетки бяха промити чрез центрофугиране (200 × g, 10 min) в Tris-буфериран разтвор (TBS, pH 8.0). Клетъчната пелетка беше ресуспендирана в 0.1 ml TBS (pH 8.0) и от суспензията беше отделена 0.01 ml аликвота, която беше смесена с еквивалентен обем Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Под микроскоп бяха изброени виталните клетки в 25 квадрата на камера на Бюргер. Концентрацията на виталните клетки в 1 ml суспензия беше изчислена по формула "брой витални клетки × 2 × 10⁴" (2 – фактор на разреждане с Trypan Blue) и беше коригирана с TBS (pH 8.0) до 2×10⁴ GLCs/ml. Коригираната суспензия беше смесена с еквивалентен обем редуциращ буфер за проби за електрофореза. Антигените бяха екстрахирани на 0°C (1 min), а след това бяха денатурирани на +100°C (7 min). Екстрахираните GLC антигени бяха събрани след центрофугиране на 10000 ×g (10 min, +4°C). От тях беше отделена 0.02 ml аликвота за определяне на концентрацията на протеина, а останалата част беше използвана непосредствено или беше съхранена на -20°C.

3.3.3. Подготвяне на антигенен материал от зона пелуцида за индиректен ELISA

Зона пелуцида беше солюбилизирана на +73°C (35 min) с последващо охлаждане до +20°C. Солюбилизираните ZP антигени бяха събрани след центрофугиране на 12 000×g (30 min, +4°C). От тях беше отделена 0.02 ml аликвота за определяне на концентрацията на протеина, а останалата част беше съхранена на -20°C.

3.4. Определяне на концентрацията на протеин в антигенните материали за имуно-ензимни тестове

3.4.1. Определяне на концентрацията на протеин в антигенен материал за индиректен ELISA

Концентрацията на протеин в антигенния материал за ELISA се определя по метод на Брадфорд. В ямки на микротитърна плака бяха смесени 0.02 ml реагент на Брадфорд (Bio-Rad) и 0.01 ml антигенен материал или 0.01 ml протеинов стандарт (човешки серумен албумин, Sigma-Aldrich). След инкубация на +20°C (10 min), стойностите на оптичната плътност за изследваните проби бяха регистрирани с ELISA reader (LKB, Roma, Italy) при 595 nm (OD 595). С OD 595 данните за протеиновия стандарт беше построена стандартна права, която отразява зависимостта между тях и съответните концентрации на стандарта (0-0.5 mg/ml). От нея беше определена концентрацията на протеина в изследвания антигенен материал, която беше коригирана с фактор 0.01 (обема на антигенната проба), а когато се налагаше, беше коригирана и с фактор 11 или с фактор 101 (разреждането на антигенната проба, 1:10 или 1:100).

3.4.2. Определяне на концентрацията на протеин в антигенен материал за имуноблот

Концентрацията на протеин в антигенния материал за имуноблот се определя по модифициран метод на Брадфорд. Антигенната проба беше подложена на предварителна обработка, като 0.01 ml от нея бяха смесени с 0.04 ml бидестилирана вода и с 0.05 ml 50% трихлороцетна киселина (TCA), след което сместа беше инкубирана на 0°C (10 min). След центрофугиране на 10000 × g (1 min, +4°C), седиментът беше разтворен в 10% TCA, и разтворът беше центрофугиран при същите условия. Новият седимент беше разтворен в 0.1 ml 1M натриева основа и бяха добавени 0.9 ml бидестилирана вода. Концентрацията на протеина в така обработената антигенна проба беше определена по протокола в подточка 4.1.

3.5. Натриев додецилсулфат-полиакриламиден гел електрофореза и електропренос на протеини

Електрофоретичното разделяне на GLC протеините беше проведено с апарат Mini-PROTEAN II на фирмата Bio-Rad, а пренасянето им върху нитроцелулозна мембрана, в графитена камера на същата фирма. Оптималната концентрация на протеина в антигенния материал, оптималният % на разделящия гел и оптималната продължителност на електропреноса бяха уточнени с предварителни експерименти. Антигенният материал от GLCs (0.002 mg протеин/μl, 0.02 ml/старт) и цветният молекулен маркер на фирмата Bio-Rad (0.01 ml/старт) бяха разделени на 12 % полиакриламиден гел при електрическо напрежение 180 V/sm. Разделените протеини бяха пренесени върху нитроцелулозна мембрана (0.45 μm пори, Sigma-Aldrich) при сила на електрическия ток 38.4 mA (50 min). Ефективността на електропреноса беше контролирана чрез временно оцветяване на мембраната с 0.2% Ponceau S (Sigma-Aldrich). От мембраната бяха изрязани стрипове с електрофоретично разделени протеини, които бяха инкубирани за 12 h (+20°C) в блокиращ буфер (5% сухо обезмаслено мляко – 0.05% Tween-20 – TBS pH 8.0).

3.6. Имуно-ензимни тестове

3.6.1. Имуноблот

Оптималното разреждане на изследваните серуми и на алкално-фосфатазния конюгат бяха определени след предварителни експерименти, посредством подхода “серийни разреждания”. Всички инкубации бяха проведени при +20°C с междинни промивания (3× 10 min) с буфер за промиване (0.1% Tween-20 – TBS pH 8.0).

Мембранните стрипове бяха инкубирани за 2 h с изследваните серуми, които бяха разреждени 1:400 с блокиращ буфер. Прицелните антигени на анти-GLCs антителата бяха визуализирани, след инкубация за 1 h с алкално-фосфатазен конюгат на кози анти-човешки поливалентен имуноглобулин (Sigma-Aldrich), който беше разреден 1:15000 с блокиращ буфер. Цветната реакция беше развита с нитроблу тетразолиум /5-бромо-4-хлоро-3-индолфосфат

(NBT/BCIP, Sigma-Aldrich). Всеки серум беше изследван 3-кратно, а при всяко изследване беше инкубиран с 2 мембранни стрипа. Специфичността на реакцията на алкално-фосфатазния конюгат беше контролирана с 1 мембранен стрип, който вместо със серум беше инкубиран за същото време (2 h) с блокиращ буфер. След всеки имуноблот беше построена стандартна права, която отразява зависимостта между логаритъма от молекулните маси на цветните стандарти (lg Mw) и изминатото от тях разстояние (Rf). По формулата $Y = Mx + B$ (Y – lgMw, M – наклон на правата, x – Rf, B – пресечна точка на правата с оста y), която описва стандартната права, беше изчислена относителната молекулна маса (Mr) на прицелните антигени на анти-GLCs антителата.

3.6.2. Ензим-свързан имуносорбентен тест

Оптималната концентрация на протеина в съответния антигенен материал и оптималното разреждане на изследваните биологични течности и на пероксидазните конюгати бяха уточнени за всеки индиректен ELISA с предварителни експерименти, в които беше използван подхода “серийни разреждания”. При всеки индиректен ELISA реагентите бяха използвани в обем 0.05 ml/ямка. Имобилизиранието на антигенните материали беше проведено при +4°C, а останалите инкубации бяха проведени при +20°C. Между инкубациите беше проведено промиване (3 × 5 min) с буфер за промиване (0.05% Tween-20 – PBS pH 7.2).

Индиректен ELISA за анти-GLCs антитела

Антигенният материал от GLCs (0.0005 mg протеин/ямка) беше имобилизиран върху микротитърни плаки (FlowLabs) за 12 h. Местата за неспецифично свързване бяха блокирани с блокиращ буфер (0.1% Tween-20 – PBS pH 7.2) за 1 h, след което беше проведена инкубация за 2 h с изследваните серуми и фоликулни течности, които бяха разредени 1:100 и съответно 1:50 с буфер за промиване. Реагиралите антитела бяха визуализирани, след инкубация за 1 h с пероксидаза-маркиран миши анти-човешки тотален имуноглобулин (НЦЗПБ-БулБио), който беше разреден 1:7500 с буфер за промиване. Цветната реакция беше развита с орто-фенилендиамин дихидрохлорид (OPD, Sigma-Aldrich) и беше спряна с 10% сярна киселина. Стойностите на оптичната плътност бяха регистрирани с ELISA reader (Labsystem-Multiscan) при 492 nm (OD 492).

Индиректен ELISA за имуноглобулинов клас на анти-GLCs антителата

Изследваните серуми бяха разредени 1:100 с буфер за промиване и бяха инкубирани за 2 h в микротитърни плаки (FlowLabs) с имобилизиран антигенен материал от GLCs (0.0005 mg протеин/ямка). Реагиралите IgM и IgG антитела бяха визуализирани, след инкубация за 1 h с пероксидазен конюгат на свински анти-човешки IgM и съответно на свински анти-човешки IgG (SEVAC), които бяха разредени 1:10000 с буфер за промиване. Цветната реакция беше развита с OPD (Sigma-Aldrich) и беше спряна с 10% сярна киселина. Стойностите на оптичната плътност бяха регистрирани с ELISA reader (LKB, Roma, Italy) при 492 nm (OD 492).

Индиректен ELISA за анти-ZP антитела

Солубилизираните ZP антигени (0.00025 mg протеин/ямка) бяха имобилизирани върху микротитърни плаки (FlowLabs) за 12 h. Местата за неспецифично свързване бяха блокирани с блокиращ буфер за 1 час. Изследваните серуми бяха разредени 1:100 с буфер за промиване и бяха инкубирани в микротитърните плаки в продължение на 2 часа. Реагиралите антитела бяха визуализирани, след инкубация за 1 ч с пероксидаза-маркиран миши анти-човешки тотален имуноглобулин (НЦЗПБ-БулБио), който беше разреден 1:8000 с буфер за промиване. Цветната реакция беше развита с OPD (Sigma-Aldrich) и беше спряна с 10% сярна киселина. Стойностите на оптичната плътност бяха регистрирани с ELISA reader (LKB, Roma, Italy) при 492 nm (OD 492).

Всяка биологична течност беше изследвана 3-кратно, а при всяко изследване беше тествана в 4 повторения. Вариациите между плаките бяха сведени до минимум като биологичните

течности на 50% от изследваните инфертилни жени и на 50% от изследваните фертилни контроли бяха тествани върху една и съща плака. Специфичността на реакцията на пероксидазния конюгат беше контролирана с 4 ямки върху всяка плака, които бяха инкубирани с блокиращ буфер вместо с биологична течност. Средната OD 492 стойност за тази контрола беше използвана за коригиране на OD 492 стойностите на всички биологични течности, които бяха тествани върху същата плака. При всяко изследване беше определено *cut-off* нивото на антитяло реактивността за контролната група, = средна OD 492 стойност за контролната група + 2 стандартни отклонения на OD 492 стойностите за същата група. *Cut-off* стойността беше използвана за дефиниране на резултата за нивото на антитяло реактивността на всяка изследвана жена, като положителен ($> \text{cut-off}$) или отрицателен ($\leq \text{cut-off}$) за съответен тип антитела.

Директен ELISA за цитокини

Измерването на концентрациите на TNF α и IFN γ във фоликулни течности беше извършено с директни ELISAs, съгласно инструкциите на производителя eBioscience: работният обем на реагентите и на биологичните течности да бъде 0.1 ml/ямка; всяка биологична течност да бъде изследвана в 2 повторения; всички инкубационни да бъдат проведени на +20°C, а между тях да бъде извършено промиване (5 \times 2 min). Рекомбинантните човешки TNF α и IFN γ (4-500 pg/ml) и фоликулните течности (неразредени) бяха инкубирани за 2 h в плаки с имобилизирани моноклонални антитела, MAB1 (мише анти-човешки TNF α) и NIP42 (мише анти-човешки IFN γ) съответно. Свързаните цитокини бяха визуализирани, след инкубация за 1 ч с биотинилирано моноклонално антитяло, MAB11 (мише анти-човешки TNF α) и 4SB3 (мише анти-човешки IFN γ) съответно, и за 30 min с пероксидаза-маркиран стрептавидин. Цветната реакция беше развита с тетраметилбензидин. Стойностите на оптичната плътност бяха регистрирани с ELISA reader (Ikb, Roma, Italy), при 450 nm (OD 450). За рекомбинантните цитокини бяха построени съответните стандартни прави, от които средните OD 450 стойности за всяка фоликулна течност бяха превърнати в концентрации на изследваните цитокини (pg/ml). Минималната чувствителност на директните ELISAs беше 4 pg/ml, а диапазонът на чувствителност беше от 4 до 500 pg/ml.

3.7. *In situ* ДНК оцветяване за определяне на апоптичен индекс на гранулоза лутеинизирани клетки

Гранулоза лутеинизираните клетки бяха фиксирани на +20°C (10 min) с 4% параформалдехид (Sigma-Aldrich), след което бяха промити (2 \times 5 min) с PBS (pH 7.2) и бяха инкубирани за 12 часа върху предметни стъкла, обработени с 0.1% поли-L-лизин (Sigma-Aldrich). След пермеабилзиране (10 min) с 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) и промиване (2 \times 3 min), клетките бяха оцветени на тъмно (30 min) с 0.001% 4,6-Диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma-Aldrich). След промиване (3 \times 2 min), препаратите бяха покрити с Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich). На основа на ядрената морфология, която беше наблюдавана с флуоресцентен микроскоп (Zeiss) на увеличение 400 \times , клетките бяха категоризирани като апоптични и като витални. За всяка жена бяха наблюдавани по 3 препарата, а върху всеки препарат бяха изброени и категоризирани по 800 клетки, след което по формулата “(брой на апоптични клетки/2400) \times 100” беше изчислен апоптичният индекс на GLCs (% на апоптичните GLCs).

3.8. Статистически анализ

Данните за проследените показатели бяха систематизирани, обработени и анализирани с компютърна програма STATISTICA v. 6.0 (StatSoft). За изчисляване на средните стойности и на стандартните отклонения на показателите за отделните групи беше използвана дескриптивна статистика, а за сравняване на средните стойности на показателите между групите беше използван Newman-Keuls POST-HOC test (1-факторна ANOVA). Данните за показателите за съответните групи са

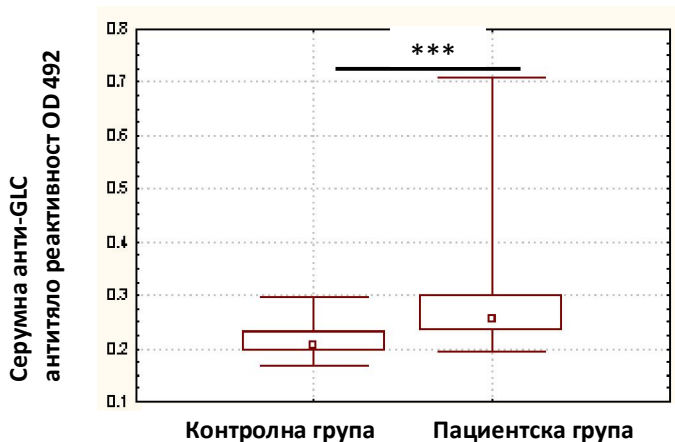
представени в раздел “РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ” като средна стойност±стандартно отклонение. Разликите между групите бяха считани за достоверни при степен на статистическа значимост $P \leq 0.05$. Дефинирани са 3 нива на статистическа достоверност - * - $P \leq 0.05$, ** - $P \leq 0.01$ и *** - $P \leq 0.001$. За анализирани на зависимостите между отчетените стойности на показателите беше използван корелационен тест на Пиърсън (Корелационни матрици). В раздел “РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ” са представени коефициентите на корелация и степените на статистическа значимост (r, P). За контроли, които показват нивата на антитяло реактивностите в норма, бяха използвани серуми и/или фоликулни течности от фертилни жени. Стойностите за тези контроли бяха използвани като база за определяне на повишението на антитяло реактивностите в изследваните проби. За положителни за съответен тип антитела бяха приемани серуми и/или фоликулни течности, които отговарят на следното условие: установените стойности на съответния тип антитяло реактивност надвишават сумата от средната стойност на антитяло реактивността за контролите плюс два пъти стандартното ѝ отклонение (*cut-off* стойността). Относителната честота на положителните за съответен тип антитела жени в отделните групи беше изчислена с честотни таблици, а сравняването ѝ между групите беше извършено със Z тест. Данните за относителната честота на положителните за антитела жени в съответните групи са представени в раздел “РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ” като % от общия брой на жените в тези групи. Разликите между групите са считани за достоверни при $P \leq 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Проучвания върху серумната анти-GLC антитяло реактивност

4.1.1. Ниво на серумна анти-GLC антитяло реактивност и относителна честота на положителни за серумни анти-GLCs антитела жени

Нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност беше проследено при 101 инфертилни жени в програма за IVF-ET (пациентска група) и при 33 фертилни жени (контролна група) на подобна средна възраст (32.22 ± 4.64 години и 31.33 ± 5.83 години съответно, $P=0.4$). Средното ниво на серумната анти-GLC антитяло реактивност за пациентската група беше по-високо в сравнение с контролната група ($P=0.00006$, Фиг. 1). Относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела жени беше 27.72% в пациентската група в сравнение с 9.09% в контролната група ($P=0.002$).



Фиг.1. Нива на серумната анти-GLC антитяло реактивност при инфертилни жени и фертилни контроли, измерени с индиректен ELISA.

Данните за нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност за всяка група са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност ("мустаци"), 25-75% диапазон от стойности (бокс).

Проведените от нас проучвания са първите, в които GLCs от фоликулни аспирати на жени в програми за IVF-ET са използвани като антигенен материал в ELISA и в имуноблот за изследване на AOA's. При изследване на чифтни образци – серум и фоликулна течност – от една и съща инфертилна жена, ние установихме наличието на анти-GLCs антитела и периферно, и локално при повече от половината от анти-GLC-позитивните инфертилни жени. Нещо повече, честотата на повишени анти-GLCs антитела е по-висока във фоликулната течност, в сравнение със серума, което свързваме с концентрирането на антителата в средата на прицелните им клетки. Установената в нашите изследвания значително по-висока честота на повишени анти-GLCs антитела при инфертилните жени, в сравнение с фертилните контроли, потвърждава работната ни хипотеза, че преовулаторните GLCs са потенциален източник на прицелни молекули за овариалния автоимунитети и дава основание да считаме, че анти-GLCs антителата могат да се използват като маркер за имунологично обусловеното безплодие при инфертилни жени в програми за IVF-ET.

4.1.2. Валидиране на индиректен ELISA за серумни анти-GLCs антитела

В Таблица 1 са обобщени данните за нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност и за относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела жени, които бяха регистрирани при 3 отделни изследвания на серумите от инфертилните жени (n=101) и фертилните контроли (n=33).

Таблица 1. Данни от индиректен ELISA за ниво на серумна анти-GLC антитяло реактивност и за относителна честота на положителни за серумни анти-GLCs антитела жени.

		пациентска група (n=101)	контролна група (n=33)	P стойност
1-во изследване	серумна анти-GLC антитяло реактивност ¹	0.283 ± 0.091	0.216 ± 0.035	P=0.00005
	% положителни ²	31.68 (32/101)	9.09 (3/33)	P=0.0003
2-ро изследване	серумна анти-GLC антитяло реактивност ¹	0.280 ± 0.086	0.218 ± 0.036	P=0.00007
	% положителни ²	34.65 (35/101)	6.06 (2/33)	P<0.0001
3-то изследване	серумна анти-GLC антитяло реактивност ¹	0.279 ± 0.084	0.219 ± 0.037	P=0.00008
	% положителни ²	26.73 (27/101)	9.09 (3/33)	P=0.003

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

При всяко от изследванията беше установено, че:

1. средното ниво на серумната анти-GLC антитяло реактивност за пациентската група е значително по-високо от съответното ниво за контролната група;
2. относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела жени е значително по-висока в пациентската група в сравнение с контролната група.

Между изследванията:

1. не бяха регистрирани значими разлики по отношение на средното ниво на серумната анти-GLC антитяло реактивност за пациентската група (комбинирано $P=0.8$) и за контролната група (комбинирано $P=0.7$);
2. не бяха регистрирани значими разлики по отношение на относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела жени в пациентската група (комбинирано $P=0.07$) и в контролната група (комбинирано $P=0.1$).

Разработеният от нас ELISA за анти-GLCs антитела е базиран на тотален антигенен екстракт от човешки GLCs. Валидирането му чрез трикратно изследване на статистически представителен брой серуми и фоликулни течности показва висока степен на повторяемост на резултатите, което го прави надежден тест за изследване на определени анти-овариални антитела, в случая анти-GLCs антителата. В програмите за IVF-ET се пунктират само преовулаторни фоликули, което свежда до минимум проблема, произтичащ от цикличната вариация в експресията на потенциалните прицелни антигени. Антигенният материал се приготвя от GLCs, изолирани от поне 15 жени, което осигурява представителен панел от прицелни антигени. След като жените, от които се получават GLCs, участват в програмите за IVF-ET поради репродуктивни проблеми, е логично да се допусне, че някои GLC антигени и съответните антитела срещу тях може да са свързани с женското безплодие.

4.1.3. Проучвания върху клиничното значение на серумните анти-GLCs антитела при инфертилни жени в програма за IVF-ET

4.1.3.1. Серумни анти-GLCs антитела и етиологични причини за безплодието

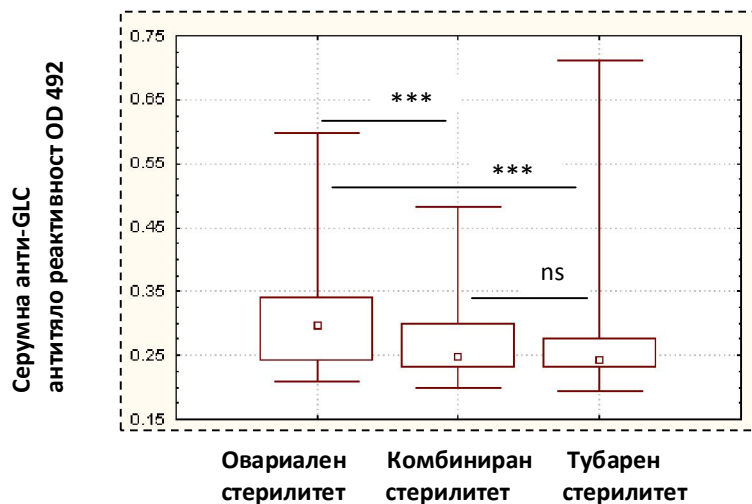
Според етиологичните причини за безплодието, проследените за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени ($n=101$) бяха разделени в 3 пациентски групи: с комбиниран стерилитет ($n=47$), с тубарен стерилитет ($n=33$) и с овариален стерилитет ($n=21$). Между пациентските групи не бяха регистрирани достоверни разлики по отношение на броя на пунктираните фоликули (комбинирано $P=0.95$), броя на получените ооцити (комбинирано $P=0.99$), броя на оплодените ооцити (комбинирано $P=0.90$) и % на оплодените ооцити (комбинирано $P=0.98$). Групите си съответстваха и по възраст (Таблица 2).

Таблица 2. Показатели на инфертилни жени от пациентски групи с комбиниран, тубарен и овариален стерилитет, изследвани за серумни анти-GLCs антитела.

Показатели	комбиниран стерилитет ($n=47$)	тубарен стерилитет ($n=33$)	овариален стерилитет ($n=21$)
възраст ¹	33.19 ± 4.94	31.33 ± 4.33	31.43 ± 4.19
брой на пунктирани фоликули ¹	8.62 ± 4.25	8.79 ± 5.02	8.95 ± 4.35
брой на получени ооцити ¹	7.00 ± 3.40	6.94 ± 4.63	7.00 ± 3.41
брой на оплодени ооцити ¹	4.00 ± 2.44	4.24 ± 2.83	4.14 ± 2.33
% на оплодени ооцити ¹	58.53 ± 23.03	59.66 ± 26.21	58.71 ± 23.18
% на положителни за серумни анти-GLCs антитела жени ²	25.53 (12/47)	15.15 (5/33)	52.38 (11/21)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

За всяка от пациентските групи средното ниво на серумната анти-GLC антитяло реактивност беше по-високо от това в контролната група (комбинирано $P=0.0000005$, Фиг. 2 и Фиг. 1 съответно). Средните нива на анти-GLC антитяло реактивността за групите с комбиниран и тубарен стерилитет не се различаваха значително ($P=0.8$), но бяха по-ниски в сравнение с групата с овариален стерилитет (комбинирано $P<0.0001$, Фиг. 2).



Фиг.2. Нива на серумната анти-GLC антитяло реактивност при пациентски групи с комбиниран, тубарен и овариален стерилитет, проследени с индиректен ELISA.

Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност ("мустаци"), 25-75% диапазон от стойности (бокс). $n=47$ - за групата с комбиниран стерилитет, $n=33$ - за групата с тубарен стерилитет и $n=21$ - за групата с овариален стерилитет, ns – non significant

Както се вижда от Таблица 2, относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени е по-висока в групата с овариален стерилитет в сравнение с групата с комбиниран стерилитет и тази с тубарен стерилитет ($P=0.02$ и $P=0.002$ съответно). Между групите с комбиниран и с тубарен стерилитет, относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени не се различава значително ($P=0.1$).

4.1.3.2. Нивото на серумните анти-GLCs антитела не повлиява отговора на COS.

На основа на показателите за отговора на COS, проследените за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени ($n=101$) бяха разделени в групи както следва: група с добър отговор на COS, включваща 79 инфертилни жени всяка, от които ≥ 5 пунктирани фоликула и/или ≥ 3 получени ооцита, и група с лош отговор на COS, включваща 22 инфертилни жени всяка, от които < 5 пунктирани фоликула и/или < 3 получени ооцита. Трябва да отбележим, че средната възраст на жените в групата с лош отговор на COS, беше по-висока ($P=0.02$, Таблица 3).

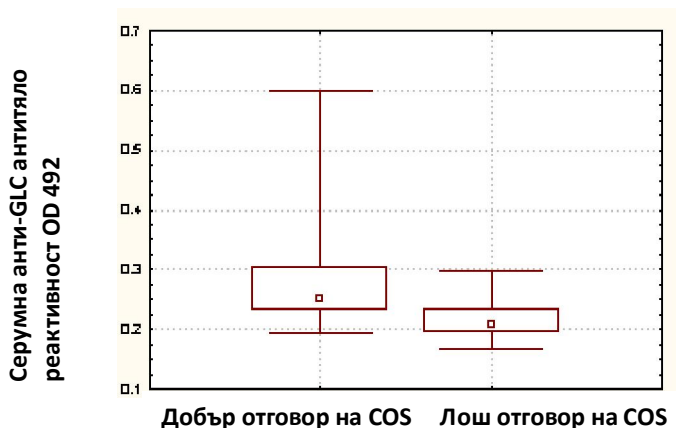
Таблица 3. Показатели на инфертилни жени с добър и с лош отговор на COS, проследени за серумни анти-GLCs антитела.

Показатели	добър отговор на COS ($n=79$)	лош отговор на COS ($n=22$)
възраст ¹	31.67 ± 4.39	34.18 ± 5.09
брой на пунктирани фоликули ¹	9.95 ± 4.28	4.41 ± 1.68

брой на получени ооцити ¹	8.11 ± 3.49	2.91 ± 1.27
% положителни за серумни анти-GLCs антитела жени ²	29.11 (23/79)	22.73 (5/22)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

Средното ниво на серумната анти-GLC антитяло реактивност за групата с лош отговор на COS не се различаваше значително в сравнение с групата с добър отговор на COS (P=0.7, Фиг. 4). Не беше установена и различна относителна честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени в групите с добър и с лош отговор на COS (P=0.3, Таблица 3).



Фиг. 3. Сравнение на нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност между инфертилни жени с добър отговор на COS (n=79) и инфертилни жени с лош отговор на COS (n=22), проследени с индиректен ELISA.

Данните за серумната анти-GLC антитяло реактивност за всяка група са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност (“мустаци”), 25-75% диапазон от стойности (бокс).

Резултатите от стандартните схеми за COS са по-малко предвидими при АОА-серопозитивните жени с понижен отговор на COS. В някои случаи, според други автори, автоимунната реакция може да се преодолее от хормоналната стимулация и като резултат да се развият “зdrави” фоликули, с което може да се свърже повишения отговор на COS при някои от анти-GLC-позитивните жени в нашите изследвания. Пониженият отговор на COS при жени, негативни за АОАs, обаче се дължи не толкова на намалената чувствителност на фоликулите към гонадотропните хормони, а по-скоро на ускорената лутеинизация на зрелите фоликули, а вероятно и на по-напредналата възраст на инфертилните жени с лош отговор на COS, регистрирана и в нашите изследвания.

4.1.3.3. Наличието на серумни анти-GLCs антитела е свързано с ниско ниво на IVF.

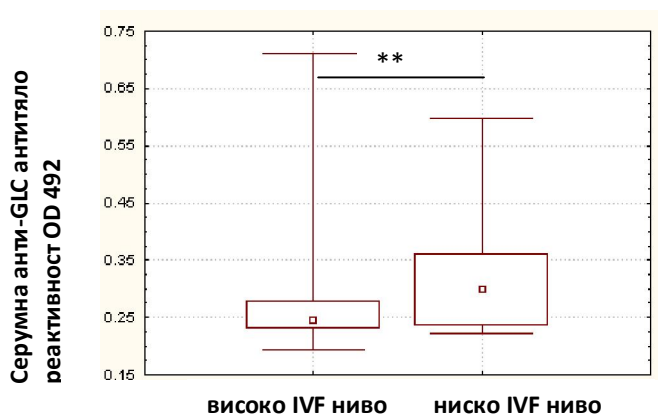
На основа на показателя за нивото на IVF, проследените за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени (n=101) бяха разделени в групи, както следва: група с високо ниво на IVF, включваща 70 инфертилни жени всяка, от които с оплодени ≥ 50% от получените ооцити, и група с ниско ниво на IVF, включваща 31 инфертилни жени всяка, от които с оплодени < 50% от получените ооцити (Таблица 4).

Таблица 4. Показатели на инфертилни жени с високо и с ниско ниво на IVF, проследени за серумни анти-GLCs антитела.

Показатели	високо ниво на IVF (n=70)	ниско ниво на IVF (n=31)
възраст ¹	32.14 ± 4.69	32.39 ± 4.62
брой на оплодени ооцити ¹	4.73 ± 2.49	2.71 ± 2.04
% на оплодени ооцити ¹	70.03 ± 14.92	33.89 ± 21.41
% положителни за серумни анти-GLCs антитела жени ²	15.71 (11/70)	54.84 (17/31)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

Нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност беше по-високо в групата с ниско ниво на IVF (P=0.003, Фиг. 4). Относителната честота на положителните за серумни анти-GLCs антитела инфертилни жени беше по-висока в групата с ниско ниво на IVF, отколкото в групата с високо ниво на IVF (P<0.0001, Таблица 4).



Фиг. 4. Нива на серумната анти-GLC антитяло реактивност при инфертилни жени с високо (n=70) и с ниско ниво на IVF (n=31), измерени с индиректен ELISA.

Данните за нивото на серумната анти-GLC антитяло реактивност са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност (“мустаци”), 25-75% диапазон от стойности (бокс).

Наличието на анти-GLCs антитела в серума и във фоликулната течност на повече от половината от изследваните от нас инфертилни жени в съчетание с ниското ниво на IVF при тези жени, ни дава основание да приемем, че анти-GLCs антителата имат негативен ефект върху фертилизационния капацитет на ооцитите. Други автори предполагат, че свързването на анти-GLCs антителата към прицелните клетки инициира “дефектен” сигнал в процеса на оплождането. При анализа на резултатите от ET беше установено, че успешна бременност е имало при ~20% от анти-GLC-серопозитивните инфертилни жени, в сравнение с ~33% при серонегативните за анти-GLCs антитела инфертилни жени (данните не са показани). Допускаме, че анти-GLCs антителата понижават физиологичните възможности на прицелните клетки да образуват функционално жълто тяло, което да секретира прогестерон, необходим за поддържане функцията на децидуата по време на бременността и задържането и развитието на плода в матката.

4.2. Проучвания върху серумни анти-овариални антитела (анти-GLCs антитела и анти-ZP антитела) при инфертилни жени с добър отговор на COS

4.2.1. Нива на серумна анти-GLC и анти-ZP антитяло реактивност и относителна честота на положителни за серумни AOAс жени

Нивата на серумната анти-GLC и анти-ZP антитяло реактивност бяха проследени при 79 инфертилни жени с добър отговор на COS в програма за IVF-ET (пациентска група) и при 40 фертилни жени (контролна група) на подобна средна възраст. За пациентската група бяха регистрирани по-високи средни нива на серумна анти-GLC и анти-ZP антитяло реактивност в сравнение с контролната група. Относителната честота на положителните за серумни AOAс жени беше по-висока в пациентската група, отколкото в контролната група (Таблица 5).

Таблица 5. Серумни нива на анти-GLCs и анти-ZP антитела при инфертилни жени с добър отговор на COS в програма за IVF-ET (пациентска група) и при фертилни жени (контролна група).

Показатели	пациентска група (n=79)	контролна група (n=40)	P стойност
възраст ¹	31.67 ± 4.39	31.13 ± 4.13	P=0.7
серумна анти-GLC антитяло реактивност ¹	0.278 ± 0.081	0.218 ± 0.037	P=0.0002
% жени със серумни анти-GLCs антитела ²	29.11 (23/79)	7.5 (3/40)	P=0.001
серумна анти-ZP антитяло реактивност ¹	0.308 ± 0.116	0.235 ± 0.045	P=0.0008
% жени със серумни анти-ZP антитела ²	27.85 (22/79)	5 (2/40)	P<0.0001

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

Нашите резултати показаха, че в серума на повече от половината от инфертилните жени с анти-GLCs антитела присъстват и анти-ZP антитела, което кореспондира с резултати на други групи, установили ZP автоантитела в серума на жени с идиопатична POF и на инфертилни жени в програми за IVF-ET.

4.2.2. Валидиране на индиректен ELISA за серумни анти-ZP антитела

В Таблица 6 са обобщени данните за нивото на анти-ZP антитяло реактивността и за относителната честота на положителните за анти-ZP антитела жени, които бяха регистрирани при 3 отделни изследвания на 79 серума от инфертилни жени с добър отговор на COS в програма за IVF-ET и на 40 серума от фертилни жени.

Таблица 6. Нива на серумната анти-ZP антитяло реактивност и относителна честота на положителните за серумни анти-ZP антитела жени, регистрирани чрез индиректен ELISA при инфертилни жени с добър отговор на COS в програма за IVF-ET (пациентска група) и при фертилни жени (контролна група).

		пациентска група (n=79)	контролна група (n=40)	P стойност
1-во изследване	серумна анти-ZP антитяло реактивност ¹	0.308 ± 0.116	0.235 ± 0.045	P=0.0008
	% положителни ²	27.85 (22/79)	5 (2/40)	P<0.0001

2-ро изследване	серумна анти-ZP антитяло реактивност ¹	0.308 ± 0.117	0.234 ± 0.043	P=0.0006
	% положителни ²	30.38 (24/79)	2.5 (1/40)	P<0.0001
3-то изследване	серумна анти-ZP антитяло реактивност ¹	0.308 ± 0.117	0.236 ± 0.049	P=0.001
	% положителни ²	29.11 (23/79)	7.5 (3/40)	0.001

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

При всяко от изследванията беше установено, че:

- 1) средното ниво на серумната анти-ZP антитяло реактивност за пациентската група е по-високо в сравнение с контролната група;
- 2) относителната честота на положителните за серумни анти-ZP антитела жени е по-висока в пациентската група, отколкото в контролната група.

Между изследванията беше установено, че:

- 1) няма достоверни разлики по отношение на средното ниво на серумната анти-ZP антитяло реактивност за пациентската група (комбинирано P=0.9) и за контролната група (комбинирано P=0.9);
- 2) няма достоверни разлики по отношение на относителната честота на положителните за серумни анти-ZP антитела жени в пациентската група (комбинирано P=0.4) и в контролната група (комбинирано P=0.06).

Представените резултати са показателни за високата степен на повторяемост на експерименталните данни, получени с развития индиректен ELISA за серумни анти-ZP антитела.

4.2.3. Повишеното ниво на серумните AOA's (анти-GLCs антитела и анти-ZP антитела) корелира с ниско ниво на IVF при жени с добър отговор на COS.

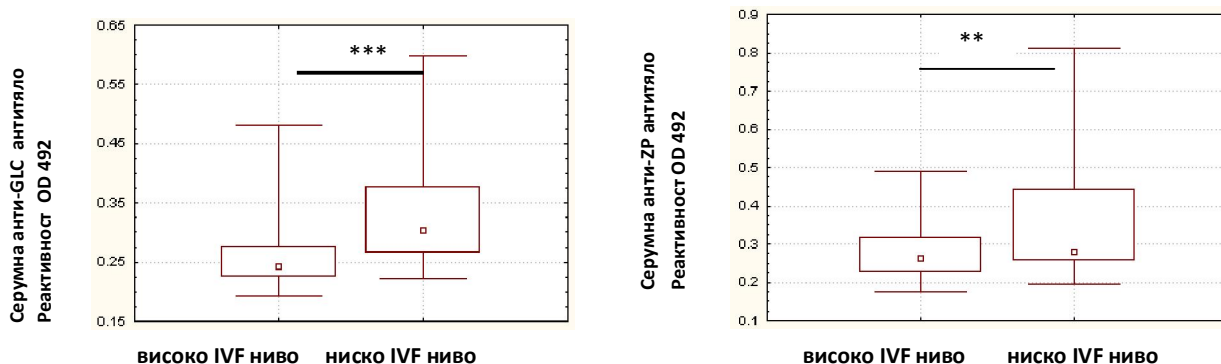
Според % на оплодените ооцити, инфертилните жени с добър отговор на COS бяха разделени в група с високо ниво на IVF (n=55) и в група с ниско ниво на IVF (n=24). Между двете групи не бяха регистрирани достоверни разлики по отношение на възрастта, пунктираните фоликули и получените ооцити, но такива бяха установени по отношение на броя и на % на оплодените ооцити, които бяха по-ниски в групата с ниско ниво на IVF в сравнение с групата с високо ниво на IVF (Таблица 7).

Таблица 7. Показатели на инфертилни жени с добър отговор на COS от групи с високо и с ниско ниво на IVF, изследвани за анти-GLCs и за анти-ZP антитела със съответните индиректни ELISAs.

Показатели	добър COS отговор/ високо IVF ниво (n=55)	добър COS отговор/ ниско IVF ниво (n=24)	Pстойност
възраст ¹	31.24 ± 4.28	32.67 ± 4.57	P=0.2
брой на пунктирани фоликули ¹	9.78 ± 4.54	10.33 ± 3.68	P=0.6
брой на получени ооцити ¹	8.04 ± 3.70	8.29 ± 3.01	P=0.8
брой на оплодени ооцити ¹	5.38 ± 2.40	3.38 ± 1.79	P=0.0006
% на оплодени ооцити ¹	67.98 ± 13.37	41.07 ± 17.01	P=0.0001
% положителни за анти-GLCs антитела ²	14.55 (8/55)	62.50 (15/24)	P<0.0001
% положителни за анти-ZP антитела ²	23.64 (13/55)	37.50 (9/24)	P=0.1

¹средна стойност \pm стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

За групата с ниско ниво на IVF беше регистрирано по-високо ниво на серумната анти-GLC и на серумната анти-ZP антитяло реактивност в сравнение с групата с високо ниво на IVF ($P=0.0002$ и $P=0.005$ съответно, Фиг. 5).



Фиг. 5. Сравнение на нивата на серумната анти-GLC и на серумната анти-ZP антитяло реактивност между инфертилни жени с добър отговор на COS и високо ниво на IVF и инфертилни жени с добър отговор на COS и ниско ниво на IVF. Нивата на антитяло реактивностите са измерени със съответните индиректни ELISAs.

Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност ("мустаци"), 25-75% диапазон от стойности (бокс). (група с високо IVF ниво - $n=55$, група с ниско IVF ниво - $n=24$)

Относителната честота на жените, положителни за съответните типове серумни AOA's беше по-висока в групата с ниско ниво на IVF (Таблица 7).

Анти-ZP антителата могат да са причина за овариална дисфункция при жената, защото те блокират цепковидните контакти между ооцитите и гранулозните клетки и като последица нарушават реципрочната комуникация, която е задължителна за нормалното развитие на фоликулите, както и за придобиването на компетентност от ооцитите за оплождане и ембрионално развитие.

4.3. Проучвания върху прицелните антигени и имуноглобулиновия клас на серумните анти-GLCs антитела

4.3.1. Степен на междувидова консервативност на прицелните антигени на серумните анти-GLCs антитела

Степента на междувидовата консервативност на прицелните антигени на серумните анти-GLCs антитела беше проследена при 28 инфертилни жени в програма за IVF-ET (пациентска група), положителни за серумни анти-GLCs антитела, и при 33 фертилни жени (контролна група), 3 (9.09%), от които бяха положителни за серумни анти-GLCs антитела (виж Таблица 1).

В Таблица 8 са обобщени данните за нивото на серумната антияло реактивност срещу антигени на човешки, свински и говежди GLCs за пациентската група в сравнение с контролната група. Средното ниво на серумната антияло реактивност срещу антигени на човешки GLCs за пациентската група беше значително по-високо в сравнение с контролната група, като положителни за анти-GLCs антитела бяха 96.43% от жените в пациентската група срещу 3.57 % от жените в контролната група. В пациентската група беше регистрирано значително по-високо средно ниво на серумна антияло реактивност, както срещу антигените на свински GLCs, така и срещу антигените на говежди GLCs, в сравнение с контролната група. Положителни за серумни антитела срещу антигени на свински и на говежди GLCs бяха 71.43 % и 57.14 %, съответно от инфертилните жени, докато измежду фертилните контроли не бяха установени такива.

Таблица 8. Нива на серумна антияло реактивност срещу антигени на човешки, свински и говежди GLCs при инфертилни жени (n=28) и фертилни контроли (n=33), регистрирани със съответен индиректен ELISA.

Вид GLC антигени	Показатели	пациентска група (n=28)	контролна група (n=33)	P стойност
	възраст ¹	32.75 ± 4.36	31.33 ± 5.83	P=0.06
човешки	серумна антияло реактивност ¹	0.358 ± 0.053	0.209 ± 0.027	P=0.0001
	% положителни ²	96.43 (27/28)	3.57 (1/33)	P<0.0001
свински	серумна антияло реактивност ¹	0.271 ± 0.055	0.182 ± 0.027	P=0.0001
	% положителни ²	71.43 (20/28)	0 (0/33)	P=0.0001
говежди	серумна антияло реактивност ¹	0.234 ± 0.057	0.165 ± 0.024	P=0.0001
	% положителни ²	57.14 (16/28)	0 (0/33)	P=0.0001

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

4.3.2. Имуноглобулинов клас на серумните анти-GLCs антитела

Нашите резултати за имуноглобулиновия клас на установените анти-GLCs антитела, в групата инфертилни жени, показват високо средно ниво на серумна анти-GLC антияло реактивност, както от клас IgM, така и от клас IgG. Според данни, публикувани от други автори, при жени с POF превалират AOA's от IgG изотип над тези от изотип IgM и от изотип IgA, като нивата на трите Ig субкласове са значително по-високи при жените с POF, в сравнение с нормално менструиращите фертилни контроли.

Таблица 9. Данни за клас IgM и клас IgG серумни анти-GLCs антитела при инфертилни жени и фертилни контроли, регистрирани чрез съответните индиректни ELISAs.

		пациентска група (n=28)	контролна група (n=33)	P стойност
Анти-GLCs IgM антитела	серумна анти-GLC IgM антияло реактивност ¹	0.349 ± 0.083	0.228 ± 0.045	P=0.0001
	% положителни ²	64.29 (18/28)	3.03 (1/33)	P<0.0001

Анти-GLCs IgG антитела	серумна анти-GLC IgG антитяло реактивност ¹	0.388 ± 0.132	0.233 ± 0.041	P=0.0001
	% положителни ²	64.29 (18/28)	0 (0/33)	P<0.0001

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off/2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

4.3.3. Връзка между имуноглобулиновия клас на серумните анти-GLCs антитела и степента на междувидова консервативност на техните прицелни антигени

Таблица 10. Връзка между степента на междувидова консервативност на прицелните антигенни детерминанти на серумните анти-GLCs антитела и относителната честота на жените със серумни IgM и IgG анти-GLCs антитела в пациентската и контролната група.

имуноглобулинов клас	реактивност срещу антигенни детерминанти на GLCs	пациентска група (n=28)	контролна група (n=33)
		% положителни ¹	% положителни ¹
Ig M	“общи” за Чв, Св и Гв	25.00 (7/28)	0 (0/33)
	“общи” за Чв и Св	17.86 (5/28)	0 (0/33)
	“уникални” за Чв	21.43 (6/28)	3.03 (1/33)
Ig G	“общи” за Чв, Св и Гв	42.86 (12/28)	0 (0/33)
	“общи” за Чв и Св	14.29 (4/28)	0 (0/33)
	“уникални” за Чв	7.14 (2/28)	0 (0/33)

Чв – човешки, Св – свински, Гв – говежди, ANOVA/MANOVA и Z-тест

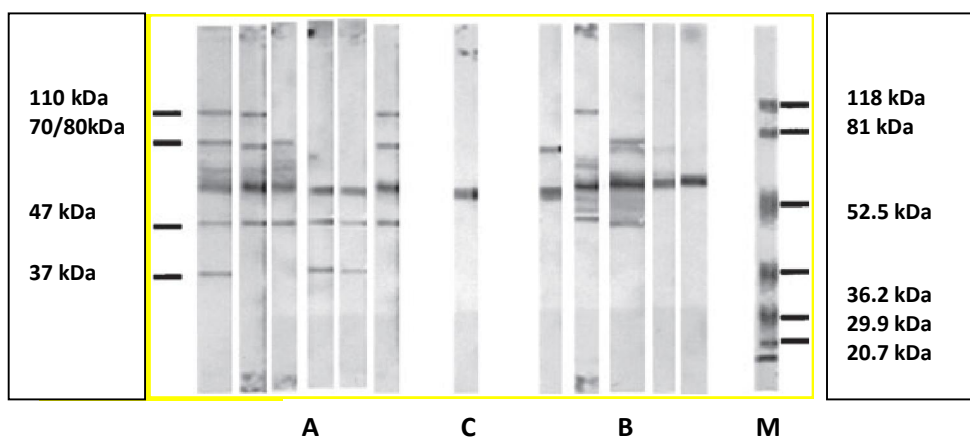
Нашите данни за високото ниво на междувидова кръстосана реактивност и консервативност на антигените на човешки, свински и говежди GLCs са нови, за разлика от данните, докладвани за консервативност на ZP антигените.

4.3.4. Молекулна идентичност на прицелните антигени на серумните анти-GLCs антитела

Прицелните антигени на анти-GLCs антителата бяха идентифицирани чрез имуноблот със серуми на 22 инфертилни жени в програма за IVF-ET (пациентска група), всяка, от които беше положителна за серумни анти-GLCs антитела при изследване с индиректен ELISA, и със серуми на 11 фертилни жени (контролна група), всяка, от които беше отрицателна за серумни анти-GLCs антитела при изследване с индиректен ELISA. Протеините на GLCs с Mr 37 kDa, 47 kDa, 70/80 kDa и 110 kDa най-често бяха прицелни антигени на серумните анти-GLCs антитела (Таблица 11, Фиг. 6). При всеки имуноблот беше регистриран неспецифичен сигнал в областта 55-65 kDa, придиизвикван по всяка вероятност от “естествените” албуминови автоантитела, които нормално присъстват в човешкия серум (Фиг. 6).

Таблица 11. Относителни честоти на жени със серумни антитела срещу антигени на GLCs с Mr 37 kDa, 47 kDa, 70/80 kDa и 110 kDa.

GLC антиген, Mr	жени с антитела срещу GLC антиген, %		
	пациентска група (n=22)	контролна група (n=11)	P стойност
37 kDa	13.64 (3/22)	0 (0/11)	P<0.0001
47 kDa	63.64 (14/22)	27.27 (3/11)	P=0.008
70/80 kDa	45.45 (10/22)	9.10 (1/10)	P=0.008
110 kDa	36.36 (8/22)	27.27 (3/11)	P=0.3



Фиг. 6. Имуноблот на случайно избрани серуми от инфертилни жени (A) и фертилни контроли (B) с лизати от човешки GLCs.

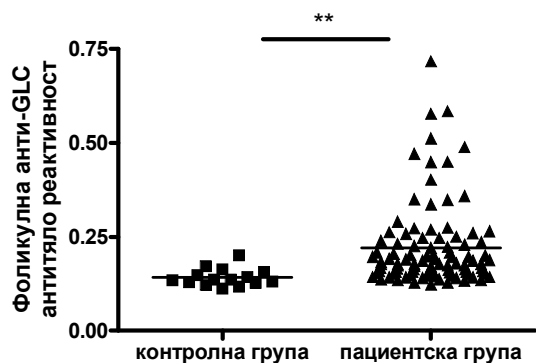
Отляво са маркирани ивиците, показващи преобладаваща специфична антитяло реактивност срещу GLC протеини. М: молекулен стандарт (Bio-Rad) с ивици за молекулна маса както следва отгоре надолу 118, 81, 52.5, 36.2, 29.9 и 20.7 kDa. (C) контрола без първо антитяло.

Идентифицирахме 4 прицелни антигена на анти-GLCs антителата в серума на инфертилните жени, а именно, GLC протеини с Mr: 37 kDa, 47 kDa, 70/80 kDa и 110 kDa. В серума на инфертилните жени регистрирахме най-често антитела срещу GLC протеин с Mr 47 kDa. Считаме обаче, че особено внимание заслужава GLC протеин с Mr 37 kDa, който се визуализира, в имуноблот, само от серуми на инфертилни жени, положителни за анти-GLCs антитела в ELISA .

4.4. Проучвания върху фоликулната анти-GLC антитяло реактивност

4.4.1. Ниво на фоликулна анти-GLC антитяло реактивност и относителна честота на положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени

Нивото на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност беше проследено при 98 инфертилни жени в програма за IVF-ET (пациентска група) и при 15 фертилни жени (контролна група) на подобна средна възраст (32.00 ± 4.77 години и 33.93 ± 4.65 години съответно, $P=0.1$). Средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност за пациентската група беше по-високо от това за контролната група ($P=0.007$, Фиг. 7). Относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени беше по-висока в пациентската група, отколкото в контролната група (43.88% и 6.67% съответно, $P<0.0001$).



Фиг.7. Нива на фоликулната анти-GLC антияло реактивност при инфертилни жени и фертилни контроли, измерени с индиректен ELISA.

Данните са представени със scatter-плот, в който всяка точка съответства на нивото на фоликулната анти-GLC антияло реактивност за всяка отделна жена от съответната група, n=98 за пациентската група и n=15 за контролната група.

4.4.2. Валидиране на индиректен ELISA за фоликулни анти-GLCs антитела

В Таблица 12 са обобщени данните за нивото на фоликулната анти-GLC антияло реактивност и за относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени, регистрирани при 3 независими изследвания на 98 инфертилни жени в програма за IVF-ET и 15 фертилни контроли.

Таблица 12. Данни за нива на фоликулна анти-GLC антияло реактивност и за относителна честота на положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени, измерени с индиректен ELISA.

		пациентска група(n=98)	контролна група (n=15)	P стойност
1-во изследване	Фоликулна анти-GLC антияло реактивност ¹	0.2208 ± 0.1107	0.1419 ± 0.0234	P=0.007
	% положителни ²	44.90 (44/98)	6.67 (1/15)	P<0.0001
2-ро изследване	Фоликулна анти-GLC антияло реактивност ¹	0.2259 ± 0.1111	0.1432 ± 0.0257	P=0.005
	% положителни ²	46.94 (46/98)	6.67 (1/15)	P<0.0001
3-то изследване	Фоликулна анти-GLC антияло реактивност ¹	0.2246 ± 0.1112	0.1463 ± 0.0277	P=0.008
	% положителни ²	38.78 (38/98)	0 (0/15)	P<0.0001

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off/2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

При всяко изследване:

- 1) средното ниво на фоликулната анти-GLC антияло реактивност за пациентската група беше значително по-високо от съответното ниво за контролната група;
- 2) относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени беше значително по-висока в пациентската група в сравнение с контролната група.

Между изследванията:

- 1) не беше регистрирана значима разлика по отношение на средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност за групата на инфертилните жени (комбинирано P=0.7) и за групата на фертилните контроли (комбинирано P=0.6);
- 2) не беше регистрирана значима разлика по отношение на относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела в групата на инфертилните жени (комбинирано P=0.09).

Представените резултати са показателни за високата степен на повторяемост на експерименталните данни, които бяха регистрирани с разработения индиректен ELISA за фоликулни анти-GLCs антитела.

4.4.3. Проучвания върху клиничното значение на фоликулните анти-GLCs антитела при инфертилни жени в програма за IVF-ET

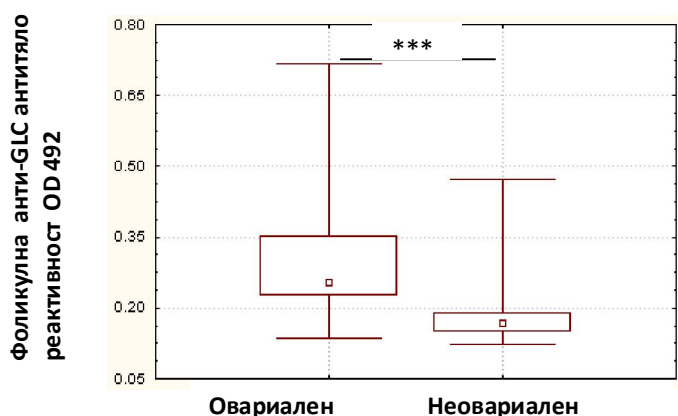
4.4.3.1. Фоликулни анти-GLCs антитела и етиологични причини за безплодието

Според етиологията на безплодието, изследваните за фоликулни анти-GLCs антитела инфертилни жени (n=98) бяха разделени на група с неовариален стерилитет (комбиниран или тубарен, n=64) и на група с овариален стерилитет (n=34). Между двете групи не бяха регистрирани достоверни разлики по отношение на възрастта (P=0.3), броя на пунктираните фоликули (P=0.07), броя на получените ооцити (P=0.2), броя на оплодените ооцити (P=0.2) и % на оплодените ооцити (P=0.9) (Таблица 13). За групата с овариален стерилитет средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност беше по-високо, отколкото за групата с неовариален стерилитет (P=0.0001, Фиг. 9). Подобно, относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени беше по-висока в групата с овариален стерилитет в сравнение с групата с неовариален стерилитет (P<0.0001, Таблица 13).

Таблица 13. Показатели на инфертилни жени от групи с овариален и с неовариален стерилитет, изследвани за фоликулни анти-GLCs антитела чрез индиректен ELISA.

Показатели	овариален стерилитет (n=34)	неовариален стерилитет (n=64)
възраст ¹	31.15 ± 4.91	32.45 ± 4.67
брой на пунктирани фоликули ¹	9.91 ± 4.71	8.16 ± 4.30
брой на получени ооцити ¹	7.76 ± 3.42	6.75 ± 4.07
брой на оплодени ооцити ¹	4.76 ± 2.64	4.00 ± 2.49
% на оплодени ооцити ¹	59.95 ± 20.52	59.43 ± 24.89
% положителни ²	76.47 (26/34)	26.56 (17/64)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група



Фиг.9. Нива на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност при жени с овариален (n=34) и с неовариален стерилитет(n=64), измерени с индиректен ELISA.

Данните за нивото на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност (“мустаци”), 25-75% диапазон от стойности (бокс).

4.4.3.2. Нивото на фоликулните анти-GLCs антитела не повлиява отговора на COS.

На базата на пунктираните фоликули и/или на получените ооцити, изследваните за фоликулни анти-GLCs антитела инфертилни жени (n=98) бяха разделени в групи с добър отговор на COS (n=77) и с лош отговор на COS (n=21). Трябва да отбележим, че в групата с лош отговор на COS, средната възраст на инфертилните жени беше по-висока (P=0.03, Таблица 14).

Таблица 14. Показатели на инфертилни жени с добър и с лош отговор на COS, изследвани за фоликулни анти-GLCs антитела с индиректен ELISA.

Показатели	добър отговор на COS(n=77)	лош отговор на COS (n=21)
възраст ¹	31.45 ± 4.55	34.00 ± 5.14
брой на пунктирани фоликули ¹	9.96 ± 4.27	4.38 ± 1.72
брой на получени ооцити ¹	8.25 ± 3.53	2.90 ± 1.30
фоликулна анти-GLC антитяло реактивност ¹	0.226 ± 0.114	0.201 ± 0.099
% положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени ²	45.45(35/77)	38.10(8/21)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

Както е видно от Таблица 14, средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност и относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела инфертилни жени не се различаваха достоверно между групите с добър и с лош отговор на COS (P=0.4 и P=0.2 съответно).

4.4.3.3. Повишеното ниво на фоликулните анти-GLCs антитела обуславя ниско ниво на IVF.

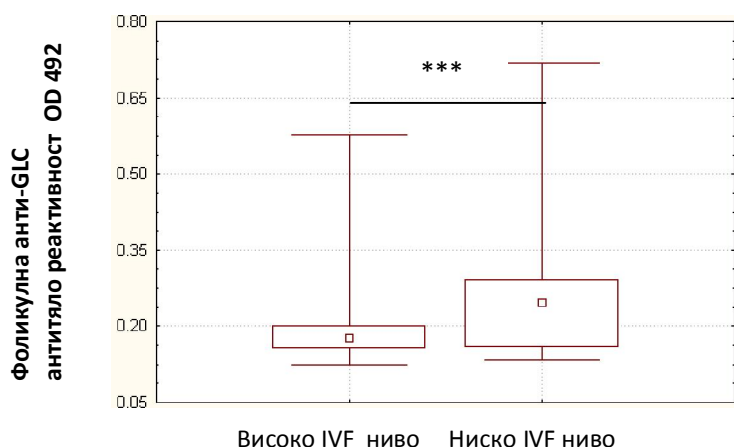
На базата на % на оплодените ооцити, изследваните за фоликулни анти-GLCs антитела инфертилни жени (n=98) бяха разделени на група с високо ниво на IVF (n=69) и на група с ниско ниво на IVF (n=29). Средната възраст на инфертилните жени в двете групи не се различаваше достоверно (P=0.8, Таблица 15).

Таблица 15. Показатели на инфертилни жени с високо и с ниско ниво на IVF, изследвани за фоликулни анти-GLCs антитела с индиректен ELISA.

Показатели	високо ниво на IVF (n=69)	ниско ниво на IVF (n=29)
възраст ¹	31.91 ± 4.87	32.21 ± 4.60
брой на оплодени ооцити ¹	4.88 ± 2.51	2.79 ± 2.04
% на оплодени ооцити ¹	70.06 ± 14.84	34.75 ± 21.13
% положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени ²	37.68 (26/69)	58.62 (17/29)

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група

Резултатите от изследването за фоликулни анти-GLCs антитела показаха по-високо средно ниво на фоликулна анти-GLC антитяло реактивност в групата с ниско ниво на IVF (P=0.0004, Фиг. 10).



Фиг. 10. Нива на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност при инфертилни жени с високо и с ниско ниво на IVF, измерени с индиректен ELISA.

Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност ("мустаци"), 25-75% диапазон от стойности (бокс).

Относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени беше по-висока в групата с ниско ниво на IVF в сравнение с групата с високо ниво на IVF (P=0.03, Таблица 15).

4.5. Проучвания върху провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ , апоптозата на GLCs и анти-GLCs антителата при жени с овариален стерилитет

4.5.1. Концентрации на TNF α и IFN γ и ниво на анти-GLC антитяло реактивност във фоликулната течност

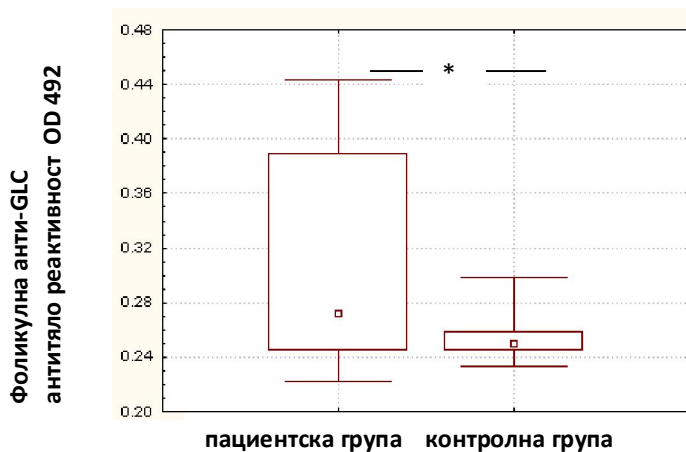
Фоликулните концентрации на TNF α и IFN γ и нивото на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност бяха проследени при 18 жени с овариален стерилитет (пациентска група) и при 10 фертилни жени (контролна група) на подобна средна възраст (P=0.2, Таблица 16). Във фоликулните течности на жените с овариален стерилитет и фертилните контроли бяха установени подобни концентрации на TNF α и IFN γ (Таблица 16). Средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност за пациентската група обаче беше по-високо от това за контролната група (P=0.05, Фиг. 11). Подобно, относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела

жени беше значително по-висока в пациентската група в сравнение с контролната група (Таблица 16).

Таблица 16. Показатели на жени с овариален стерилитет (пациентска група) и на фертилни жени (контролна група).

Показатели	пациентска група (n=18)	контролна група (n=10)	Pстойност
възраст ¹	31.00 ± 2.58	31.93 ± 2.71	P=0.2
TNFα (pg/ml) ¹	5.61 ± 0.19	5.12 ± 0.06	P=0.4
IFNγ (pg/ml) ¹	31.46 ± 0.43	7.61 ± 0.02	P=0.1
% положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени ²	33.33 (6/18)	10.00 (1/10)	P=0.008

¹средна стойност ± стандартно отклонение, ²cut-off 2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група



Фиг. 11. Сравнение на нивата на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност между жени с овариален стерилитет и фертилни контроли.

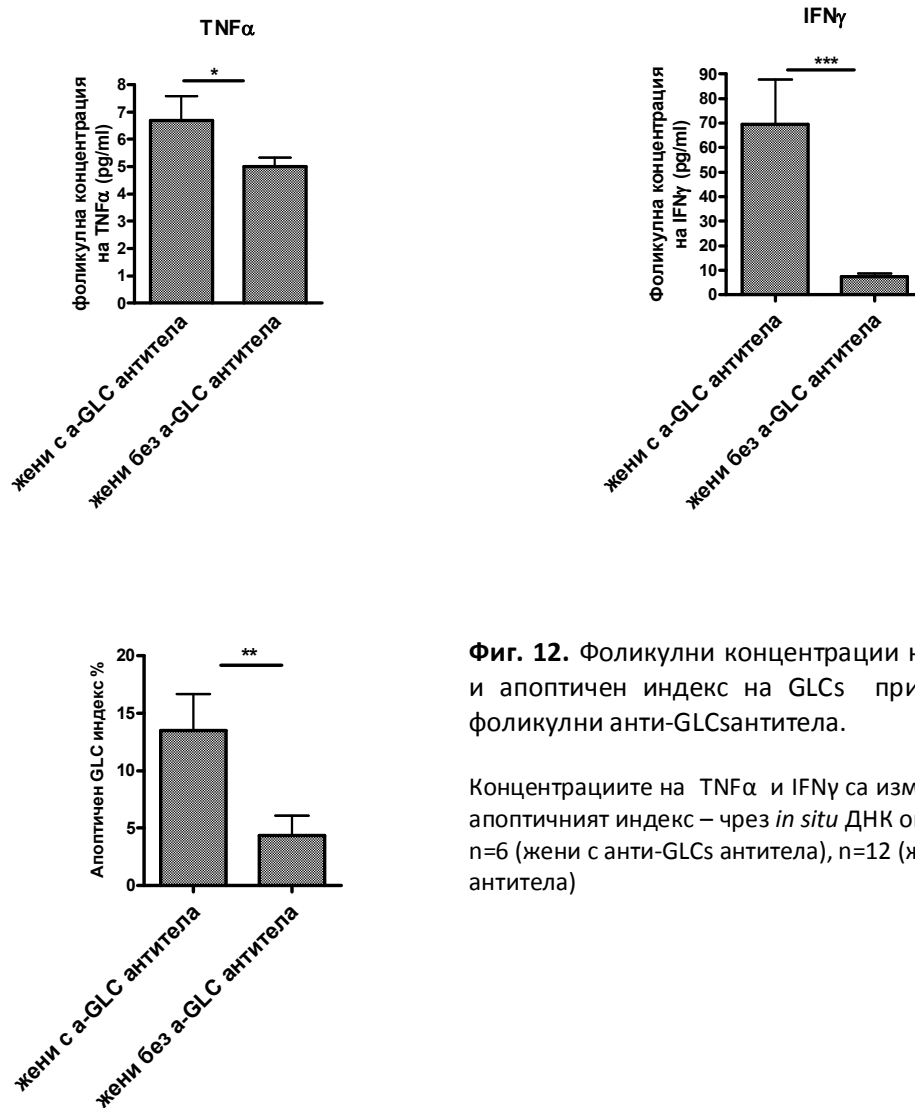
Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност (“мустаци”), 25-75% диапазон от стойности (бокс). (за жени с овариален стерилитет n=18, за контролна група n=10)

4.5.2. Нивата на TNFα и IFNγ във фоликулните течности на жени с овариален стерилитет, както и апоптичните индекси на GLCs са по-високи при жените, положителни за фоликулни анти-GLCs антитела.

Според фоликулния анти-GLC антитяло статус, жените с овариален стерилитет (n=18) бяха разделени на група от положителни (n=6) и на група от отрицателни за фоликулни анти-GLCs антитела жени (n=12). Между двете групи не беше регистрирана значима разлика по отношение на средната възраст на жените (33.17±3.31 години и 32.08±2.43 години съответно, P=0.4).

Във фоликулните течности на положителните за анти-GLCs антитела жени бяха регистрирани по-високи концентрации на TNFα и IFNγ в сравнение с групата на жените, в чийто фоликулни течности липсваха анти-GLCs антитела (P=0.03 и P=0.0002 съответно, Фиг. 12). За същата група беше регистриран и по-висок апоптичен индекс на GLCs (P=0.005, Фиг. 12). Тези резултати ни

дават основание да твърдим, че наличието на фоликулни анти-GLCs антитела при жени с овариален стерилитет корелира с повишените нива на провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ и с висок апоптичен индекс на GLCs.



Фиг. 12. Фоликулни концентрации на TNF α , на IFN γ и апоптичен индекс на GLCs при жени с и без фоликулни анти-GLCs антитела.

Концентрациите на TNF α и IFN γ са измерени чрез ELISA, апоптичният индекс – чрез *in situ* ДНК оцветяване на GLC, n=6 (жени с анти-GLCs антитела), n=12 (жени без анти-GLC антитела)

4.5.3. Проучвания върху клиничното значение на провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ , апоптозата на GLCs и анти-GLCs антителата при жени с овариален стерилитет в програма за IVF-ET

4.5.3.1. Провъзпалителни цитокини, апоптоза на GLCs и анти-GLCs антитела във връзка с отговора на COS

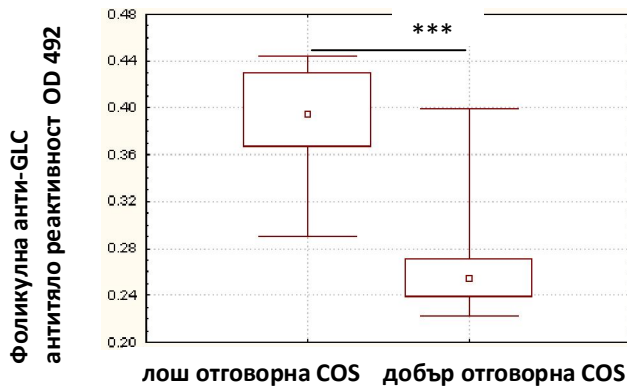
Изследваните жени с овариален стерилитет (n=18) бяха разделени в групи въз основа на броя на пунктираните фоликули и/или на броя на получените ооцити в група с добър отговор на

COS(n=12) и в група с лош отговор на COS (n=6). Между двете групи, средната възраст на включените жени с овариален стерилитет не се различаваше значително(P=0.3, Таблица 17). Средното ниво на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност за групата с лош отговор на COS беше по-високо от това за групата с добър отговор на COS(P=0.0003, Фиг.13). Относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени с овариален стерилитет беше по-висока в групата с лош отговор на COS в сравнение с групата с добър отговор на COS (P<0.0001, Таблица 17).

Таблица 17. Показатели на жени с овариален стерилитет с добър и с лош отговор на COS, проследени за фоликулни концентрации на TNF α , IFN γ , апоптичен индекс на GLCs и фоликулни анти-GLCs антитела.

Показатели	добър отговор на COS (n=12)	лош отговор на COS (n=6)
възраст ¹	32.00 \pm 2.49	33.33 \pm 3.14
брой на пунктирани фоликули ¹	12.33 \pm 3.11	5.00 \pm 0.89
брой на получени ооцити ¹	9.42 \pm 2.68	2.00 \pm 1.41
% положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени ²	8.33 (1/12)	83.33 (5/6)

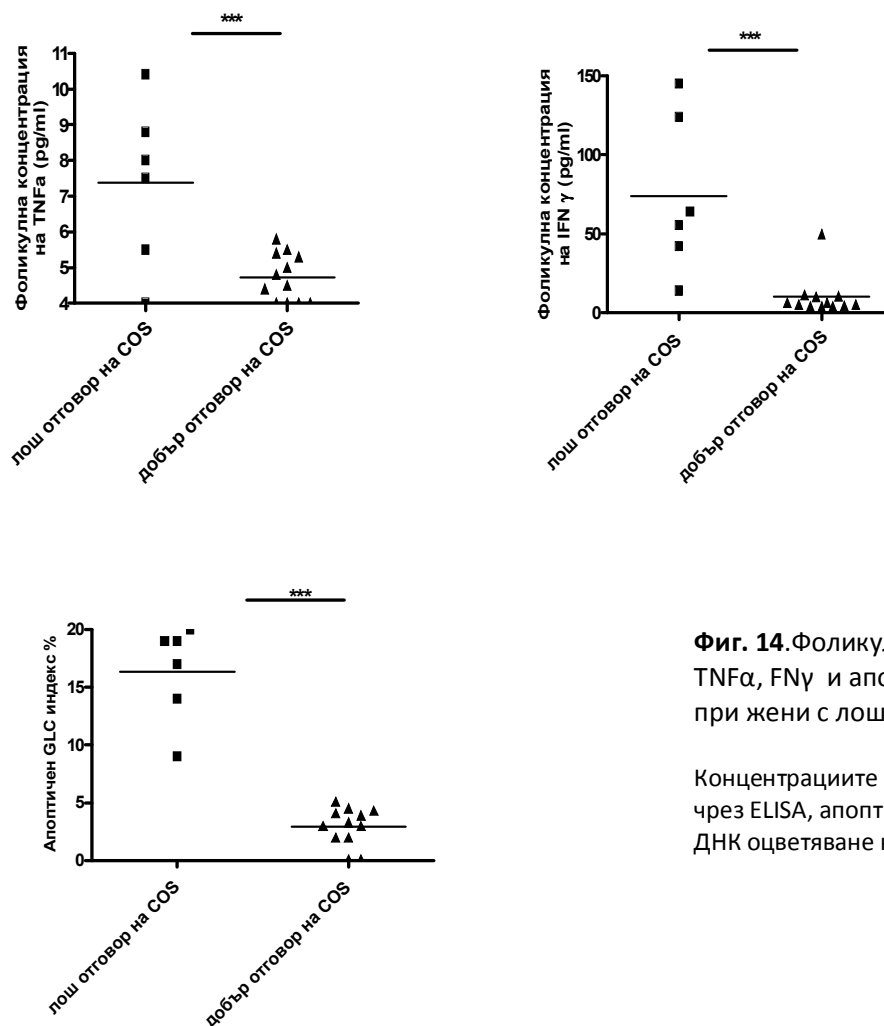
¹средна стойност \pm стандартно отклонение, ²cut-off/2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група



Фиг. 13. Нива на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност при жени с овариален стерилитет с добър и с лош отговор на COS, измерени с индиректен ELISA.

Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност ("мустаци"), 25-75% диапазон от стойности (бокс). (n=12– добър отговор на COS и n=6– лош отговор на COS)

TNF α и IFN γ бяха в по-високи концентрации във фоликулната течност на жените с лош отговор на COS в сравнение с тези с добър COS отговор (P=0.0002 и P=0.0007 съответно). Аналогично, за групата с лош отговор на COS беше установен по-висок апоптичен индекс на GLCs (P=0.0002, Фиг.14).



Фиг. 14. Фоликулни концентрации на TNFα, FNγ и апоптичен индекс на GLCs при жени с лош и добър отговор на COS.

Концентрациите на TNFα и IFNγ са измерени чрез ELISA, апоптичният индекс – чрез *in situ* ДНК оцветяване на GLCs

На базата на тези изследвания можем да допуснем, че лошият отговор на COS при жени с овариален стерилитет се дължи на повишените нива на анти-GLCs антитела в корелация с повишени нива на провъзпалителни цитокини във фоликулната им течност и по-висок апоптичен индекс на GLCs.

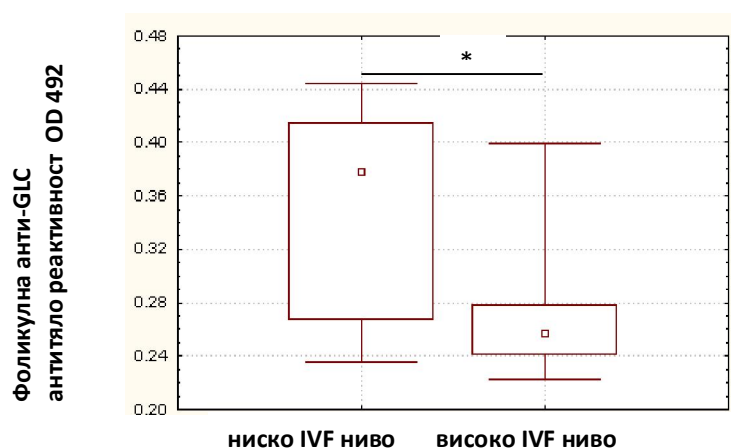
4.5.3.2. Провъзпалителни цитокини, апоптоза на GLCs и анти-GLCs антитела във връзка с нивото на IVF

Според % на оплодените ооцити, изследваните жени с овариален стерилитет (n=18) бяха разделени на две групи: с високо ниво на IVF (n=10) и с ниско ниво на IVF (n=8). Средната възраст на включените жени не се различаваше значително (Таблица 18). Нивото на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност за групата с ниско ниво на IVF беше по-високо от това за групата с високо ниво на IVF (P=0.02, Фиг. 15). Относителната честота на положителните за фоликулни анти-GLCs антитела жени беше значително по-висока в групата с ниско ниво на IVF (Таблица 18).

Таблица 18. Показатели на жени с овариален стерилитет с високо и с ниско ниво на IVF, проследени за фоликулни концентрации на провъзпалителните цитокини TNF α , IFN γ , за апоптичен индекс на GLCs и за фоликулни анти-GLCs антитела.

Показатели	високо IVF ниво (n=10)	ниско IVF ниво (n=8)	P стойност
възраст ¹	31.60 \pm 2.55	33.50 \pm 2.67	P=0.1
брой на оплодени ооцити ¹	7.90 \pm 2.42	1.00 \pm 1.07	P=0.0002
% на оплодени ооцити ¹	78.29 \pm 17.12	22.36 \pm 19.76	P=0.0002
% положителни за фоликулни анти-GLCs антитела жени ²	10.00 (1/10)	62.50 (5/8)	P<0.0001

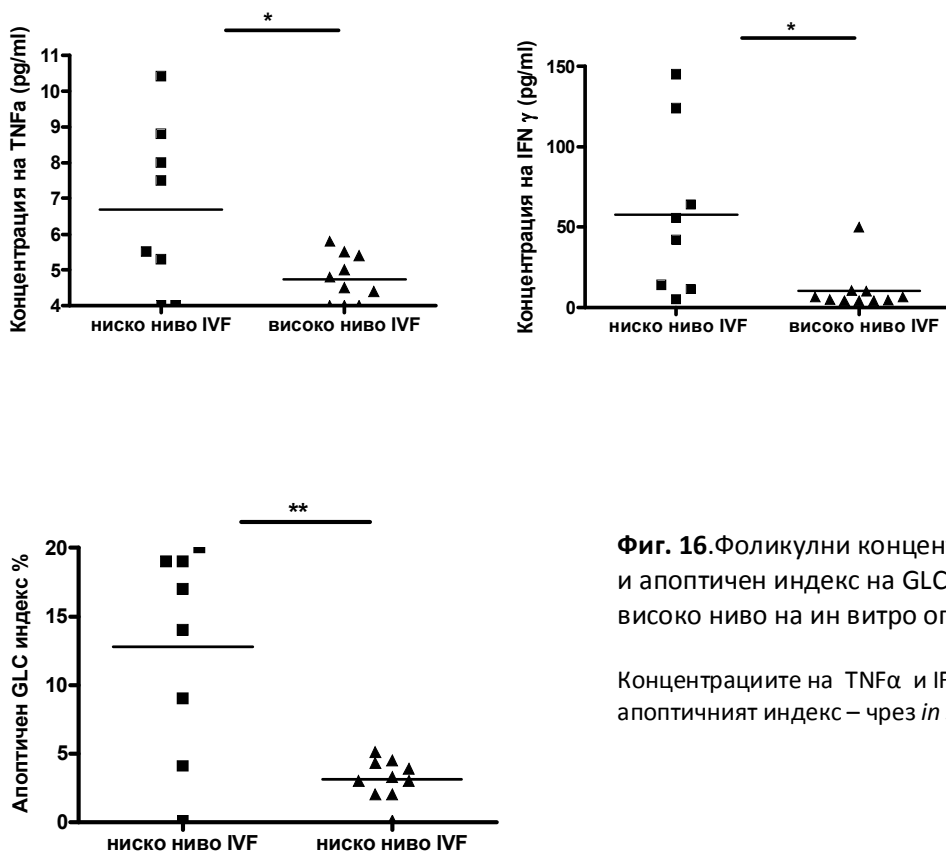
¹средна стойност \pm стандартно отклонение, ²cut-off/2 стандартни отклонения над средната стойност за контролната група



Фиг.15. Нива на фоликулната анти-GLC антитяло реактивност при жени с овариален стерилитет с високо и с ниско ниво на IVF.

Данните са представени с бокс-плот, както следва: медиана (окръжност), минимална-максимална стойност (“мустаци”), 25-75% диапазон от стойности (бокс), n=10– високо ниво на IVF и n=8– ниско ниво на IVF.

В групата с ниско ниво на IVF бяха регистрирани по-високи фоликулни концентрации на TNF α и IFN γ , както и по-висок апоптичен индекс на GLCs (P=0.02, P=0.01 и P=0.001 съответно, Фиг. 16).



Фиг. 16. Фоликулни концентрации на TNF α , на IFN γ и апоптичен индекс на GLCs при жени с ниско и високо ниво на ин витро оплождане.

Концентрациите на TNF α и IFN γ са измерени чрез ELISA, апоптичният индекс – чрез *in situ* ДНК оцветяване на GLCs

Нашите резултати показват две важни находки: 1) във фоликулната течност на жени с овариален стерилитет и позитивни за анти-GLCs антитела се установяват повишени нива на провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ и висок % на апоптични GLCs, и 2) повишените нива на провъзпалителните цитокини и високият % на апоптични GLCs във фоликулната течност на тези жени обуславят лош отговор на COS и ниско ниво на IVF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Положителната връзка между нивото на анти-GLCs антителата и нивото на провъзпалителните цитокини е показателна за паралелно активиране на хуморален и клетъчен имунен отговор, а корелацията между нивото на апоптозата на GLCs и нивото на анти-GLCs антителата предполага роля на апоптозата в генезиса на автоимунитета срещу GLCs.

Въпросът е по какъв начин апоптозата може да е намесена в автоимунна реакция срещу GLCs при положение, че апоптозата и фагоцитозата на апоптичните телца са “имунологично-безшумни” процеси.

При изследванията върху ролята на апоптозата в патогенезата на някои автоимунни заболявания, например системен лупус еритематозус, е установено, че редица антигени претърпяват модифициране като оксидиране, хиперфосфорилиране, фрагментиране от каспази и/или от гранзим Б, и се акумулират в апоптичните телца. Натрупването на прекалено голям брой апоптични клетки и/или неефективна фагоцитоза на апоптичните телца от макрофагите създават предпоставки за натрупване на умиращи клетки и за фагоцитиране на апоптичните телца от дендритни клетки.

При естествения цикъл на яйчника обикновено се развиват и овулират от 1 до 3 фоликула с последваща физиологична апоптоза и лутеогенеза. Екзогенното хормонално стимулиране на яйчника, обаче, води до развитие на голям брой фоликули и може да провокира абнормална апоптоза с всички последващи събития.

Интересен поглед към този проблем дават и актуалните към настоящия момент концепции за Danger модела, според който вродената имунна система различава не толкова свое от чуждо, а по-скоро опасно от безопасно без значение дали е свое, или чуждо и концепцията за ролята на вродената имунна система във функцията на яйчника. Тези модели постулират, че умиращите цитокератин-негативни гранулозни клетки отделят сигнали за "опасност", които активират цитокератин-позитивните гранулозни клетки, които са незрели дендритни клетки. Веднъж активирани, те се трансформират в гранулозо-подобни зрели дендритни клетки, способни да преработват и представят антигени на адаптивната имунна система и по този начин да генерират адаптивен имунен отговор. Повишеното ниво на апоптичните GLCs може да доведе до дисбаланс в комуникацията между вродената и адаптивната имунна система, а той от своя страна до генериране на (авто)имунен отговор срещу GLCs.

ИЗВОДИ

- Установена е висока честота на анти-GLCs антитела в серума и фоликулната течност на инфертилни жени в програми за IVF-ET.
- Протеини с молекулна маса 37 kDa, 47 kDa, 70/80 kDa и 110 kDa са прицелни антигени на анти-GLCs антителата при инфертилни жени. Анти-GLCs антителата от клас IgG разпознават междувидово консервативни детерминанти.
- Наличието на анти-GLCs антитела при жени с безплодие води до понижена успеваемост при ин витро оплождане, в сравнение с жени, при които не се откриват анти-GLCs антитела.
- Жените с овариален фактор за безплодие са по-често позитивни за анти-GLCs антитела в сравнение с тези с тубарен или с комбиниран такъв.
- Наличието на анти-GLCs антитела във фоликулната течност на жени с овариален фактор за безплодие корелира с повишени нива на провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ и с повишена апоптоза на GLCs.
- Във фоликулната течност на жени с овариален фактор за безплодие и неуспешен COS/IVF се установяват повишени нива на анти-GLCs антитела и провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ , както и повишена апоптоза на GLCs.
- Добрият отговор при стимулация с гонадотропини не винаги е свързан с повишена успеваемост при ин витро оплождане често поради повишени нива на анти-GLCs и анти-ZP антитела.

ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ

- Проведените от нас проучвания са първите, в които GLCs от фоликулни аспириати на жени в програми за IVF-ET са използвани като антигенен материал в ELISA и в имуноблот за изследване на AOA's.
- Разработен и валидиран е ELISA за детекция на анти-GLCs антитела, базиран на тотален антигенен екстракт от човешки GLCs.
- Установена е висока честота и високо ниво на анти-GLCs антитела при жени с овариален фактор за безплодие.

- Доказано е негативното влияние на анти-GLCs антителата върху ин витро оплодяемостта на ооцитите.
- Идентифицирани са 4 прицелни антигена на анти-GLCs антителата в серума на инфертилни жени, а именно, GLC протеини с молекулна маса 37 kDa, 47 kDa, 70/80 kDa и 110 kDa.
- Получени са оригинални данни за положителна връзка между нивата на анти-GLCs антителата, провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ и апоптозата на GLCs във фоликулните течности на жени с овариален фактор за безплодие.
- Получени са оригинални данни за негативен ефект на високите нива на анти-GLCs антителата, провъзпалителните цитокини TNF α и IFN γ и апоптозата на GLCs върху успеваемостта на COS/IVF процедурите при жени с овариален фактор за безплодие.

Списък на научните статии във връзка с дисертацията:

1. **Vangelov I**, Dineva J, Nikolov G, Lolov S, Ivanova M. Antibodies against granulosa luteinized cells and their targets in women attending IVF program. American Journal of Reproductive Immunology, 53: 1–7 (2005) ISSN: 0271-7352; IF-2.172
2. **Vangelov I**, Dineva J, Nikolov G, Gulenova D, Ivanova M. Impact of follicular cytokines (TNF α , IFN γ) and apoptosis of human granulosa luteinized cells (GLCs) on the results after controlled ovarian hyperstimulation (COH) and in vitro fertilization (IVF) in women with ovarian factor of infertility. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 62:1167-1174 (2009) ISSN: 1310-1331; IF-0.204
3. **Vangelov I**, J. Dineva, K. Todorova, D. Gulenova, G. Nikolov, M.D. Ivanova. Anti granulosa and anti zona pellucida antibodies are associated with poor outcome of oocyte fertilization in infertile women with good response to controlled ovarian hyperstimulation (COH). Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2012, vol. 65, No 9, 1219-1224

Списък на участията в научни форуми във връзка с дисертацията:

1. **И. Вангелов**, Ж. Динева, Г. Николов, Д. Гуленова, М. Иванова. Връзка на фоликуларните нива на антигранулоза антителата (АГА), TNF α , IFN γ и апоптозата на гранулоза лутеинните клетки (ГЛК) с резултатите от КОХ/ИВО при инфертилни жени. IX Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и Хормонозаместителна терапия, в.к. „Ривиера“, 11-14 април 2008
2. **И. Вангелов**, Ж. Динева, К. Тодорова, Д. Гуленова, Г. Николов, М. Иванова. Връзка между повишената автореактивност към овариални антигени с отговора на хормонална стимулация и резултатите от ин витро оплождането при жени в програма за IVF-ET. XII Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и Хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие, Боровец, 17-20 март 2011г.
3. **Vangelov I.**, J. Dineva, G. Nikolov, M. Genov, MD. Ivanova. The relationship of Anti- granulosa cell antibodies in follicular fluids of women with the IVF outcome” Graz, AJRI, 56, 34-61, 2006
4. **Vangelov I.**, Dineva J, Nikolov G, Ivanova M. Evolutionary conserved antigens are recognized by anti-granulosa cell IgG antibodies present in sera of infertile women. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction 22-24 June, 2012, Varna.
5. J. Dineva, **I. Vangelov**, R. Abrashev, K. Todorova, D. Gulenova, G. Nikolov, I. Rangelov, G. Stamenov, M. Angelova, M. Ivanova. The survival role of Superoxide dismutase 1 (SOD1) on human granulosa luteinized cells in vitro. 17th Symposium of the Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar, 26-29 May, 2011

Благодарности

Изказвам своята най-сърдечна благодарност и огромна признателност към научния си ръководител доц. Мария Иванова за неогренимата помощ, съветите, компетентното ръководство, доверието, безкрайното търпение и моралната подкрепа при разработването и написването на дисертационния труд.

Специална благодарност изказвам на Доц. Жулиета Динева (ИБИР-БАН, сега служител в "МИЛРЕЙ" АД) и на специалист Верка Пешева (ИБИР-БАН), за това, че бяхме страхотен екип, и че останаха до мен в най-трудните моменти.

Изключително съм благодарен на Доц. Таня Димова (ИБИР-БАН) за помощта при изготвянето на дисертационния труд и автореферата, за вярата в мен и за куража да продължавам напред.

Искрено благодаря на Доц. Красимира Тодорова и на Доц. Сорен Хайрабемян за ползотворната съвместна работа и човешкото отношение към мен.

Благодаря на Гл. Ас. Елена Стоянова (ИБИР-БАН) за помощта при техническото оформяне на автореферата.

Благодаря на директорите на ИБИР-БАН Проф. Райна Георгиева, Доц. Маргарита Моллова, Проф. Димитрина Качева и Проф. Мария Иванова-Кичева, на : Ас. Тодор Чаушев (ИБИР-БАН, сега ембриолог в МБАЛ "Надежда"), както и на Проф. Стефан Лолов, Доц. Павел Рашев, Гл. Ас. Силвина Запрянова, докторант Антония Терзиева и всички останали колеги от ИБИР-БАН за полезните съвети, препоръки и оказаното ми съдействие.

Благодаря на д-р Георги Николов (МЦ "РепроБиоМед"), на Диана Гуленова (ембриолог в МЦ "РепроБиоМед") и на д-р Методи Генов (I-ва АГ болница "Св. София" и МЦ "Вяра"), а също и на всички техни пациентки, помогнали за осъществяването на тези изследвания.

Не на последно място искам да Благодаря на родителите си за огромното търпение, разбиране и подкрепа.