

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“
Секция „Имуноневроендокринология“

Ваня Димитрова Младенова

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ МИТОХОНДРИАЛНИЯ СТАТУС В ЯЙЧНИЦИ И
ЕПИГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ В ООЦИТИ НА СУПЕРОВУЛИРАНИ МИШКИ,
ПОЛУЧАВАЛИ КОМБИНИРАНА БИОДОБАВКА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител: доц. Елена Кистанова

Научна специалност ш.04.02.01 „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“ професионално направление - 6.3. „Животновъдство“, област на висше образование - б. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“

София

2019

Дисертационният труд е написан на 133 страници и е онагледен с 43 фигури и 17 таблици. Библиографската справка включва 242 литературни източника.

Експерименталните дейности са извършени в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ към Българска академия на науките, лаборатория „Проген“.

Дисертационният труд е осъществен с финансовата подкрепа на проектите : ДКОСТ01 / 10 и ДКОСТ 01/15 от ФНИ-МОН, България и на КОСТ Акциите FA1201, FA1403.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2019г. от часа в заседателната зала на Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ към Българска академия на науките, съгласно „Правилника за условия и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН“, пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Доц. Елена Кистанова

Доц. Павел Рашев

Проф. Мария Иванова (резервен)

Външни членове:

Проф. Нина Атанасова (ИЕМПАМ, БАН, София)

Проф. Мая Игнатова (Селскостопанска Академия, София)

Доц. Станимир Йотов (Ветеринарномедицински факултет, ТУ, Стара Загора)

Проф. Радка Недева (ЗИ-Шумен, ССА) (резервен)

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН, (София, бул. Цариградско шосе 73), както и на Интернет страницата на ИБИР-БАН (<http://ibir.bas.bg>).

Забележка: Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответства на номерацията в дисертационния труд.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“
Секция „Имуноневроендокринология“

Ваня Димитрова Младенова

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ МИТОХОНДРИАЛНИЯ СТАТУС В ЯЙЧНИЦИ И
ЕПИГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ В ООЦИТИ НА СУПЕРОВУЛИРАНИ МИШКИ,
ПОЛУЧАВАЛИ КОМБИНИРАНА БИОДОБАВКА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител: доц. Елена Кистанова

Научна специалност: ш.04.02.01 „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“; Професионално направление - 6.3. „Животновъдство“, Област на висше образование - 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“

София

2019

АТФ-аденозин трифосфат

BSA-Говежди серумен албумин

cАТФ- Цикличен аденозинмонофосфат

СС-Кумулусни клетки

CG-Цитозин-гуанин

CL-Жълто тяло

CpG- Цитозин и гуанин, разделени само с една фосфатна група

CpGI- CpG-острови, са региони с висока честота на CpG места

DCAD- диетична разлика в катион-анион

DNA-дезоксирибонуклеинова киселина

Dnmt1- ДНК (цитозин-5) - метилтрансфераза 1

Dnmt3a- ДНК (цитозин-5) - метилтрансфераза 3А

Dnmt3b- ДНК (цитозин-5) - метилтрансфераза 3В

FC-Фоликуларни клетки

FSH- фоликуло-стимулиращ хормон

F-фоликул

GH-растежен хормон

HATs-хистон ацетилази

hCH-човешки хорион гонадотропин

HDACs- хистон деацетилази

IGF-I-инсулинподобен растежен фактор 1

IP-интерперитонално инжектиране

LH-лутеинизащ хормон

mRNA -информационна РНК

mtDNA (мтДНК)- митохондриална ДНК

MtDnmt 1- митохондриална ДНК (цитозин-5) -метилтрансфераза 1

MT-ND1-митохондриално кодирана NADN дехидрогеназа 1

PBS-фосфатно- буферен разтвор

PCNA-пролифериращ клетъчен ядрен антиген

PGCs-герминални(зародишни) клетки

PMSG- серумен гонадотропин от бременни кобили

RNA- рибонуклеинова киселина

RTTD-репликационен център

SAM-S- аденозилметионин

TRD-домейн за разпознаване на целта

TSSs-начални места за транскрипция

APT-Асистиращи репродуктивни технологии

Използвани съкращения

O-Ооцит

Въведение

Природата изисква от всеки жив организъм да създаде потомство. Затова проблематиката, свързана с репродуктивния процес, е от най-актуалните за биологията, с което мотивира множество изследвания, а нарушенията във фертилитета са изследователски предмет, както за хуманната, така и за ветеринарната медицина. Ето защо създаването на технологии за стимулиране на фертилитета и за преодоляване на нарушенията му има огромно икономическо значение за селското стопанство и за решаване на част от проблемите на демографската криза. Супероулулацията е една от стъпките на технологията ембриотрансфер, използвана за получаване на потомство от родители с нарушен фертилитет. Получаването на голямо количество качествени ооцити сериозно увеличава вероятността за успех на последващите процедури: ин витро фертилизация и ембриотрансфер. Голямото предизвикателство пред супероулулацията е разработката на успешни индивидуални протоколи за еднократно третиране, защото негативните ефекти на многократно хормонално стимулиране на яйчниците като кръвоизливи и развитие на тумори са добре известни. Въпреки продължителните изследвания, въпросите относно причините и механизмите, водещи до увеличаване чувствителността на зреещите фоликули към гонадотропни хормони, използвани за стимулация на яйчниците все още остават дискуссионни. Позитивното значение на пълноценното хранене за нормалното протичане на репродуктивните процеси в организма е безспорно. В същото време обаче данните за ролята на биоактивните добавки (витамини и растителни екстракти) за стимулиране на фоликулогенезата при супероулулацията са оскъдни и противоречиви. Не е изяснен и механизма, по който те въздействат на овариалната функция.

В настоящата дисертация са представени резултати от изследване влиянието на диета с комбинирана биодобавка, съдържаща витамин Е, минерали и фитогенен компонент, върху промените в митохондриалния статус на яйчници, върху успеха на супреоулулацията и върху качеството на овулирани ооцити при половозрели женски мишки, третирани със стандартния протокол за супероулулация. Данните са получени чрез прилагане на традиционни и съвременни информативни методи като хистологичен и имунохистохимичен анализ на яйчници, РТ-ПСР за генна експресия и определяне на брой копия митохондриална ДНК.

Достоверността на резултатите е преценена със стандартните общоприети статистически процедури.

Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е, да се проучи ефекта на комбинираната биодобавка при супероулулирани половозрели женски мишки върху митохондриалния статус в яйчници, успеха на супероулулацията и експресията на mRNA транскрипти на ензими, отговорни за метилиране на DNA в овулирани ооцити.

Задачи за изпълнение на целта на дисертациония труд

В изпълнение на тази цел се поставиха следните по-конкретни задачи:

Задача 1- Да се проследи ефектът на комбинираната биодобавка при суперовулирани половозрели женски мишки върху митохондриалния статус в яйчници.

Задача 2- Да се проследи ефектът на комбинираната биодобавка върху успеха на суперовулацията по брой получени ооцити и брой жълти тела в яйчници

Задача 3- Да се оцени епигенетичната зрелост на овулиралите ооцити по нивото на експерсия на mRNA транскрипти на ензими отговорни за метилиране на DNA.

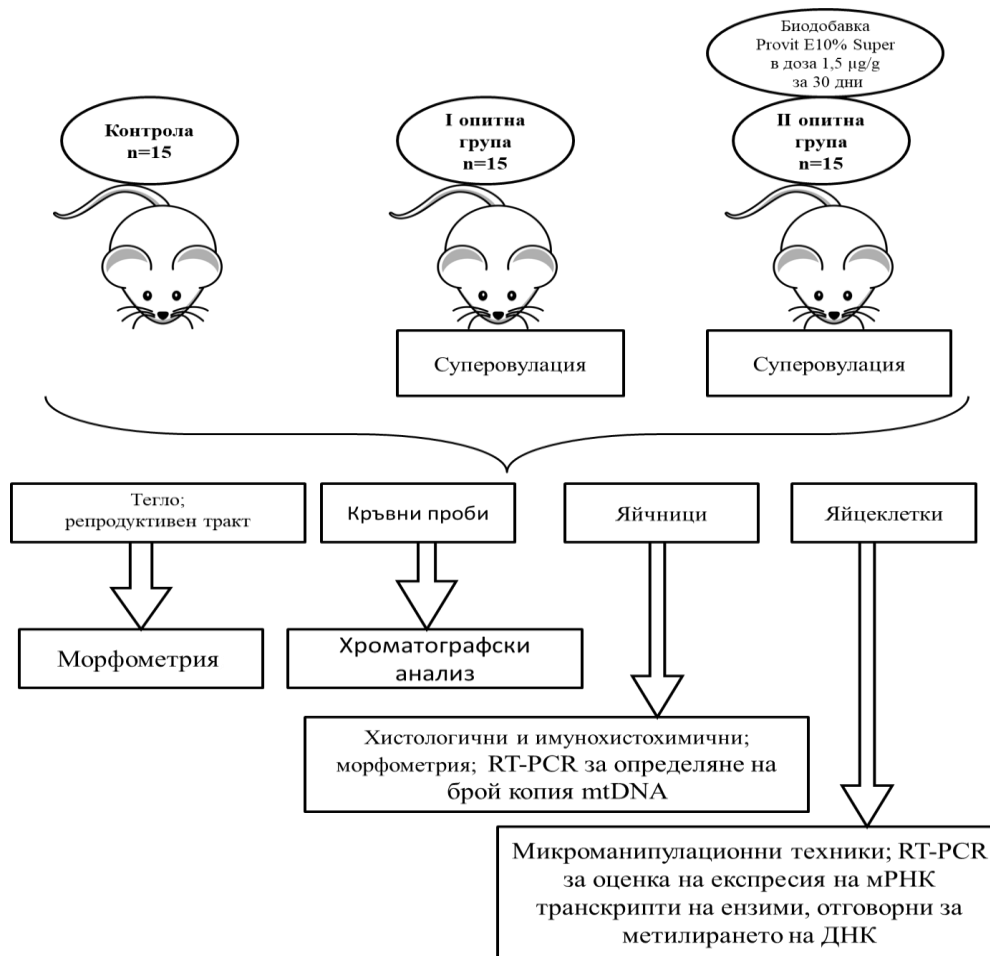
Работни хипотези на дисертационния труд

1. Изследваната добавка съдържа компоненти с антиоксидантни свойства. На базата на това е естествено да се предположи, че нейното действие може да се отрази върху митохондриалния статус, защото митохондриите са органели, отговорни за поддържане на оксидо-редукционния баланс.

2. Другата работна хипотеза се основава на известен факт, че в процеса на развитие яйцеклетките минават през кратко деметилиране, последвано от де ново метилиране на DNA в зреещи ооцитите до момента на овулацията. Ако нивата на DNA-деметилтрансферази са високи към момента на овулацията, това може да бъде показател, че де ново метилирането не е завършило. От друга страна обаче, ако нивата на DNA-деметилтрансферази са клонящи към нула, процесът на метилирането на DNA в ооцити може да се счита за успешен.

Материали и методи

Методологията на проведеното изследване включва научни експерименти с лабораторни животни ин vivo и лабораторни изследвания върху получения биологичен материал, чрез прилагане на широк набор от съвременни методи.



Фигура 1. Схематично представяне на експерименталната постановка: контролна група, I-ва опитна група, стимулирана по протокол за суперовулация (СО); II-ра опитна група, подложена на комбинирано въздействие - суперовулация и биодобавката Provit E10% Super (Д+СО)

1. В продължение на 30 дни животните от II опитна група (Д+СО) получавали разтвор от хранителна добавка Провит Е10%Супер 1,5 µg/g живо тегло индивидуално перорално.
2. Прилагане на стандартен протокол за суперовулация (Таблица1)
3. Получаване на биологичен материал
4. Хистологичен анализ
5. Имунохистологичен анализ
6. Хроматографски анализ-извършен във външна лаборатория
7. Молекулярно биологични методи
 - Обратнo-транскриптна реакция и полимеразно-верижна реакция (РТ-ПЦР) за анализ на mRNA транскрипти на DNA- метилтрансферази
 - RT-PCR за определяне на брой копия митохондриална ДНК (mtDNA) в яйчници
8. Статистически методи

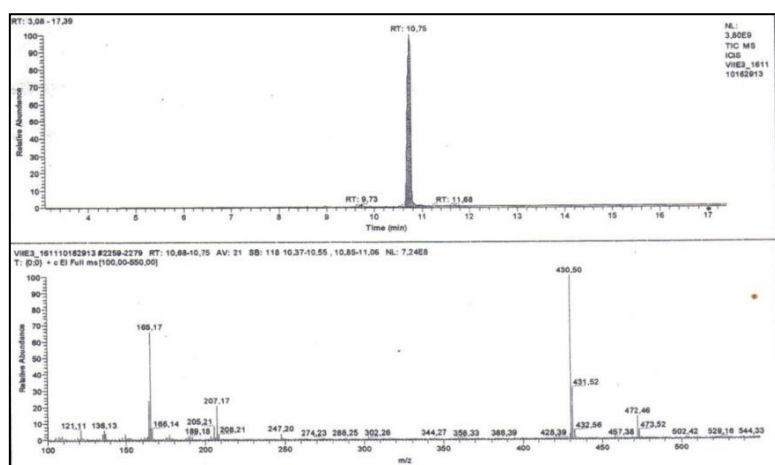
Таблица 1. Протокол за суперовулацията на женски мишки

ден 0	Инжектиране на PMSG- 6.00 I.U. (100 µL)
ден 2	Инжектиране на hCG -6.00 I.U. (100 µL)
ден 3	Събиране на ооцити - 13 до 14 часа след hCG

Резултати и Дискусия

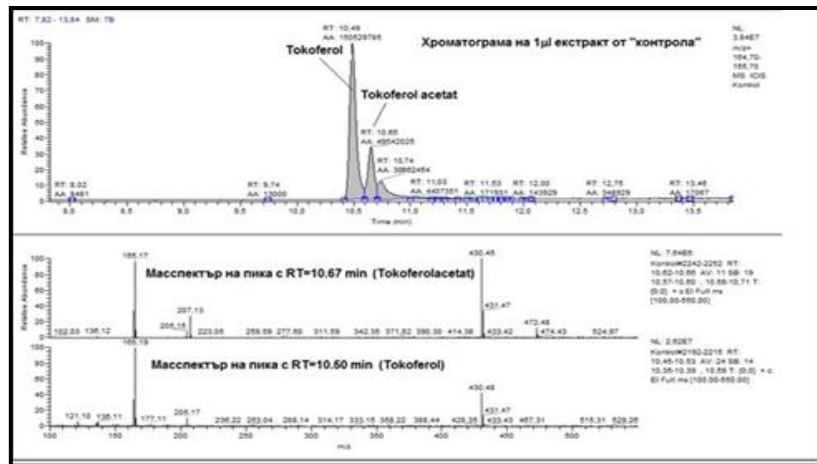
1 Хроматографски анализ на биоактивни компоненти в добавка Провит Е 10 % Супер и в кръвни проби на експериментални животни.

За идентифициране на биоактивната съставка в хранителната добавка Провит Е10% Супер е използван газхроматографски метод с маспектрална детекция след екстракция на пробата с хексан. Хроматограма на екстракта от изследваната хранителна добавка и маспектрограма са представени на фигура 2. Резултатите показват ясно изразен пик с време на задържане 10.75 min, характерен за токоферол ацетат.



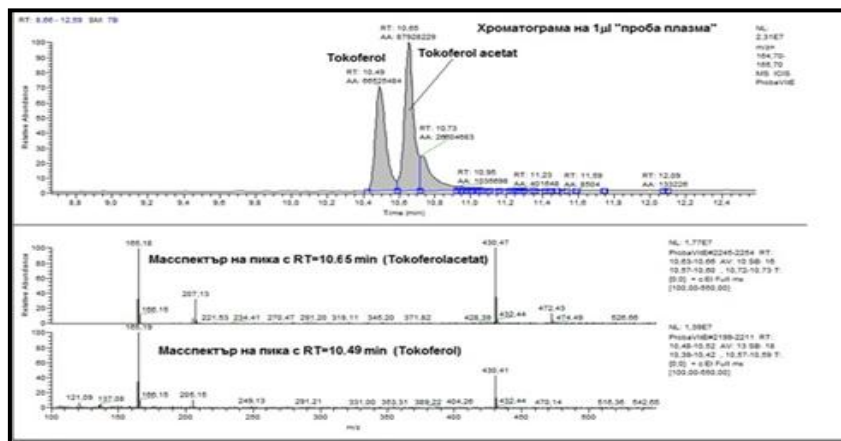
Фигура 2. Хроматограма и маспектрограма на изследваната хранителна добавка Провит Е 10 % Супер.

При контролните животни и нетретираните с добавка животни от I-ва опитна група витамин Е е регистриран основно във формата на токоферол и незначителни количества на токоферол ацетат (Фигура 3). На маспектъра бяха отчетени пикове с време за задържане 10,67 min, който е характерен за токоферол ацетат и 10,50 min, който е характерен за токоферол.



Фигура 3. Хроматограма и маспектрограма на кръвен серум от сборна проба на животни от контролна и първа опитна групи

При животни, получавали добавка (II-ра опитна група), се наблюдаваше увеличаване на концентрацията на витамин Е във формата на α -токоферол ацетат (Фигура 4), а количеството на токоферол намалява. При отчитане на маспектрограма е установено, че има наличие на пик с време на задържане на 10,65min за токоферол ацетат и пик с 10,49 min за токоферол.



Фигура 4. Хроматограма и маспектрограма на кръвен серум от сборна проба на животни от втора опитна група

Тези резултати показват, че животните добре усвояват витамин Е от добавката. Концентрацията на токоферол ацетат в кръвните проби на мишки от II-ра опитна група беше достоверно по- висока от контролата и първа опитна група (3.4 µg/ml против 1.9 µg/ml). Растителната компонента на добавката, артишокът, беше изследван за наличие на биоактивни компоненти – полифеноли. Съдържанието на полифеноли е определено по концентрацията на общи флавоноиди (един от класовете на полифеноли), която съставляваше $371,5 \pm 17,1$ mg QE/100 g сухо тегло (QE - кверцетин еквиваленти).

Получените от нас данни съвпадат с резултати на други изследователи, които установили, че артишокът е богат на полифенолни съединения- моно- и дикафеоилхинови киселини и флавоноиди, като лутеолин и апигенин гликозиди(Azzini et. al. 2007).

Витамин Е е неизбежна част от диетата в различно количество преди, по-време на бременност и след това - за предотвратяване на репродуктивни неуспехи (Wolf, 2005; McDowell, 2002; Umesiofi, 2008). Витамин Е е термин, който обединява осем свои производни - четири токоферола (α , β , γ и δ) и четири токотриенола (α , β , γ и δ), от всички тези производни алфа-токоферолът е най-активната форма на витамин Е. В организма на животните при изследване за наличие на витамин Е се открива алфа-токоферол. Витамин Е от съществено значение за репродуктивните процеси (Stuart and Kane, 2004). Литературните данни сочат, че при прием на витамин Е в доза 70 IU/kg от малки прасенца, се наблюдава по-добро усвояване на витамина от женските животни при сравнение с мъжките (Umesiofi, 2009). Нашите резултати са в съгласие с данните на Horn et al., (2010), получени при опити с крави, подготвяни за изкуствено осеменяване. Обогащването на тяхната дажба с 500 IU витамин Е дневно доведе до повишаване на концентрацията на серумен α -токоферол, спрямо контролната група ($3,43 \pm 0,243 \mu\text{g/ml}$ против $3,24 \pm 0,243 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.002$). При същите животни не е установена пряка зависимост между хормоналното третиране и серуменото ниво на α -токоферола (Horn et al., 2010).

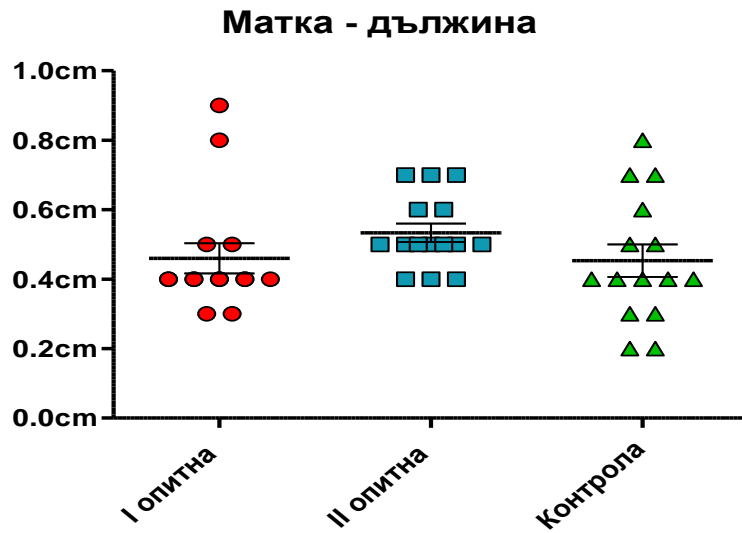
Получените резултати показаха, че изследваната добавка Провит Е 10 % Супер съдържа витамин Е във форма на токоферол ацетат. Витаминът добре се усвоява от третирани животни, за което свидетелства повишената му концентрация в кръвта на животни от втора опитна група при сравнение с контролната и първа опитна група. Фитогенната компонента на добавката, артишокът, е богата на биоактивни съединения полифеноли ($371,5 \pm 17,1 \text{ mg QE/100 g}$ сухо тегло).

2. Морфометрични изследвания на репродуктивния тракт при животни, третирани с добавка

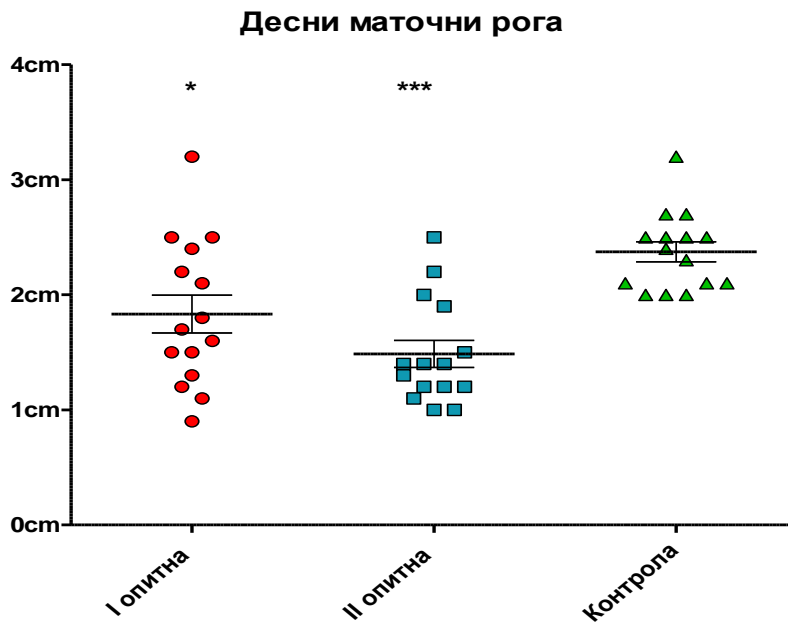
В дизайна на опита беше заложен анализ на следните параметри – живо тегло, тегло на яйчници, общо тегло на репродуктивния тракт, дължина на матка, дължина на ляв и десен маточен рог. Получените резултати са представени в Таблица 3. и фигури 5-7.

Таблица 2. Живо тегло, тегло на яйчници и общо тегло на репродуктивния тракт при контролни, I и II група опитни мишки. Данните са представени като средна \pm стандартно отклонение от средна стойност (mean \pm SD).

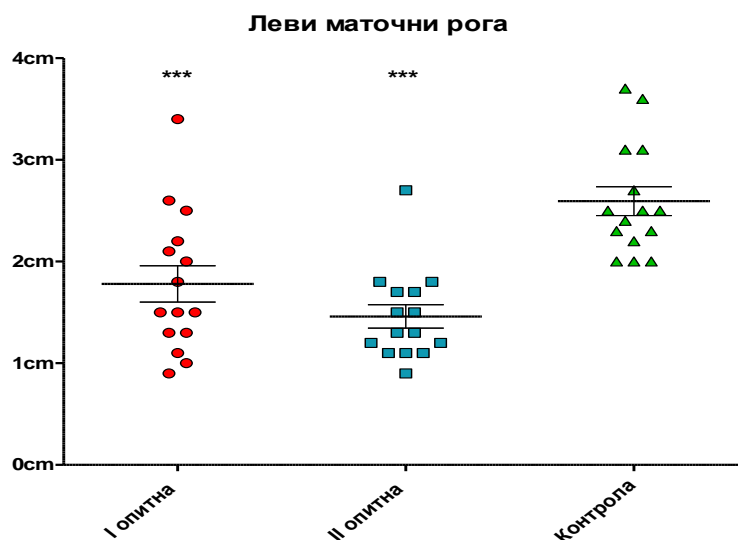
	I опитна група-СО (n=15)	II опитна група Д+СО (n=15)	Контрола (n=15)
Жива маса, г	36.20 ± 1.401	30.73 ± 1.119	33.20 ± 0.8292
Общо тегло на репродуктивен тракт, г	$0,233 \pm 0,063$	$0,260 \pm 0,08$	$0,231 \pm 0,098$
Тегло на яйчници, г	0.059 ± 0.016	0.069 ± 0.022	0.05 ± 0.024



Фигура 5. Дължина на матка при трите групи



Фигура 6. Дължина на десни маточни рога при трите групи (*- $P < 0.05$; ***- $P < 0.001$ спрямо контрола).



Фигура 7. Дължина на леви маточни рога при трите групи (*- $P < 0.05$; ***- $P < 0.001$ спрямо контрола).

Не са установени достоверни различия между групите по общото тегло на репродуктивния тракт и дължината на матка (Фигура 5). Дължината на маточните рога в двете опитни групи е достоверно по-ниска при сравнение с контролната (Фигура 6-7). В същото време, достоверни разлики по този параметър между двете опитни групи не се наблюдаваха. Забелявана е тенденция за намаляване на телесното тегло в група, третирана с добавка (Таблица 2)

От литературните данни е известно, че витамин Е може да подобри функцията на матката и яйчниците, чрез своите антиоксидантни и имуномодулиращи свойства (Allison and Laven, 2000). През 2000 екипът на Baldie et al., установил, че допълнителния прием на витамин Е променя репродуктивните способности чрез директното повлияване на матката и яйчниците по различни механизми (Baldie et al., 2000). Добавянето на витамин Е към диетата по време на бременността на майката или по времето на ранното развитие има съществено значение върху растежа и физиологичните функции при малки прасета (Umesioji, 2009). Приемът от свине на 22 IU витамин Е не засяга живото им тегло по време на бременност или кърмене. Тази доза не повлиява серумното ниво на α -токоферол ацетат при тези животни, обаче авторите отчитат, че размножаването им било благоприятствано от витаминната добавката, поради предотвратяване на маточни проблеми, характерни за млади свине (Mahan et. al., 2000). Точно обратното на предходните резултати установяват,

Balakrishnan и колектив (2013), те посочват значителна разлика между начално и крайно тегло при плъхове приели орално доза от 125 mg/kg α -tocopherol. Нашите данни, показващи тенденция за намаляване на телесното тегло при експериментални животни, могат да се обяснят с друга съставка на биодобавката Провит Е 10 % Супер – растението артишок, за която е известно, че намалява телесното тегло, подобрява чернодробната функция, липидния профил и кръвната захар (Sritiawthai et al., 2013). Освен това, за намаляване на телесното тегло при третиране на плъхове с витамин Е съобщават и Soliman et. al., (2014). В полза на твърдението, че телесното тегло кореспондира с промените в теглото на половия апарат са данните от изследване на Петрова (2017). Анализирайки развитието на половия апарат при две породи свине в процеса на половото съзряване, тя установява на базата на вариационния коефициент, че разликите в тегловните и линейните измервания зависят в по-голяма степен от възрастта и живото тегло, както и от индивидуалните особености на животните.

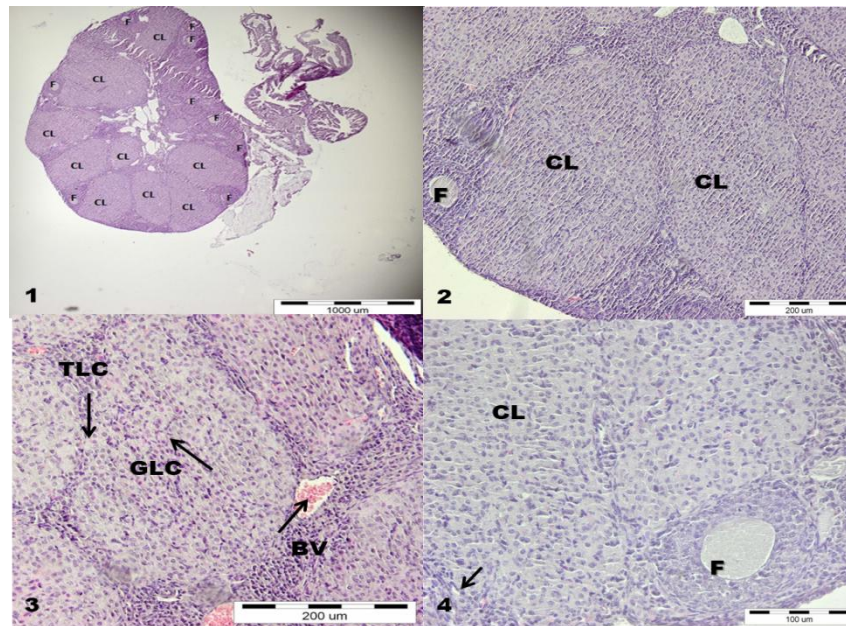
Изпитаната от нас добавка не оказва съществено влияние върху живото тегло и морфометричните параметри на репродуктивния тракт при опитните животни. Забелязаното намаляване на дължината на маточните рога при двете опитни групи при сравнение с контрола, както и липсата на достоверни различия по този параметър между опитните групи, позволява да се предположи, че тази промяна е обусловена в по-голяма степен от хормоналното влияние, а не от добавката.

3 Влияние на комбинираната добавка върху функция на яйчниците при експериментални мишки

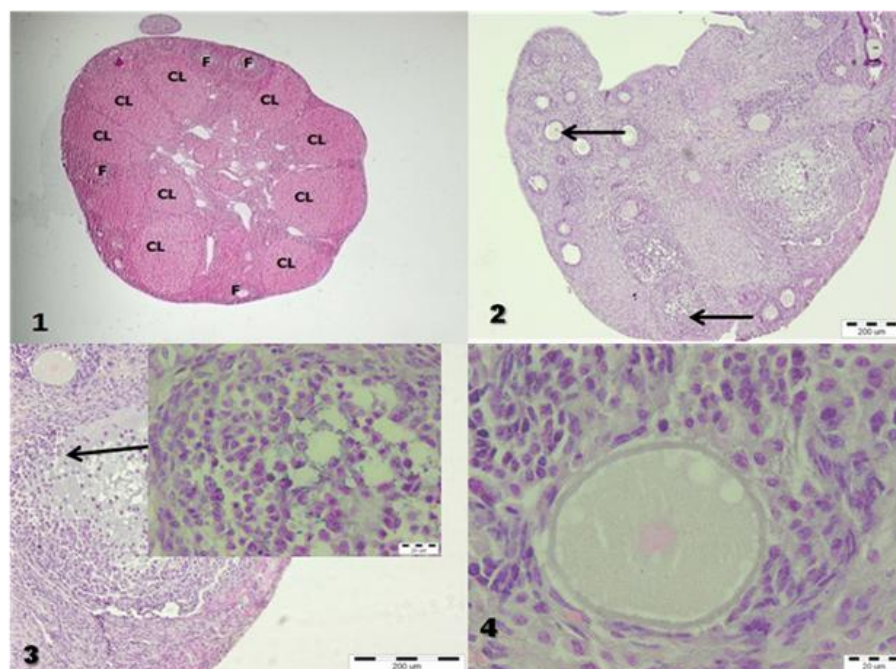
3.1 Морфологични промени в яйчници

В резултат на хистологичният анализ, оценихме измененията на яйчниковите структури в резултат на суперовулаторния отговор при двете опитни групи, които отговарят на хормонално третиране при I група, а при II опитна група са повлияни допълнително от хранителната биодобавка Провит Е10% Супер. Докато при контролната група наблюдавахме типично развита дивизия от фоликули и брой жълти тела, които са характерни за линията Swiss white при спонтанна овулация (Фигура 8), в яйчниците на опитните животни бяха открити типични промени, характерни за хормоналната стимулация. На микрофотографиите от хистологичните препарати (фигура 9 и 10) се наблюдават множество жълти тела и фоликули в напреднал стадий на развитие и при двете опитни групи, което е показател за успешно приложен

протокол за суперовулация. Резултатите сочат, че, въпреки хормоналното третиране на животните, не са всички антрални фоликули овулирали.

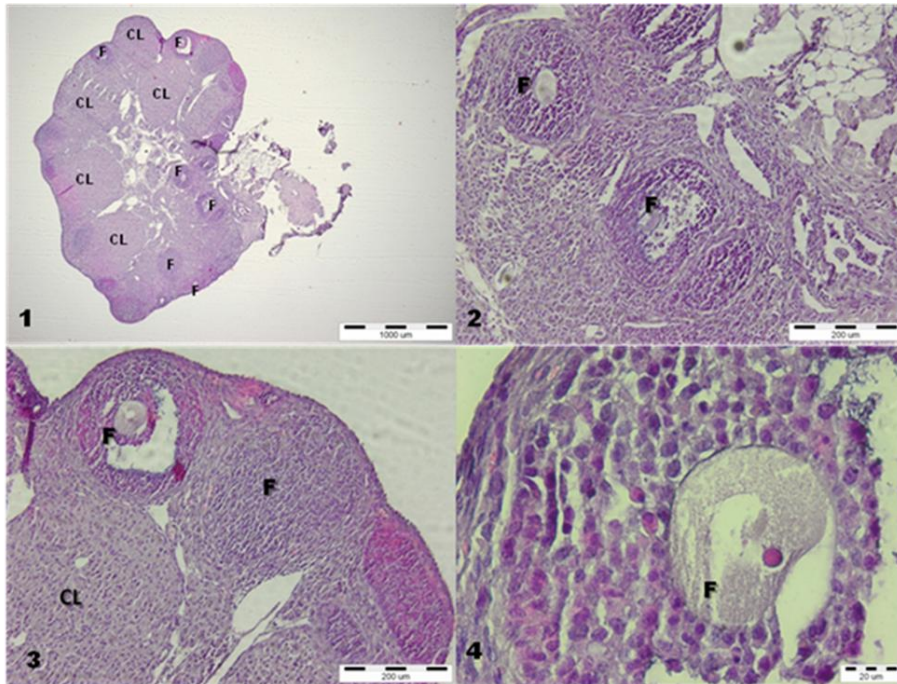


Фигура 8. Микрофотографии на хистологични препарати на миши яйчници от контролна група (H&E). 1) Срез през целия яйчник (x 4); 2) Фрагмент от яйчник с жълти тела и фоликули(x 10);3) Жълто тяло (x 20) 4)Фрагмент от яйчник с фоликул, тека лутеални клетки(стрелка)x 40;- F-фоликул; CL- жълто тяло;GLC- Гранулозни лутеални клетки; TLC- тека лутеални клетки; BV- кръвоносен съд с еритроцити в него



Фигура 9. Микрофотографии на хистологични препарати на миши яйчници от I опитна група -CO (H&E). 1) Срез през целия яйчник (x4) 2) Фоликули на различен стадии от развитието (x 10) (черните стрелки); 3) Атрезирашц /празен фоликул(x20)(черна стрелка)(инсерт атретични

тела (стрелка) (x100)/.; 4) Яйцеклетка с ясно изразена zona pellucida и ядро (x100); F- фоликул; CL- жълто тяло



Фигура 10. Микрофотографии на хистологични препарати на миши яйчници от II опитна група-Д+СО (Н&Е). 1) Срез през целия яйчник (x4) 2) Третичен и ранен антрален фоликул (x 20); 3) Антрален фоликул и жълто тяло(x 20); 4) Антрален фоликул (x100); (Н&Е);F- фоликул; CL- жълто тяло

Морфометричната оценка на яйчниците на трите групи относно броя на фоликули и жълти тела (Corpora lutea) беше направената върху десет последователни срези от яйчници. Броят на жълтите тела и антралните фоликули е достоверно по-висок във втора опитна група при сравнение с контролата и първа опитна група (Таблица 3; Фигура 8-10). При първа опитна група се наблюдават множество вторични фоликули в преход към третични, което говори, че третирането с хормони въвлича по-голям брой фоликули в процеса на фоликулогенезата, но не всички овулират (Фигура 9/2).

Таблица 3. Популациите на отделните фоликуларни класове и брой жълти тела в миши яйчници от контролна , I и II опитна групи, изброени върху 10 хистологични последователни срези през целия яйчник. Данните са представени като средна \pm стандартно отклонение от средна стойност (mean \pm SD).

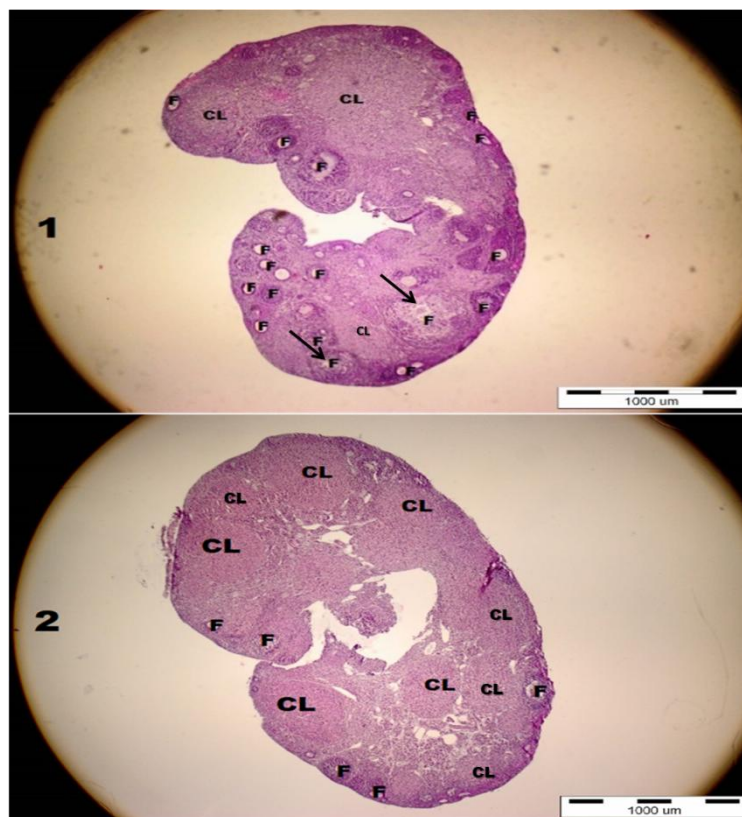
Групи	Вторични+третични	Антрални	Жълти тела
Контрола (n=15)	4,6 \pm 1,50	3,27 \pm 1,10	5.93 \pm 1.8
I опитна група СО (n=15)	5,07 \pm 2,94	1,4 \pm 1,5**	10.13 \pm 3.58
II опитна група Д+СО (n=15)	7,07 \pm 3,17 *	1.53 \pm 1,5 **	12.93 \pm 3.59

Статистическа значимост при * P<0.05 ;**P<0.01

В двете опитни групи се наблюдава изразена интер-индивидуална реакция към хормоналното стимулиране. Доказателство за това са широките вариации на стандартното отклонение при изчисляване на средния брой жълти тела в групите, подложени на суперовулация.

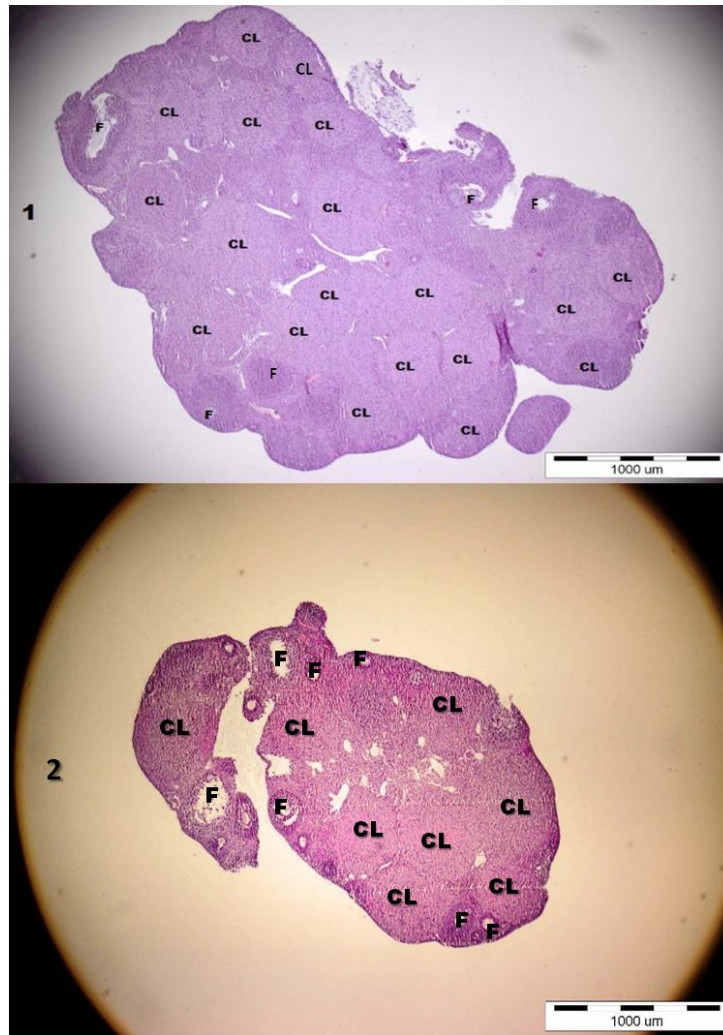
Таблица 4. Статистическа обработка на данни от брой жълти тела в миши яйчници от контролна, I и II опитна групи (P<0.01; ***- P<0.001).**

	Tukey's Multiple Comparison Test p-value	Критична стойност на тестова статистика, Q	Достовърно Р < 0,05	Обща достоверност
Жълти тела				
I опитна vs II опитна	-2.333	2.804	Не	Без значимост
I опитна vs Контрола	-4.200	5.046	Да	**
II опитна vs Контрола	-6.533	7.850	Да	***



Фигура 11. Различни нива на чувствителност към хормонална стимулация на яйчници при животни от I опитна група: 1) ниска, атрезирани фоликули (стрелки); 2) средна. (H&E), 4x.

Фиг. 11 демонстрира ниска чувствителност на яйчника към хормоналната стимулация при мишка от I опитна група. Както се вижда, хормоналната стимулация е провокирала интензивна фоликулогенеза, обаче, малък брой фоликули са стигнали до овулацията, за което свидетелства нисък брой жълти тела.



Фигура 12. Различни нива на чувствителност към хормонална стимулация на яйчници при животни от II опитна група –Д+СО : 1) супер висок овулаторен отговор с наличие на множество жълти тела (CL) и антрални фоликули (F); 2) нисък овулаторен отговор – по-малък брой жълти тела, фоликули на различен стадий.,.

Във втората опитна група (Д+СО) също се наблюдават големи вариации в броя жълти тела, в яйчниците на различни животни, след прилагане на суперовулаторен протокол (Фигура 12). Това се дължи не само на индивидуалната чувствителност към хормоните, но и на интер-индивидуалната разлика в реакция на биоактивната добавка. Известно е, че отговорът на биоактивните компоненти е строго индивидуален и зависи от много параметри на организма (Ashworth et al., 2009). Преди всичко, това е специфичността на чревната микрофлора, участваща в разграждането на биокомпоненти в стомашно-чревния тракт и способността за усвояване на разградените метаболити (Ashworth et al., 2009; Rowland et al., 2018). Въпреки това, ефектът на добавката върху овулаторния отговор е забележим, броят на жълтите тела във втора опитна група е достоверно по-голям при сравнение с първа опитна група (Таблица4).

Съгласно литературните данни се наблюдават различия в овариалния отговор на хормоналната стимулация при различни линии мишки (Martín-Coello et al., 2008; Nagy et al., 2002). Получените от нас резултати показват, че яйчниците и при двете групи животни реагираха на хормоналното третиране в границите, характерни за линия

мишки Swiss white. Нашите резултати съответстват на получените от Swann (2014), който докладва за значително увеличаване на броя на жълтите тела ($P < 0.001$) и почти двойно увеличаване на диаметъра им при мишки, стимулирани с 5 IU hMG при сравнение с животни, които не са стимулирани. По време на еструс цикъла, развитието на овариалните фоликули е тясно свързано с липидния метаболизъм. Именно мастните киселини предоставят енергията за узряването на яйцеклетките и ранното развитие на ембриона. Гонадотропините могат да регулират стероидогенезиса и новосинтезирането на мастни киселини, но без това да рефлектира върху теглото на половите жлези (Liu et al., 2009). Противоположно, Wang et al., (2015) докладват за статистически по-тежки яйчници на третираните мишки, което е резултат от отключване на холестерол-зависими гени да новосинтезират холестерол или да активират наличните липопротеини по време на лутеинизацията. При нас не се наблюдаваха статистически разлики в общото тегло на репродуктивния тракт и теглото на яйчници при контролна и стимулирани за суперовулация групи. Намерената от Wang et al., (2015) разлика в теглото на яйчници, вероятно, се дължи на стимулирането им с по-висока доза гонадотропини (10 IU PMSG и hCG) в сравнение с нашия протокол. Следва да се отбележи тенденция за по-високи стойности на тези параметри при животни, получавали добавка, при които се наблюдава по-голям брой жълти тела. Това кореспондира с данните на Wang et al., (2015), че увеличаването на тегло на яйчниците е свързано със засилване на новосинтеза на липопротеини по време на лутеинизация на фоликуларните клетки и формиране на жълтите тела.

Нашите резултатите сочат, че една част от антралните фоликули не овулират въпреки хормоналното третиране. Наличието на третични и антрални фоликули в яйчниците на суперовулирани мишки, наблюдавано в нашето изследване, вероятно, отразява различните функционални състояния на фоликулите, които по различен начин се повлияват от екзогенните гонадотропини в съответствие с техния етап на развитие, което е в съгласие с твърдението на McNatty et al., (2010). Наличието на атрезирани фоликули беше наблюдавано в двете хормонално стимулирани групи, като по-често в групата без хранителна добавка. За подобен негативен ефект на хиперстимулация на яйчниците с гонадотропини съобщават и Castillo et al., (2012). В същото време, рядко срещаните случаи на това явление в група мишки, получавали добавка, вероятно, се дължи на наличието в нея на витамин Е, който може да предотврати фоликуларна дегенерация и атрезия в яйчника (Gunev et al., 2007).

Репродуктивните процеси, които осъществяват животните в природата са тясно свързани с краткосрочни и дългосрочни ефекти на околната среда. При селскостопанските и питомните животни тези процеси са модифицирани до известна степен от контролираното размножаване, но някои фактори на средата продължават да влияят, като промени в храненето и други външни фактори (светлина, температура). Повечето репродуктивни реакции на външните фактори се кординират на ниво хипоталамо-хипофизо-гонадна ос, което е свързано с освобождаване и контролиране върху секрецията на гонадотропин-освобождаващ хормон (GnRH), който контролира от своя страна секрецията на хипофизните хормони и гонадотропините, които ръководят активността на репродуктивната ос. (Martin, 1984; Martin et al., 1986). FSH играе ролята в „GnRH-независимите“ пътища, които от своя страна имат особено важна роля за ефектите от храненето (Martin et al., 2004). Храненето е един от основните фактори, които могат да повлияват възпроизводството и образуването на гамети (Martin et al., 2004). Ефектът на храненето и хранителните вещества, които се усвояват от организма имат много широк спектър на влияние върху репродуктивната система.

Метаболитни процеси във фоликуларните клетки, които се извършват с помощта на хранителните вещества могат да повлияят на скоростта на овулацията. Впоследствие хранителните вещества могат да окажат влияние върху невроендокринните пътища, които от своя страна да повлияят на апетита и репродукцията. (Martin et al., 2004; Ashworth et al., 2009). От изключителна важност за животните е не само количеството на храната, но и нейният състав. Установени са краткосрочни и дългосрочни влияния на хранителния режим върху репродуктивния процес. Краткосрочните ефекти се свързват с влиянието върху развиващите се ооцити и ранните ембриони. Краткосрочните промени в диетата, като количество или състав на храната, има изключително значение, ако се осъществи в ключов момент за репродуктивния процес, защото могат да подобрят репродукцията. Дългосрочните ефекти са свързани с тъй наречените „програмиращи ефекти”, които имат пряко отношение на променливото съотношение на хранителните вещества (Ashworth et al., 2009). Дълготрайните промени в храненето могат да започнат преди или по времето на периода на забременяване и могат да окажат постоянни ефекти върху развитието на плода и след това на репродуктивната система в потомството.

Храненето модулира репродуктивната функция преди всичко чрез циркулиращите метаболитни хормони като инсулин, инсулин-подобен растежен фактор-I, растежен хормон, лептин и грелин (Scaramuzzi et al., 2015; Tena-Sempere et al., 2013). Тези хормони, вероятно, са медиатори на въздействието на храната върху фоликуларния растеж и скоростта на овулация (Somchit-Assavacheep, 2011). Стероидите на яйчниците също могат да повлияят действието на метаболитните хормони, което да води до промени във фоликулогенезата. Включването в диетата на мишки на добавка с антиоксидантни компоненти, вероятно, повлиява дейността на митохондриите, които имат ключова роля в синтеза на стероидите и оттам повлиява фоликулогенезата. Scaramuzzi et al. (2010) считат, че храната действа като сигнален механизъм отключващ метаболитните пътища, активиращи фоликулогенезата.

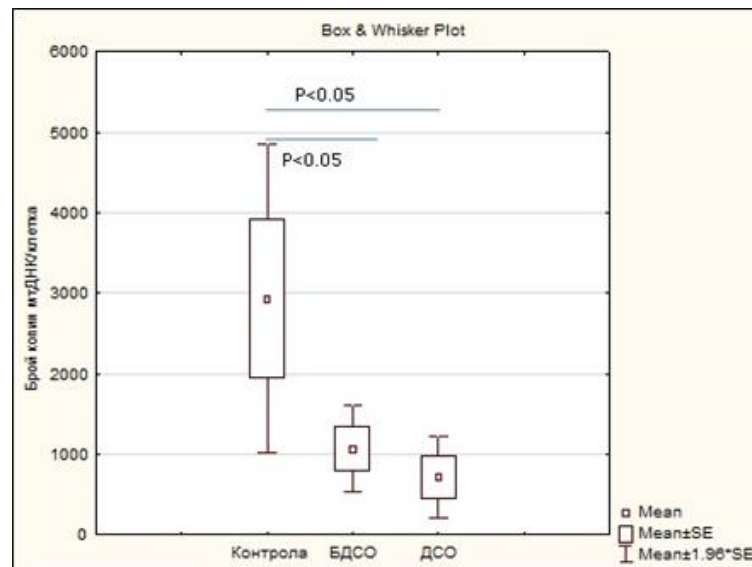
Допълването на диетата на мишки с биодобавката Провит Е 10% Супер подпомага овулаторния отговор на хормоналната стимулация, като оказва стимулиращо въздействие на фоликулогенезата, водещо до развитие на по-голям брой антрални фоликули, и като следствие от това по-голям брой жълти тела в опитната група. Вероятно, включването на достатъчен брой гранулозни клетки при развитието на фоликулите и нормалната им лутеинизация, може да се приеме като резултат от ефекта на биодобавката върху секрецията на хормони и редица растежни фактори, съществени за фоликулогенезата. Витаминно-минералното подхранване, преди прилагането на хормоналното третиране, може да се препоръча като подобрение на протокола за суперовулация на лабораторни животни, а след по-задълбочени проучвания в бъдеще ще може да бъде предложено за подобряване на успеваемостта на суперовулацията и при други животински видове.

4. Митохондриалния статус на яйчници

Вземайки предвид, че използваната хранителна добавка съдържа два компонента с изразени антиоксидантни свойства – токоферол и растителни полифеноли, изследването беше насочено към анализа на промените в митохондриалния статус на яйчниците. За тази цел беше изследван брой копия митохондриална ДНК (мтДНК) и протеиновата експресия на митохондриално кодирана NADH дехидрогеназа 1 (MT-ND

1), която е основна субединица на този ензим, формиращ комплекс I на дихателната верига в митохондрия.

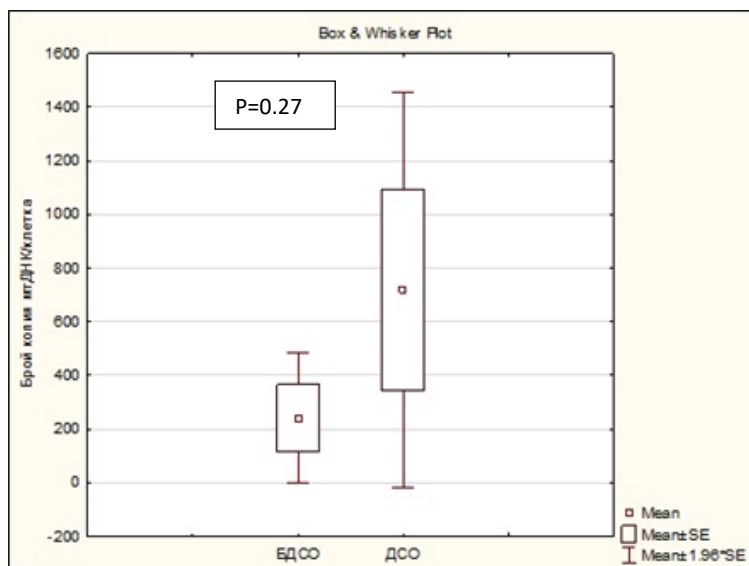
Резултатите от изследвания на брой копия мтДНК в овариалната тъкан са представени на фигура 13. Най-големият брой копия мтДНК на клетка бе отбелязан в овариалната тъкан на мишки от контролна група. При животни, получавали добавка, се наблюдаваха най-ниски стойности на този параметър. При сравнение на хормонално третираните групи бе отбелязана тенденция за по-малък брой копия на мтДНК в група, третирана с добавка, обаче, разликите между двете групи по този параметър не са достоверни статистически.



Фигура 13. Промени в брой копия митохондриална ДНК на клетка в яйчници на експерименталните животни.

Варирането по този параметър в двете опитни групи е доста широко и кореспондира с широката вариация на отговора на яйчниците към хормоналната стимулация. Яйчниците са хетерогенна клетъчна структура, като най-големият брой митохондрии се отбелязва в зреещите и зрели ооцити (Cotterill et.al., 2013). По-нисък брой копия мтДНК при суперовулиралите животни може да се смята за косвено потвърждение на успешната овулация. Наблюдаваният в яйчниците на контролните животни голям брой фоликули с ооцити на различен стадий от развитието, вероятна предпоставка за по-висок брой копия мтДНК на клетка в яйчниците на тези животни.

Допълнително броят копия мтДНК беше определен в кумулусни клетки на овулирала ооцити при две експериментални групи. Данните са представени на фигура 14. Разликите в значения на този параметър между групите не са достоверни. Трябва да се отбележат много по-широки граници за вариране на брой копия мтДНК в кумулусните клетки на ооцити от животни, получавали добавка. По всяка вероятност, това може да отразява хетерогеността в степента на зрелост на получените ооцити.



Фигура 14. Промени в брой копия митохондриална ДНК на клетка в кумулусни клетки на овулирани ооцити.

По нашите данни средният брой копия мтДНК в кумулусните клетки е по нисък в сравнение със среден брой копия мтДНК в целия яйчник при I опитна група ($240,74 \pm 164,7$ срещу $1070,1 \pm 275,8$), а при II опитна група тези параметри се доближават ($717,49 \pm 530,8$ срещу $721,1 \pm 256,3$). Изразена е тенденцията за по-висок среден брой копия мтДНК в кумулусните клетки на третираните с добавка животни.

5. Имунохистохимична локализация и интензитет на протеина MT-ND 1

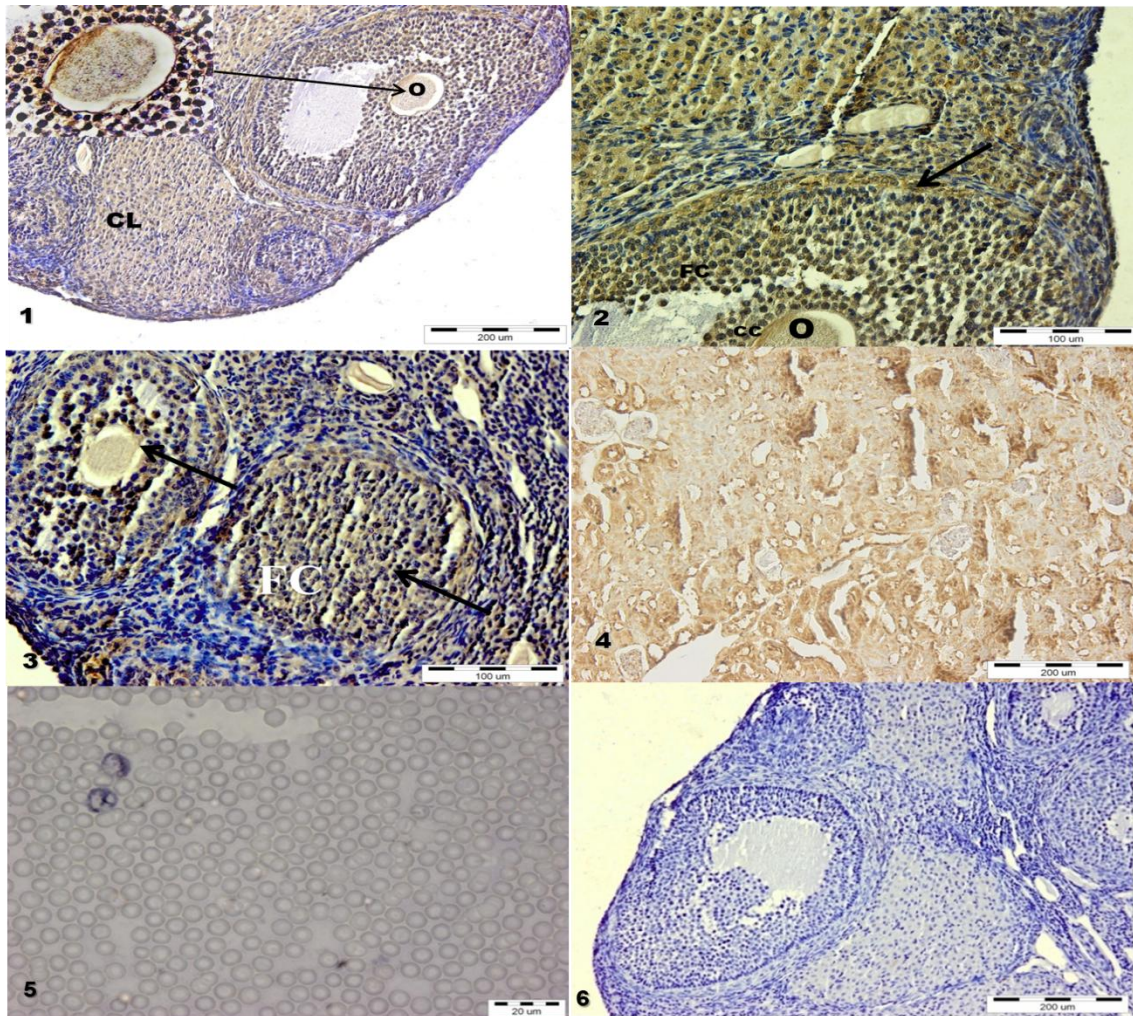
Активността на митохондрии в яйчиците беше анализирана по протеиновата експресия на MT-ND 1. Генът MT-ND 1, отговарящ за синтеза на протеин се кодира от mtDNA, а самият протеин, който е част от комплекс I на митохондриалната дихателна верига, се локализира на вътрешната мембрана на митохондриите. Следователно, имунохистохимично определяне на експресията на този протеин, до известна степен, отразява локализация и разпределяне на митохондриите в клетка.

За положителна външна контрола за локализацията на протеина MT-ND 1 беше избрана тъканта на бъбрек, която се характеризира с наличие на голям брой митохондрии. Еритроцитите са клетки, които нямат митохондрии и затова сме избрали кръвната натривка за негативна външна контрола за визуализация на протеина MT-ND 1.

Съгласно нашите резултати, този протеин има добре изразена експресия във всички овариални структури при трите групи животни: ооцити, фоликуларни клетки, жълто тяло, както и в клетките на строма. Анализът показва, че има определена специфика в експресията му в фоликуларните структури при животни от различни групи.

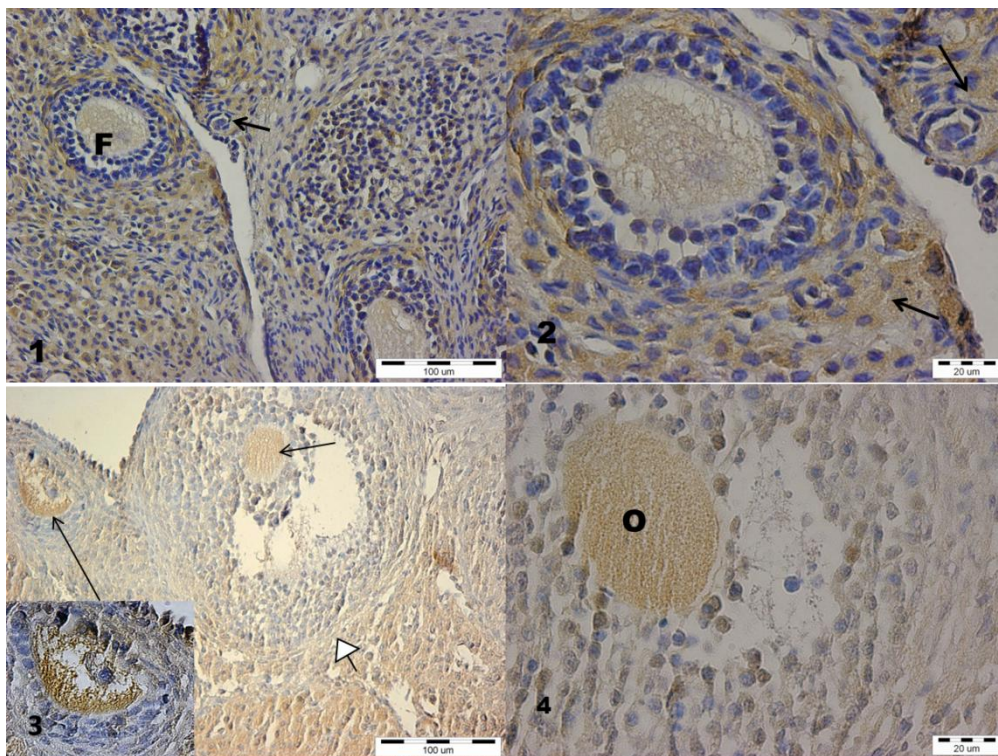
При контролните животни в ооцитите на различен стадий от развитието, включително, и в антралните фоликули сигналът не е много силен. В същото време, се

забелязва изразена експресия на MT-ND 1 в гранулозните клетки, а при антралните фоликули и в тека клетките (Фигура15).

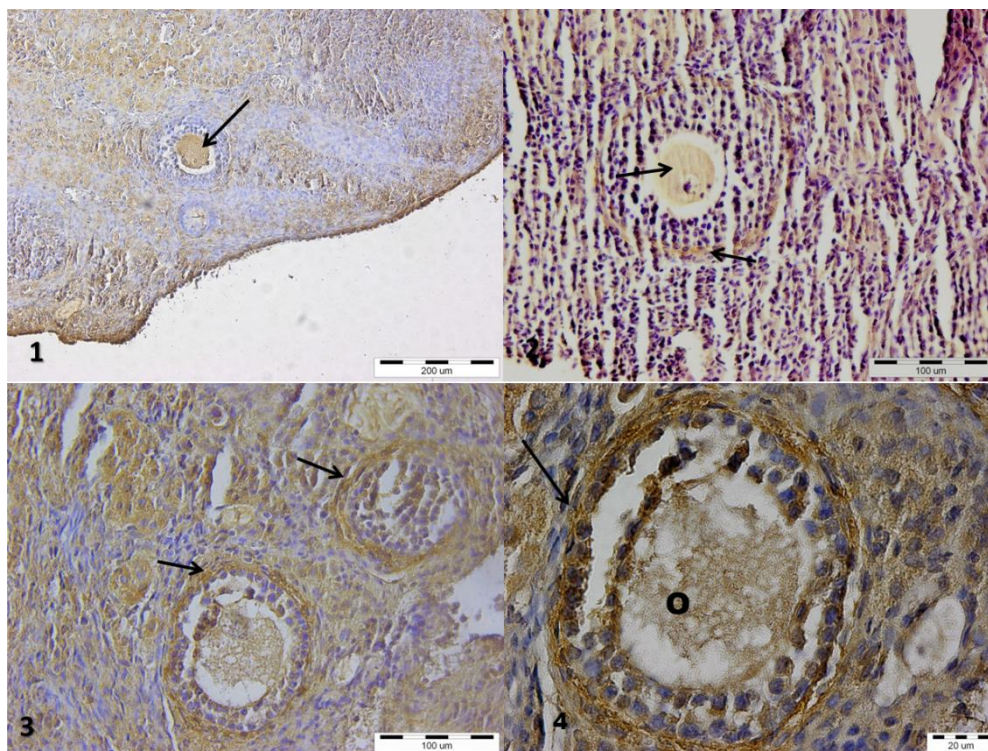


Фигура 15. Експресия на MT-ND 1 в овариални структури на животни от контролна група: 1) в ооцит, фоликуларни клетки и жълто тяло на преовулаторен фоликул(x20)(стрелка инсерт- ооцит и кумулусни клетки x 40);2) в тека клетки x 40 (стрелка) 3) в ооцит и фоликуларни клетки на ранен антрален фоликул (стрелки); 4) положителна външна контрола, миши бъбрек , x 20; 5) негативна външна контрола, миши еритроцити, x 100; 6) негативна вътрешна контрола на антияло, x 20.; F-фоликул; CL- жълто тяло;CC-кумулусни клетки; FC-фоликуларни клетки

При хормонално третираните животни от I и II опитни групи визуализацията на този белтък е със засилен интензитет на сигнала в яйцеклетките още на стадий вторичен-третичен фоликули и се увеличава съществено в стадий начален антрален фоликул (фигура 16). Най-силният сигнал се отбелязва в ооцити на животни, получавали хранителната добавка (фигура 16/1/4). Интензитетът на експресията на MT-ND 1 в гранулозните клетки при тези животни е незначителен. В отличие от контролната група, при хормонално третираните животни сигналът на този протеин в клетките на тека е добре забележим още на стадий вторичен фоликул. (фигура 17) Интересно е, че при третираните с добавка животни е се забелязва високо равнище на сигнала на MT-ND 1 в интерстициалните клетки, обкръжаващи растящите фоликули (фигура 16/2.)



Фигура 16. Експресия на MT-ND 1 в овариални структури на животни от II опитна група 1-2) в интерстициалните клетки обкръжаващи растящ фоликул(черна стрелка-примордиален фоликул) x 20 и x 100 съответно; 3) в яйцеклетките на вторичен и антрален фоликул (черни стрелки) и тека клетките (бяла стрелка) (x 40) (инсерт- вторичен фоликул x 100); 4) в яйцеклетката в ранен антрален фоликул(x 100); F –фоликул; O-ооцит



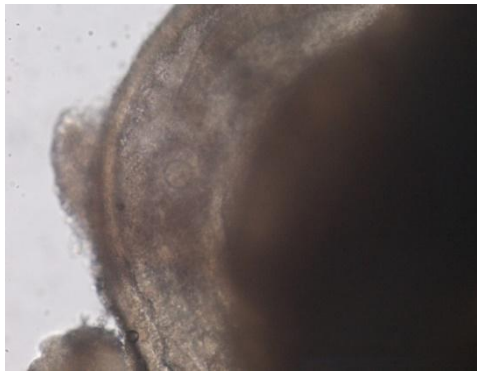
Фигура 17 Експресия на MT-ND 1 при хормонално третиран животни(I опитна група)-1) в ооцит на третичния фоликул (стрелка)(x10);2) в ооцит и тека клетки на ранен антрален фоликул; 3) в тека клетки във вторични фоликули (x40);4) в тека клетките на вторичен фоликул (x 100)

Нашите резултати показват експресия на протеина MT-ND 1 във всички овариални структури в трите групи. В същото време, се отбелязва преразпределяне на интизитета на сигнала в овариалните структури на опитните групи. В контролната група се наблюдава силно изразен сигнал в гранулозните и тека клетки на антралните фоликули. Сигналът в ооцити е по-слаб. При визуализацията на белтъка MT-ND 1 при хормонално третираните животни от I опитна група се открива силен сигнал в тека клетките още на ранен стадий от развитието на фоликула, в гранулозните клетки има слаба реакция в сравнение с контролната група.

При хормонално третираните животни от II опитна група се отбелязва най-силен сигнал в ооцити от ранен стадий на развитието на фоликули, както и в интерстициалните клетки, обкръжаващи растящи фоликули.

6. Суперовулаторен отговор и епигенетична зрелост на ооцити

При двете опитни групи чрез хормонално стимулиране, беше предизвикано узряване на множество фоликули и овулация на ооцитите от тях. При II опитна група ефектът на суперовулацията беше съчетан с биодобавката Провит Е 10% Супер.

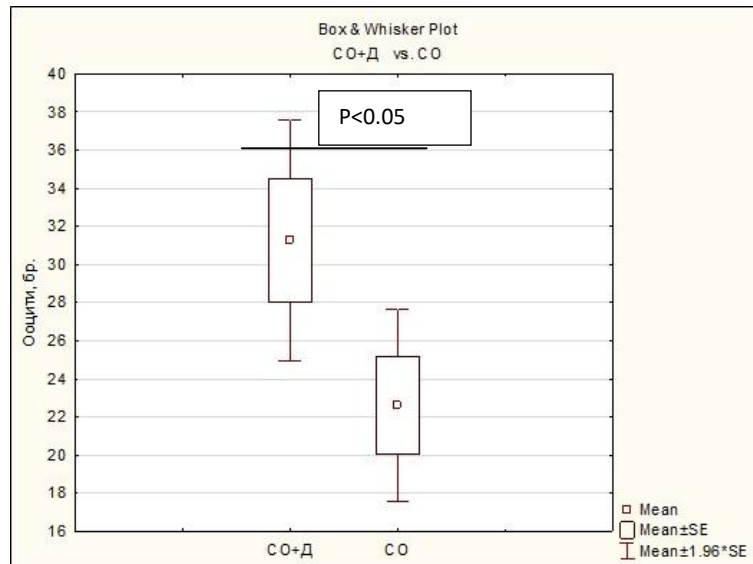


Фигура 18. Ампула (инфундибулум) на мишка издута с ооцити. Микрофотография от стереомикроскоп x20



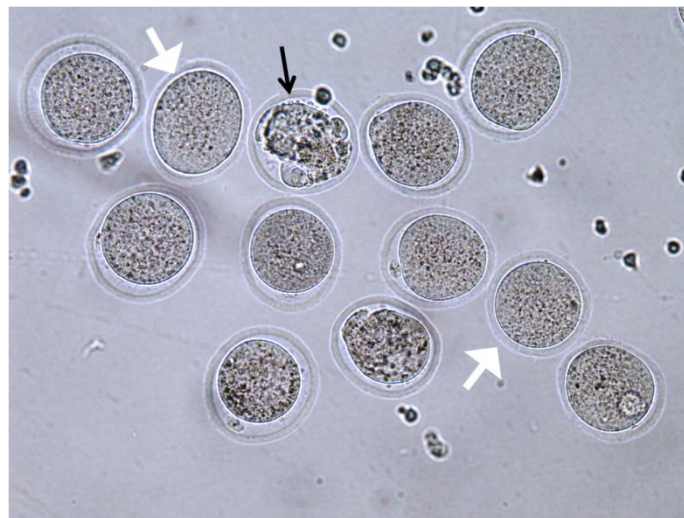
Фигура 19. Зрял овулирал ооцит с полярно телце (стрелка) x 40

От суперовулираните мишки в двете опитни групи бяха получени зрели ооцити. Доказателство за зрелостта на овулиралите ооцити се явява наличието на екструдирано I полярно телце (Фигура 19). Количеството на добите ооцити по групи са представени на фигура 20. Броят на получените ооцити при II опитна група беше достоверно по-висок (31.3 ± 12.4 срещу 22.6 ± 9.9 ; $P=0.044$)



Фигура 20. Влияние на добавка върху броя на овулирани ооцити след процедура за супреовулация. CO+Д - II опитна група, суперовулирани и хранени с добавка мишки; CO – I опитна група, суперовулирани мишки.

Следва да се отбележи, че не всички добити ооцити бяха с добро качество. Сред добитите ооцити бяха наблюдавани единични фрагментирани и незрели ооцити, без екструдирано полярно телце (фигура 21). Процентът на незрели ооцити и такива с морфологични нарушения варираше между 8-14 %.

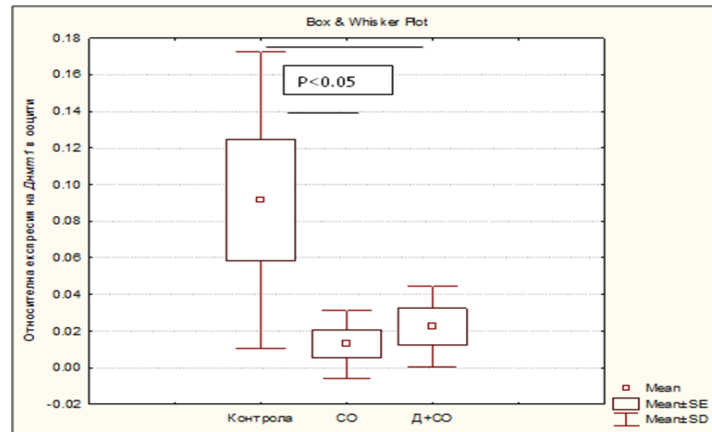


Фигура.21 Ооцити, получени след суперовулация. Черна стрелка показва фрагментиран ооцит, бяла – незрял ооцит без екструдирано полярно телце. 20x

Хормоналната стимулация е една основна стъпка за успешен протокол за суперовулацията. Обаче, изследвания от последните години показват и негативния ефект на гонадотропините върху яйчниците. Според екипа на Castillo et. al., (2012) овариалната хиперстимулация може да предизвика нарушения в яйцеклетки или да доведе до тъй наречения синдром на празния фоликул (фигура 9 /3).

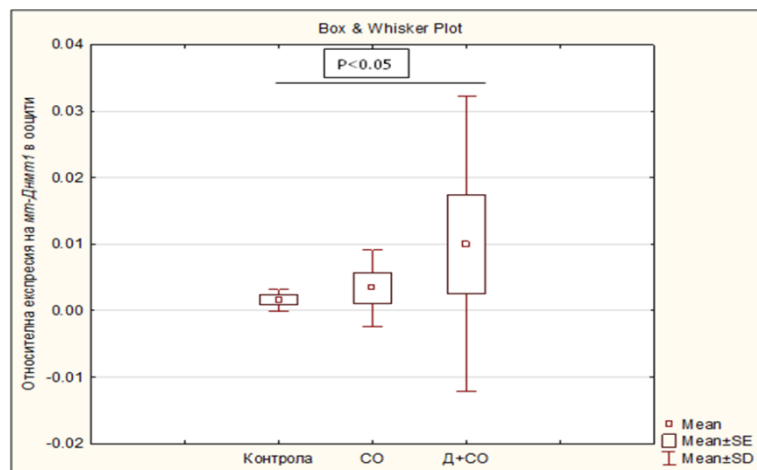
Епигенетичната зрелост на овулиралите ооцити се оценяваше по нивата на mRNA транскрипти на гени, отговорни за DNA метилиране - Dnmt 1, mtDnmt 1, Dnmt 3a

и Dnmt 3b . За контрола бяха използвани ооцити, получени директно чрез дисекция на яйчниците на мишки от контролната група.



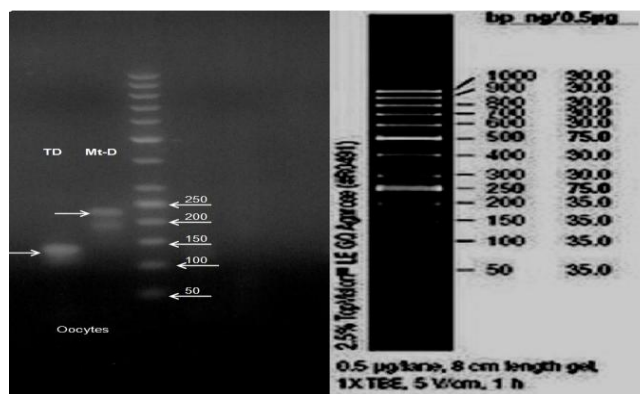
Фигура 22. Експресия на mRNA транскрипти на Dnmt 1 в ооцити при контролна, I и II опитна групи

Експресията на Dnmt 1 при I и II опитни групи е достоверно ($p=0.042$) по-ниска в сравнение с контролната група. В група, третирана с добавка, се отбелязва тенденция за двойно по-висока експресия на Dnmt 1 при сравнение с група подложена само на супреовулация (фигура 22).



Фигура 23 Експресия на mRNA транскрипти на mt-Dnmt 1 при контролната, I и II опитна групи

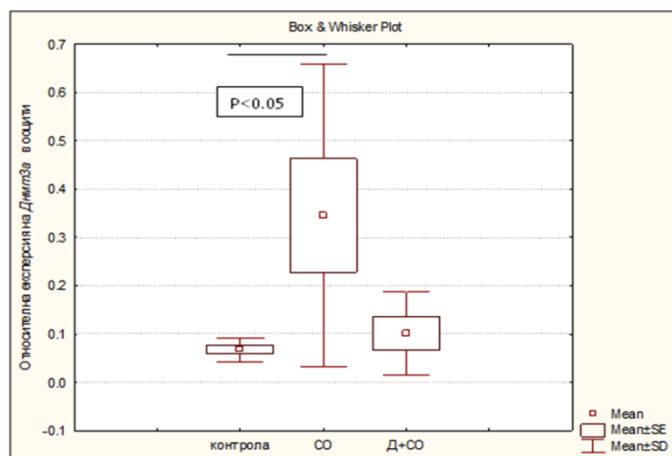
При сравнение между групите сме установили, че експресията на mt-Dnmt 1 в ооцити при опитните групи е по-висока от контролната, като при третираната с добавка тази разлика е достоверна. Въпреки че, между двете опитни групи няма достоверни различия, има ясно изразена тенденция за повишена експресия в ооцитите на група, третирана с добавка (фигура 23).



Фигура 24 Електрофоретичен анализ на получените продукти от PCR на ооцити с праймери за транскрипти на t-Dnmt1 и mt-Dnmt1.

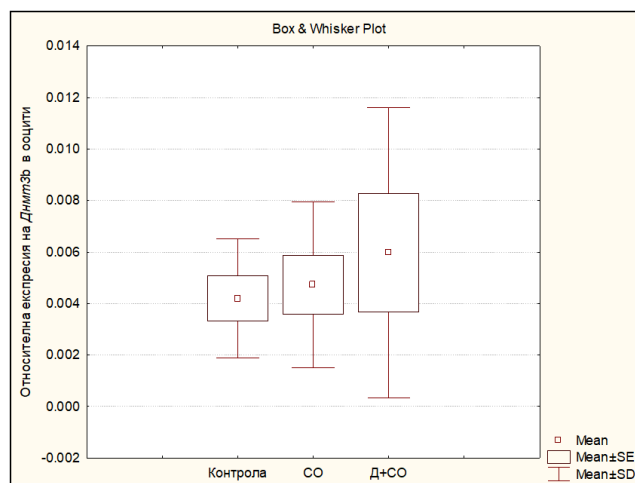
След проведената електрофореза на получените продукти от PCR анализа, се установи наличието на два продукта с различен размер от базови двойки, които отговарят на t-Dnmt1 -150 bp и на mt-Dnmt1 - 240 bp (фигура 24). Тези данни са в съгласие с резултатите на Shock et al., (2011).

Промените в експресия на DNA- метилтрансферази 3a и 3b са представени на фигури 25 и 26.



Фигура 25. Експресия на mRNA транскрипти на Dnmt 3a при контролната, I и II опитна групи

Достоверно по-висока експресия на Dnmt 3a беше забелязана в овулиралите ооцити от I опитна група при сравнение с контролата.



Фигура 26. Експресия на mRNA транскрипти на Dnmt 3b при контролната, I и II опитна групи

Експресията на Dnmt 3b транскрипти не се различава достоверно между трите групи. Трябва да се отбележи тенденция за по-активна експресия на Dnmt 3b в овулиралите ооцити на животни, получавали биодобавката.

Таблица 5. Корелационни връзки между експресия на транскриптите на DNA метилтрансферази в ооцити от яйчниците на контролните животни. * - P<0.05

	Dnmt3a	Dnmt3b	Dnmt1	mt-Dnmt1
	R, корелационен коефициент на Пирсън			
<u>Dnmt3a</u>		0.38	0.49	-0.64*
<u>Dnmt3b</u>	0.38		0.95*	-0.4
<u>Dnmt1</u>	0.49	0.95*		-0.3
<u>mt-Dnmt1</u>	-0.64*	-0.4	-0.3	-

В контролната група при ооцити са установени тесни положителни корелационни връзки между експресията на Dnmt3a и mt-Dnmt1, както и между Dnmt3b и Dnmt1.

Таблица 6. Корелационни връзки между експресия на транскриптите на DNA метилтрансфери в овулирани оцити на животни от I опитна група. * - P<0.05

	Dnmt3a	Dnmt3b	Dnmt1	mt-Dnmt1
	R, корелационен коефициент на Пирсън			
<u>Dnmt3a</u>		0.71*	0.91*	0.83*
<u>Dnmt3b</u>	0.71		0.89*	0.91
<u>Dnmt1</u>	0.91	0.89		0.98*
<u>mt-Dnmt1</u>	0.83	0.91	0.98	-

В ооцитите на животни, подложени на хормонална стимулация се забелязват тесни корелации между експресията на всички DNA- метилтрансфери.

Таблица 7 Корелационни връзки между експресия на транскриптите на ДНК метилтрансфери в овулирани оцити на животни от II опитна група. * - P<0.05

	Dnmt3a	Dnmt3b	Dnmt1	mt-Dnmt1
	R, корелационен коефициент на Пирсън			
<u>Dnmt3a</u>		0.99*	-0.12	-0.21
<u>Dnmt3b</u>	0.99*		-0.42*	-0.19
<u>Dnmt1</u>	-0.12	-0.42*		0.4
<u>mt-Dnmt1</u>	-0.21	-0.19	0.4	-

В овулиралите оцити на животни, хранени с добавка, тясна положителна корелация се наблюдава само между експресията на ДНК метилтрансфери 3a и 3b. Установена е отрицателна корелация със средна степен между експресията на Dnmt3b и Dnmt1.

Получените от нас данни за високи нива на транскриптите на Dnmt1 в контролата, се дължат на факта, че в тази група има наличие на множество незрели оцити в различен стадий на развитие, които са добити директно чрез дисекция от яйчника. Докато при I и II опитна група с помощта на хормоналното третиране бяха овулирани големи пулове от зрели яйцеклетки, при които процесът на метилирането би трябвало да е завършен. Свидетелство за това са достоверно по-ниски нива на mRNA транскрипти на Dnmt1 и в двете групи при сравнение с контролната. По-високо

ниво на *Dnmt1* транскрипти в ооцити на третираната с добавка група, при сравнение с I опитна група, е свидетелство за наличие на по-голямо количество овулирани незрели ооцити. Добивът на ооцити при тези животни е по-висок, и е много вероятно, че не са всички ооцити минали успешно през метилиране, което в естествени условия, без допълнително хормонално стимулиране, приключва към момента на овулацията. Наличието на транскриптите на *Dnmt 3a* и *Dnmt 3b* в овулиралите ооцити след хормонална стимулация в по-голямо количество от контролната група е още едно потвърждение на активността на метилационни процеси в тези ооцити. Корелационният анализ показва, че експресията на DNA-метилтрансферази е взаимозависим процес. Особено ясно това проличава при животни, подложени на хормоналната стимулация, където са установени достоверно тесни положителни корелации между експресията на всички изследвани DNA- метилтрансферази. Промяна на знака на корелацията при третираните с добавка животни позволява да се предположи активизиране на компенсаторни механизми на регулацията на експресия на DNA- метилтрансферази в ооцити.

Съгласно данни на *Shock et al.*, (2011) *Dnmt 1* се свързва с *mtDNA* и се открива в митохондриалния матрикс. Този изомер се нарича *mtDnmt 1*. Нашите резултати за първи път показаха наличието на транскрипти от този изомер в миши ооцити. Динамиката на *mtDnmt1* транскрипти в ооцити беше различна в изследваните групи животни. Въпреки че, при двете опитни групи не се наблюдаваха достоверни разлики в техните нива, те са били по-високи от нивото на *mtDnmt 1* транскрипти в контролната група. Известно е, че при узряване на яйцеклетки се увеличава броя на митохондриите (*Cotterill et al.*, 2013) и, приемайки факта, че този ензим се свързва с *mtDNA* (*Shock et al.*, 2011), то една от вероятните причини за по-високите нива на *mtDnmt1* транскрипти в опитните групи може да бъде по-голям брой митохондрии в зрелите ооцити в сравнение с незрели от контролната група. Също така, данните за увеличената експресия на *mtDnmt 1* в ооцити на опитните животни кореспондират с наблюдаваната от нас засилена експресия на митохондриален протеин *MT-ND 1* в ооцитите на тези животни.

7. Митохондриалния статус в яйчници, супреовулаторен отговор и епигенетична зрелост на ооцити.

Соматичните клетки при бозайници съдържат приблизително от 1000- 10 000 копия на митохондриална ДНК (*Y.M. Xie et. al.*, 2015), докато яйцеклетките съдържат 100 000-200 000 митохондрии, като всяка митохондрия разполага само от 1–10 копия митохондриална ДНК (*Cummins*, 2001).

Според екипа на *Cotterill et al.*, (2013) при различните стадии на развитие на фоликулите се наблюдава и различно количество на брой на копия *mtDNA* в ооцитите, като има тенденция на увеличаване от първични към антрални фоликули, тъй като се променя потреблението на АТР, в зависимост от реорганизацията на клетки по време на растеж и узряване на яйцеклетките (*Cotterill et al.*, 2013). В ранните стадии на узряване яйцеклетките се свързват с кумулусните клетки, които осигуряват метаболитна помощ на яйцеклетките във фоликула като доставят АТР и пируват (*Van Blerkom*, 2004; *J. Mao et al.*, 2012). Нашите резултати за интензивна експресия на митохондриален протеин *MT-ND 1* в кумулусните и гранулозните клетки на фоликули в яйчниците на контролните животни са в подкрепа на данните за водещата роля на тези клетки в обезпечаване на енергията на растящия ооцит при нормална фоликулогенеза (*Mao et. al.*, 2012). Интензитетът на експресията на *MT-ND 1* в ооцитите от контролната група не беше висок. Митохондриалният геном е много по-уязвим от ядрения за бързо

натрупване на вредни мутации по време на живот на отделните индивиди (Wallace et al., 1988; Saganuma et al., 1993; Wallace et al., 1995), въпреки това той остава консервативен в процеса на еволюцията на животните (Saccone et al., 2002). Редица учени поддържат хипотезата, че прехвърлянето на задълженията по осигуряване на енергията върху кумулсните клетки (Van Blerkom, 2004), невисоката митохондриална активност в ооцитите и наличието в тях на региони с неактивни митохондрии (Wilding et al., 2001; Van Blerkom et al., 2002), са стъпки, насочени към строго ограничаване на натрупвания на вредни мутации в митохондриалния геном по време на оогенеза (Cao et al., 2007; Dumollard et al., 2007, Zhang et al., 2008). Интегритетът на митохондриалния геном в ооцити е от особено значение, защото те, а не сперматозоидите предават митохондриите си на потомството. Резултатите от настоящата работа показваха, че външната хормонална намеса увеличава интензитета на експресията на митохондриален протеин MT-ND 1 в ооцити на третираните животни от ранен стадий на развитието на фоликула. Вземайки предвид, че MT-ND 1 е част от комплекс I, чиято функция се заключава в прехвърляне на електрони от NADH към дихателната верига, което е от съществена важност за окислителното фосфолиране в митохондриите на ооцити от бозийниците, и осигуряване на енергия за генерерирането на ATP (Wai et al., 2010; Vinothkumar et al., 2014), можем да предположим, че хормоналното третиране тласка към засилване на работата на митохондрии в самите ооцити. При условията на нормална фоликулогенеза кумулсните клетки са от съществено значение за развитието на ооцита, тъй като те доставят до ооцита повечето метаболити и енергия, които са му нужни за неговото развитие (Cecchino, G. et al., 2015; Dumesic et al., 2015). ATP се произвежда от митохондриите в кумулсните клетки и се предава на ооцита (Downs, 1995; Eppig et al., 2005; Xie et al., 2016).

При прилагане на протокол за суперовулация, по-високата от нормална концентрация на FSH принудително подтиква по-голям пул от яйцеклетки към узряване, което изисква по-високи енергийни нива, за да може да се осъществи качествено узряване на ооцитите. Това кореспондира с нашите данни за по-висок интензитет на експресия на митохондриалния протеин MT-ND 1 в тека клетки и ооцити в яйчниците на животни, подложени на супреовулация в двете експериментални групи. При животни, получавали добавка, интензитетът на експресията на този протеин в ооцитите е визуално по-висок. Вероятно, наличието на антиоксиданти в добавката, позволява по-добро регулиране на количеството на свободните радикали и по този начин засиленото производство на ATP не представлява заплаха за mtDNA, каквато има в тяхното отсъствие.

Интересен е резултатът относно наблюдаваната от нас понижена експресия на MT-ND 1 в гранулозните и кумулсните клетки при животни, третирани за суперовулация, както и при тези, при които тя е била съчетана с приема на биодобавка. Редица автори отбелязват, че хормоните, използвани при овариална стимулация, не са напълно безвредни за женската репродуктивна система (Baker et al., 2015; Chappel, 2013). Requena et al., (2016) установи, че гонадотропини могат да предизвикват апоптоза в кумулусни клетки и процентът на уврежданията варира в зависимост от вида на използвания гонадотропин за овариална стимулация. Следователно, различните протоколи биха могли да имат значително въздействие върху производството на митохондриална енергия и в крайна сметка, върху качеството на яйцеклетките (Dell'Aquila et al., 2009; Eichenlaub-Ritter et al., 2011). Установеният от нас, макар и недостоверен, по-висок брой копия mtDNA в кумулсните клетки на третираните с добавка животни, вероятно свидетелство за включване на компенсаторен механизъм за

осигуряване на по-голямо количество на необходимия протеин MT-ND 1 в кумулсните клетки на тези животни.

Резултатите на Xie et al., (2016) дават индиректно потвърждение за това, че намаляване на брой копия на mtDNA в миши кумулусни клетки, води до засилване на експресията на гени, кодирани в mtDNA. В синхрон с тази находка са нашите резултати за повишен брой копия mtDNA в кумулусни клетки на третирани животни при понижена експресия на митохондриален ND1.

В нашата опитна постановка беше заложено само еднократно провеждане на процедурата за супероулуация. Към опита беше сформирана и втора група, при която еднократното хормонално стимулиране беше комбинирано с хранителна добавка с биологично активни вещества в нея, за да се провери работната хипотеза: дали приемът на хранителна добавка ще промени параметрите на митохондриалния статус в яйчниците, и като следствие от това да повлияе върху броя и качеството на овулирани ооцити. Нашите резултати, относно супероулуаторния отговор на I опитна група кореспондират с границите на този параметър, характерни за линията мишки Swiss white и са в съответствие с получените резултати от Swann (2014). При II опитна група (хормоналното третиране, комбинирано с прием на добавка) е получен по-висок брой на овулирани яйцеклетки. Косвено потвърждение за този резултат са и най-ниските стойности на брой копия mtDNA на клетка в яйчниците в сравнение с другите групи, поради намаляване броя на фоликули със зреещи ооцити.

Доказано е, че полифенолът резвератрол увеличава пулове от растящи фоликули, брой и качество на получените ооцити и засилва производство на АТР в ооцити ин виво и ин витро (Abdulhasan et al., 2017; Chen et al., 2010; Sugiyama et al., 2015; Takeo et al., 2014). Изпитаната от нас добавка съдържа фитогенна компонента артишок, която е богата на полифеноли. Нашите данни за увеличаване на брой, включени в фоликулогенеза примордиални фоликули, както и за активността на експресия на митохондриален протеин в яйчниците на третирани с добавка животни, кореспондират с горепосочените данни за позитивно влияние на растителните полифеноли върху овариалната функция. (Liu et al., 2013; Takeo et al., 2014).

Въпреки непрекъснато усъвършенстване на процедурите за супероулуация, все още не може да се говори за стабилността на успехите на АРТ. Редица автори отбелязват, че супероулуацията води до намаляване на интрафоликуларен естрадиол и нивата на прогестерон (Assey et al., 1994), до преждевременно съзряване на ооцитите с ултраструктурните деформации и функционални аберации (Hasegawa et al., 2015), и до нарушения в метилиране на импринтните гени (Fortier et al., 2008; Market-Velker et al., 2010). Съгласно нашите резултати процентът на незрели и увредени ооцити варираше от 8 до 14 %, което е в подкрепа на данните на Lee et al., (2017), който съобщава дори за 26% такива ооцити при супероулирани мишки.

Нашето изследване беше насочено към проучване на спорен въпрос, относно епигенетичната зрелост на ооцити, получени след супероулуацията. При проучване на транскрипти на ДНК-метилтрансфери в миши ооцити на различни стадии от развитие Lucifero et al., (2007) установяват, че най-активната транскрипция е характерна за стадий - зародишен везикул, и се намалява към ооцит в стадий -. метафаза II. Допълнително, анализът на метилирането на редица гени, в този период, дава основание на тези автори да заключат, че де ново метилирането в постнаталните ооцити при мишки завършва към момента на оулуация (Lucifero et al., 2004; Lucifero et al., 2007). На база тези данни ние построихме нашата хипотеза, че ако нивото на

транскрипти на ДНК-метилтрансферази клони към нулата, значи в овулиралите ооцити е завършено епигенетично репрограмане. Като за контрола бяха използвани ооцити на различен стадий от развития, събрани чрез директна дисекция на яйчника. Получените резултати показаха високи нива на транскриптите на Dnmt1 в контролна група ооцити, което потвърждава наличие на незрели, намиращи се на различен стадий на развитие ооцити и е доказателство, че де ново метилирането е в процес. Достоверно по-ниски нива на Dnmt1 в овулиралите ооцити е доказателство за приключване на процеса де ново метилиране в тези ооцити. Двойно по-високо ниво на Dnmt1 в ооцити на животни, третирани с добавка в сравнение със суперовулирана група, вероятно е свидетелство за това, че при преждевременно съзряване на по-голям брой ооцити, не всички пълноценно завършват епигенетичното репрограмане. Резултатите ни за наличие на транскриптите Dnmt3a и Dnmt3b в овулиралите ооцити потвърждават това предположение.

В нашата работа представихме за пръв път данни за наличие в ооцити на транскрипти на изомер на Dnmt1- mt Dnmt1. Според резултати на екипа на Shock et al. (2011) този изомер се открива в митохондриалния матрикс и е свързан с метилиране на мтДНК. По данни на други автори, в митохондриалната фракция се установява Dnmt3a. Съгласно нашите резултати са установени по-високи нива на mtDnmt1 транскрипти в ооцити от суперовулираните животни. Възможната причина за това е увеличеният брой на митохондрии, което кореспондира с резултатите на Cotterill et al. (2013), доказващи, че с узряването на яйцеклетките, пропорционално расте и броят на митохондриите. От друга гледна точка, увеличената експресия на mtDnmt1 в ооцити на опитните животни кореспондира с наблюдаваната от нас засилена експресия на митохондриален протеин МТ-ND 1 в ооцитите. Съгласно Balinang (2012), повишената експресия на mtDnmt1 е необходима за позитивна или негативна регулация, чрез метилиране на активността на ензимите от дихателната верига на митохондрия с цел недопускане на повишено над допустимото производство на свободните радикали. Данните от нашия опит за повишените равнища на mtDnmt1, както и на Dnmt3a, която също откриват в митохондриалния матрикс (Chestnut et al., 2011), вероятно, свидетелстват за включване на защитен механизъм срещу повишената активност на митохондрии, провокирана от хормоналното третиране.

Резултатите от настоящата работа потвърждават важната роля на митохондриите в различните овариални структури за процеса на узряването на ооцити. Прилагане на биоактивни компоненти, увеличаващи ефективността на митохондриалния апарат, могат да подобрят успеха на суперовулацията.

Заклучение

Външната хормонална намеса във фоликулогенезата драстично променя естествения процес на съзряване на ооцита. Последствията от тази промяна невинаги могат да се регистрират незабавно, и не са предсказуеми за предстоящото развитие на ембрионите и на организма от ооцити, получени след суперовулация. Още по-сериозни проблеми възникват при многократното хормонално стимулиране на яйчници, което освен че променя функционалността им, се отразява негативно и върху целия женски организъм. Тъй като възможността за масово получаване на гамети от стволови клетки е все още далечна перспектива, а в рутинната практика на АРТ основен метод за получаването на ооцити за ин витро фертилизация остава суперовулацията. Това прави особено актуални изследванията на молекулярните механизми на промяната в яйчници

и зреещи ооцити след външна хормонална намеса, и на възможностите за получаване на голям добив качествени ооцити след еднократно третиране.

Настоящата работа е опит за изясняване на влиянието на подхранването на животни с комбинирана биодобавка преди прилагане на протокол за суперовулация върху митохондриалния статус на яйчници, върху суперовулаторния отговор, и върху епигенетичната зрелост на овулиралите ооцити.

Получените резултати доказват работната хипотеза, че суперовулацията, съчетана с добавката, притежаваща изразени антиоксидантни свойства, оказва влияние върху митохондриалния статус в яйчниците. Експресията на митохондриален протеин MT-ND1, един от най-важните елементи в комплекс 1 на дихателната верига, се засилва в тека клетките и ооцитите още от стадий вторичен фоликул, докато при контролните животни експресията на този протеин е по-активна в гранулозните клетки и в тека клетките на стадий антрален фоликул, при намалена експресия в самия ооцит. Освен това, в групата, третирана с добавката, се наблюдава увеличена експресия на MT-ND1 в интерстициалните клетки, заобикалящи развиващите се първични фоликули. Все още е неясен механизмът на пренасочване митохондриалната активност от гранулозните клетки към ооцитите на експерименталните животни, което го прави актуална проблематика за последващи изследвания.

Интересни са и резултатите за промяната на броя копия mtDNA на клетка в яйчниците при различните групи изследвани животни. Най-малък такъв брой се регистрира при суперовулирани мишки, третирани с добавката. Интересен е въпросът, дали това е свързано само с по-големия брой на напуснали яйчниците ооцити, или е компенсаторен механизъм към по-значителната митохондриална активност в клетките. Първоначалните резултати показват негативна корелация между тези параметри. Ясно се забелязва (макар непотвърдена статистически) тенденция за по-голям брой копия mtDNA в кумулсните клетки на третираните с добавка животни, съчетана с най-ниската експресия на митохондриален протеин MT-ND1 в тези клетки. Допълнително изследване би могло да провери тази хипотеза. Изследванията на кумулсните клетки придобиват особена актуалност, защото тези клетки се оказват най-достъпният материал за регистриране качеството на ооцитите в хуманната медицина.

Получените резултати доказват позитивното въздействие на подхранването с използваната биодобавка върху добива овулирала ооцити, който е достоверно по-висок в експерименталната група. Хистологичният анализ на яйчниците показва, че при тези животни много рядко се срещат нарушения на фоликулогенезата като атрезия и "празен" фоликул, каквито често се регистрират при животните, подложени на суперовулация.

Комплексната характеристика на качеството на получените ооцити, и най-вече на потенциала им за развитие, може да бъде предмет на бъдещо изследване.

Регистрираната от нас транскрипция на гени в овулиралите ооцити, отговорни за ензимите, участващи в процеса на метилиране на DNA, поражда повече въпроси, отколкото дава отговори за епигенетичното репрограмане в ооцити, съзряващи в условията на външна хормонална намеса, съчетана (или не) с биодобавка. Тази транскрипция би могла да сигнализира за незавършени метилационни процеси, което предполага изучаване на възможните следствия от това.

Перспективни са и съвместните изследвания с колеги, проучващи метаболизма на биоактивните компоненти в организма. Получените от нас данни за значителна вариация на изследваните параметри при третираните с добавка животни, правят актуален за изследване проблема за индивидуалната реакция на организма към

биоактивните компоненти, в това число намирането на подходящи биомаркери за отчитане на индивидуалната реакция на репродуктивната система с цел разработване на индивидуални протоколи за суперовулация, в които хормоналното третиране може да се съчетае с биоактивни добавки.

Актуално и перспективно е и издирването на нови биоактивни компоненти, способни да стимулират фоликулогенезата, без да редуцират качеството на получените ооцити.

Изводи

1. Подхранването на животни с комбинираната биодобавка в продължение на 30 дни, преди прилагането на протокол за суперовулация, увеличава броя на овулиралите ооцити, което кореспондира с наличието на по-голямо количество жълти тела в яйчниците на животните от третираната група.

2. В яйчниците на суперовулираните животни се наблюдава по-малък брой копия митохондриална ДНК в клетките, в сравнение с контролната група, като най-малките стойности са при животни, третирани с добавката, което е косвено доказателство за по-големия брой овулирала ооцити при тези животни.

3. Хормоналното третиране води до пренасочване на активната експресия на митохондриалния протеин MT-ND1 в яйчниковите структури на опитните животни в сравнение с контролата: при двете суперовулирани групи се наблюдава засилване на експресията в тека клетките и ооцитите от стадий вторичен фоликул при намалена експресия във фоликуларните клетки. Допълнително, при третираните с добавка животни е установена изразена експресия на този протеин в интерстициални клетки, заобикалящи растящи фоликули.

4. В овулиралите ооцити беше установена достоверно по-ниска експресия на mRNA транскрипти на Dnmt1 с 90% и 80% за I и II групи, съответно в сравнение с незрелите ооцити, което потвърждава факта, че метилационните процеси затихват в овулиралите ооцити.

5. Транскрипцията на mtDnmt 1 е достоверно по-висока в овулиралите ооцити на животни от II опитна група, а на Dnmt3a - в овулиралите ооцити на животни от I опитна група в сравнение с незрелите ооцити, което предполага наличието сред овулиралите ооцити на такива с незавършено епигенетично репрограмане.

6. Установени са тесни достоверни корелации между експресията на mRNA транскрипти на изследваните ДНК метилтрансферази в ооцити.

Научни приноси на дисертационния труд

- Доказано е, че подхранването на животни с комбинирана биодобавка преди провеждане на суперовулация, има като резултат - по-голям брой овулирала ооцити.

- Получени са нови данни, относно пренасочване на активната експресия на митохондриалния протеин MT-ND1 в овариалните структури, като резултат от хормоналното третиране и съчетанието му с биодобавка;
- Получени са нови данни за ефекта на протокола за суперовулацията, съчетан с биодобавка, върху транскрипцията в ооцити на DNA метилтрансферази (Dnmt1, mtDnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b) – ензими, отговорни за епигенетичното репрограмизиране на ооцита;
- За първи път са показани резултати за налична експресия в ооцити на mRNA транскрипти на изомерната форма на Dnmt1, свързана с митохондрии – mtDnmt1. Засилването на експресията ѝ в ооцитите на опитните групи кореспондира с наблюдавания по-висок интензитет на експресията на протеин MT-ND1 в ооцити на различен стадий от развитието на фоликули при тези животни.

Приложен принос на дисертационния труд

Подхранването с комбинирана биодобавка, съдържаща минерали, витамин Е и артишок, може да се препоръча като техника за подобряване протокола за суперовулация при лабораторни животни, с цел увеличаване добива на ооцити. Също така добавката може да бъде прилагана и във ветеринарната практика при селскостопански животни, подложени на протоколи за суперовулация или синхронизация на еструс преди осеменяването, с цел: редуциране негативно влияние на външна хормонална намеса върху овариалната функция

Публикации на научни резултати по темата на дисертацията

1. Ваня Младенова, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова. 2016, Хистологично проучване на суперовулирани оварии на мишки, приемали биодобавка. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 19 (2): 23-36.
2. Ваня Младенова, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова. 2017, Ефект от добавка обогатена с витамин Е и суперовулация върху параметри на половия апарат при мишки. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 20(2): 89 -99.
3. Mladenova, V., Abadjieva, D., Shumkis, A., Shimkine, A., Kistanova, E. 2017. Changes in the expression of the aromatase and superovulatory response in mice treated with the feed additive provit E10% super. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 23 (2): 304-309, ISSN- 1310-0351, SJR: 0.223

Представяне на резултати по темата на дисертацията на научни форуми

1. Младенова В. Епигенетични промени, свързани с биоактивните хранителни добавки, The Sixth workshop “Experimental Models and Method in biological research”, May 12 – 14, 2015, Sofia - доклад.

2. Младенова В. Биологично активни компоненти на растението артишок и приложението им в ветеринарна и хуманна медицина. Десета работна среща “Биологична активност на металите, синтетични съединения и природни продукти“, 17-19 ноември, 2015, София- доклад.
3. Ваня Младенова, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова. Хистологично проучване на суперовулирани оварии на мишки, приемали биодобавка. 19-та юбилейна научна конференция с международно участие „ЕкоМаунтин-2016 “ на тема: „Екологични проблеми на планинското земеделие“, 26.05. - 27.05.2016, гр. Троян –доклад
4. Ваня Младенова. Ефектът на биодобавка върху успеха на суперовулацията и качеството на получените ооцити при бели лабараторни мишки. Интердисциплинарен докторански форум 6-7 април 2016, София -доклад
5. Mladenova, V., Abadjieva, D., Shumkis, A., Shimkine, A., Kistanova, E. Changes in the expression of the aromatase and superovulatory response in mice treated with the feed additive provit E10% super.-7-ма Годишна научна конференция с международно участие “Иновации в Аграрната наука за ефективно земеделие”- 29-30.09.2016-гр. Шумен доклад
6. V.Mladenova, D.Abadjieva,E.Kistanova,Expression of the DNMT1 and mtDNMT1 in the oocytes of superovulated mice supplemented by Cynara scolymus and vitamin E. Докторантски симпозиум ” Молекулярна Биология-нови хоризонти”, 6-7 април 2017,София. -доклад
7. Ваня Младенова, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова. Ефект от добавка обогатена с витамин Е и суперовулация върху параметри на половия апарат при мишкил 20-та юбилейна научна конференция с международно участие „ЕкоМаунтин-2017“ на тема: ”Екологични проблеми в планинското земеделие” , 18-19 май 2017 г, гр. Троян доклад
9. Mladenova V., Abadjieva D., Kistanova E. Mitochondrial DNA copy number and expression of the mitochondrial encoded NADH dehydrogenase 1(MT-ND1) in the ovary of superovulated mice. 15th Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, 2018. - постер