

ОЦІНКА ВПЛИВУ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛУ НА РІВЕНЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ПАЦІЄНТОК ІЗ СИНДРОМОМ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ*

ВСТУП

Нещодавні дослідження фізіопатології безпліддя подружжя показали, що однією з його причин може бути оксидативний стрес (ОС) [1]. Згідно з визначенням, ОС є дисбалансом між продукуванням радикальних форм кисню та системами антиоксидантного захисту. Це патологічний стан, зумовлений порушенням фізіологічної рівноваги між продукуванням та виведенням хімічних окисників. Слід уточнити, що окисники – це продукти нормальної метаболічної діяльності, які за умови фізіологічних концентрацій виконують дуже важливі функції на клітинному і системному рівнях.

ОС відіграє роль на всіх стадіях репродукції людини. Радикальні окисники беруть участь у формуванні цілого спектра репродуктивних функцій, таких як визрівання ооцита, яєчниковий стероїдогенез, функції жовтого тіла, в процесах запліднення, ембріонального розвитку і вагітності [1], а також у розвитку деяких патологій, що спричиняють безпліддя.

Виявляється, ОС бере участь у патогенезі та подальших ускладненнях синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ). Як відомо, СПКЯ – це синдром системного ураження не лише репродуктивної сфери, він характеризується рядом метаболічних порушень, які добре досліджені впродовж останніх років та залишаються об'єктом дослідження за даними міжнародної літератури.

З усе більшою очевидністю постає факт головної ролі інсулінорезистентності і компенсаторної гіперінсулінемії в патогенезі СПКЯ [2], у зростанні ризику розвитку в пацієнок дисліпідемії, артеріальної гіпертензії, порушеної толерантності до глюкози, цукрового діабету 2-го типу і серцево-судинних захворювань [3]. До деяких реакцій інсуліну можуть залучатися медіатори низької молекулярної ваги, наприклад, інозитол фосфоглікан, відомий також як інсуліновий медіатор або «другий провідник» [4], крім того, деякі факти свідчать про те, що недостатність D-хіро-інозитулу (DXI), який містить інозитол фосфоглікан [5], та/або порушення метаболізму DXI може спровокувати появу перших ознак інсулінорезистентності.

Попередні дослідження показали, що пероральне вживання DXI жінками з СПКЯ підвищує активність інсуліну, покращуючи овуля-

торну функцію і знижуючи артеріальний тиск, концентрацію андрогенів у сироватці крові та тригліцеридів у плазмі крові [6].

Фармакологічних засобів, які використовуються для лікування СПКЯ, дуже багато, але впродовж тривалого періоду часу терапія зосереджувалася на супресії андрогенів та індукції овуляції. Пізніше більшість результатів досліджень, навпаки, показали що, покращивши за допомогою фармакотерапії чутливість до інсуліну і змінивши стиль життя, можна відновити овуляцію, збільшити кількість вагітностей і зменшити прояви СПКЯ. Новинкою стало введення у клінічне використання інозитулу [7] – молекули, яка продемонструвала свою ефективність у багатьох сферах [8, 9] і гідна особливої уваги.

Інозитол бере участь у кальцій-залежних процесах міжклітинної сигналізації і регулює різні клітинні процеси, серед яких клітинна диференціація та проліферація за участю кальцію [10]. Крім того, він контролює секрецію деяких ендокринних залоз, серед яких підшлункова залоза і яєчники. На репродуктивному рівні ці міжклітинні шляхи сигналізації беруть участь у формуванні кортикальних гранул, у блокуванні поліспермії, у здійсненні мейозу та в активуванні клітинного циклу, який у подальшому визначає ембріональний розвиток [11].

Метою роботи була оцінка ефекту від застосування DXI на стан ОС у фолікулярній рідині жінок із СПКЯ. Для цього ми маркували 3-(N-малеїмідопропіоніл)-біоцитином (МПБ) вільні групи тіолів протеїнів фолікулярної рідини, щоб проаналізувати, чи змінюються вони після використання інозитулу. Дослідження було виконане за допомогою двомірного електрофорезу та авідин-блоттингу. Таким чином, ми порівняли рівень ОС у фолікулярній рідині жінок, хворих на СПКЯ, які отримували та не отримували DXI, використовуючи вільні групи тіолів, які перед цим було визначено маркерами ОС.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пацієнтки

Дослідження проводилося у Діагностичному центрі лікування подружнього безпліддя при Клініці акушерства та гінекології Лікарняного університетського об'єднання Сенезе та в Медичному центрі репродук-

В. ДЕ ЛЕО

кафедра Молекулярної медицини та розвитку Центру з дослідження безпліддя подружжя Наукового інституту Сієни, м. Сієна, Італія
ORCID: 0000-0001-8522-9370

А. ЛА МАРКА

Клініка акушерства та гінекології Наукового інституту Модени, м. Модена, Італія

В. КАППЕЛЛІ

кафедра Молекулярної медицини та розвитку Центру з дослідження безпліддя подружжя Наукового інституту Сієни, м. Сієна, Італія

та інші автори

Контакти:

Vincenzo de Leo

email: vincenzo.deleo@unisi.it

* Адаптований переклад статті, опублікованої в журналі *Minerva Ginecologica* 64.6 (2012): 531–8. PMID: 23232537

тології при Університетській поліклініці міста Модена (Італія). Було залучено 30 хворих на СПКЯ – кандидаток на застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) через одночасне безпліддя чоловіка. Діагноз СПКЯ базувався на критеріях діагностики синдрому СПКЯ, прийнятих на Роттердамському консенсусі. 20 із 30 залучених у дослідження жінок впродовж трьох місяців отримували DXI (препарат хірофол (Chirofol) виробництва LJ Pharma) по 500 мг двічі на добу перед процедурою стимуляції овуляції. Фізичні та демографічні характеристики пацієнток наведені в таблиці.

Таблиця. Характеристики включених у дослідження пацієнток та результати процедури стимулювання овуляції і циклу штучного запліднення (метод інтрацитоплазматичного введення сперматозоїда пацієнткам, яким призначали DXI+гонадотропін та лише гонадотропін). Наведені середні значення показників. Статистична значущість вважалась достовірною при $p < 0,05$.

Характеристики	DXI + гонадотропін	Гонадотропін
Кількість	20	10
Вік	33,8 ± 4,6	32,9 ± 4,4
Індекс маси тіла	24,5 ± 5,13	25,6 ± 3,9
Паління (%)	25	20
Загальне дозування гонадотропіну	1850 ± 400	2050 ± 450
Ооцити, отримані в жінки	9,36 ± 3	9,50 ± 2,6
Ооцити M II	8,1 ± 2	7,00 ± 1,6
Інсеміновані ооцити	7,35 ± 1,5	4,87 ± 1,2
Фертилізовані ооцити	6,67 ± 1,3	4,62 ± 1,3
Ембріони, що розвивалися	5,40 ± 1,4	4,50 ± 1,1

Стимуляція овуляції

Процедура стимуляції овуляції (контрольована стимуляція яєчників) була проведена за допомогою рекомбінантного гонадотропіну (препарат гонал-Ф виробництва компанії Merck Serono, пурегон, МСД) у змінному дозуванні по 100–200 МО з 2–3-го дня менструації, яку було індуковано за допомогою застосування прогестину впродовж мінімум 5 діб. Дозування гонадотропіну згодом було змінено відповідно до оваріальної відповіді та згідно з даними ендовагінального УЗД. Коли розміри фолікула досягли 14 мм, здійснювали введення антагоніста гонадотропін-релізінг-гормону (препарати оргалутран, МСД, цетротид виробництва компанії Merck Serono) до дня «запуску» процесу овуляції. «Запуск» процесу овуляції досягався за допомогою хоріонічного гонадотропіну (препарат гоназі виробництва компанії IBSA), коли було виявлено щонайменше 3 фолікули розмірами > 16 мм. Забір ооцита здійснювали за допомогою трансвагінального УЗД через 34–36 год після «запуску» овуляції.

Фолікулярну рідину головного фолікула кожної з пацієнток було використано для дослідження ОС. Після виділення ооцитів рідина була пропущена через центрифугу на 3100 хг впродовж 10 хв, гранули згорнулися, а надосадкову рідину заморозили при температурі 80 °С до її використання. Для цього було відібрано фолікулярну рідину жовто-золотистого кольору без кров'янистих слідів.

Аналіз ОС

Фолікулярну рідину було інкубовано до розчину МПБ (виробництва компанії Sigma Aldrich) 1 мМ до Tris-HCl 15 мМ, рН 6,8 при 100 °С на 5 хв. Після цього концентрацію протеїну маркованих зразків було визначено за допомогою біцинхонінової кислоти (виробництва компанії Sigma Aldrich) згідно з рекомендаціями виробника. 10 мкг протеїну, маркованого МПБ, було суспензовано в буфері для зразка та розділено за допомогою електрофорезу на гелі поліакриламідну за методом, який описано Laemmli [12]. Розподільний гель для системи Mini Protean (виробництва компанії BioRad Microsciences) було приготовано з використанням прокладок товщиною не більше 1 мм до фінального співвідношення акриламід/бісакриламід 6–16%. Для фільтрації був використаний концентруючий гель із концентрацією акриламід/бісакриламід 3%.

Ізоелектричне фокусування було здійснено відповідно до того, як це описали А. Görg та В. Bjellqvist [14] у стрічці приготованого гелю (виробництва компанії GE Healthcare Biosciences) з акриламід/бісакриламід із нелінійним градієнтом рН 4–7, де вони були співполімеризовані з іммобілізуючим агентом (виробництва компанії GE Healthcare Biosciences). На кожній стрічці було розміщено 30 мкг загального протеїну для подальшого вестерн-блоту.

Фокусування було здійснено при температурі 18 °С з використанням системи ізоелектричного фокусування Ettan IPGphor (виробництва компанії Amersham Biosciences) за наступним протоколом: 1) регідратація при 0 Вольт (В) впродовж 12 год при 18 °С; 2) 30 В – впродовж 30 хв; 3) 200 В – впродовж 30 хв; 4) проходження по градієнту від 200 В до 3500 В впродовж 30 хв; 5) 3500 В – впродовж 30 хв; 6) проходження по градієнту від 3500 В до 8000 В впродовж 30 хв; 7) 8000 В – впродовж 1 год 30 хв до досягнення рівноваги (приблизно 6000 вольт-годин загалом).

Після ізоелектричного фокусування стрічки було врівноважено у розчині, який містив 8 М сечовини, 2% додецилсульфату натрію, 30% гліцерину, треки бромфенолового блакитного, Tris-HCl 0,05 М, рН 6,8 та 2% дитіотреїтолу впродовж 12 хв; після цього їх було інкубовано на 5 хв до того самого розчину разом із 2,5% йодоацетамідом (алкілюючий агент, який зв'язується із групами -SH, що попередньо були зменшені дитіотреїтолом для уникнення їх вивільнення) замість дитіотреїтолу.

Методики, використані для електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ) були описані Laemmli [12]. Двовимірним гелевим електрофорезом для стрічок був гель Mini-PRO-TEAN TGX (виробництва компанії Bio-Rad) з градієнтом 4–20%. При постійних 25 мА/гель та 500 В методика була проведена за допомогою бромфенолового блакитного. Протеїни, виділені за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу було перенесено на нітроцелюлозну мембрану на ніч із використанням системи Mini TransBlot System (виробництво компанії Bio-Rad Microsciences), як описано J. Towbin et al. [15].

Після лаважу в буфері TBST (сольовому буфері, який містить 2% Твін20) було інкубовано нітроцелюлозу протягом 1 год разом із авідином, кон'югованим із пероксидазою, яку розчинили у співвідношенні 1:40 000 у буфері TBST, який мі-

стять 1% знежиреного сухого молока. Після завершення інкубування нітроцелюлозу було піддано фінальному лаважу в буфері TBST, після чого марковані протеїни були виділені за допомогою проявляючих агентів Immun-Star HRP.

Результати були отримані за допомогою пристрою для хемілюмінесцентного визначення (виробництва компанії Bio-Rad Microsciences), з дотриманням інструкцій компанії-виробника і за допомогою проявника зображення ChemiDoc (Bio-Rad Microsciences). Зображення були отримані та оброблені за допомогою програми Quantity One R7.2 (Bio-Rad Microsciences), після чого було здійснено напівкількісний аналіз за допомогою програми PD Quest 7.4 (Bio-Rad Microsciences).

Статистичний аналіз

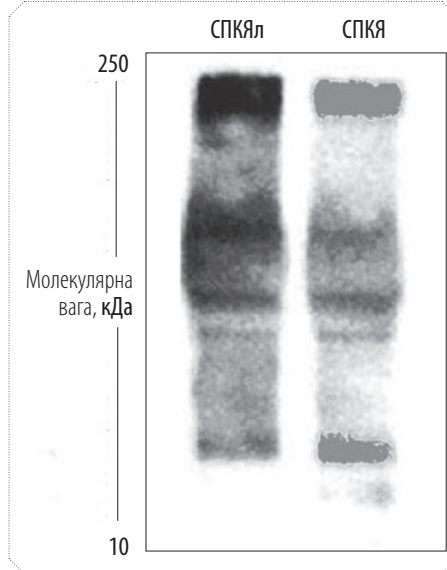
Статистичні показники обчислювались за допомогою відповідного програмного забезпечення із використанням t-критерію Ст'юдента для перевірки рівності показників і тесту хі-квадрат. Статистично достовірною вважалась значущість при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Базові характеристики пацієнок, розділених на дві групи (які отримували та не отримували DXI), наведено в таблиці вище. Зокрема, пацієнтки обох груп мали зіставний вік, індекс маси тіла та зіставне відношення між віком і тютюновим навантаженням. Значущі відмінності в середніх результатах циклів ДРТ були відсутні.

Еквівалентна кількість фолікулярного протеїну, який належав до двох груп і був маркований МПБ, було розділено за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу і перенесено на нітроцелюлозу. Як показано на рисунку 1, розподілення протеїну в двох групах відбувалося за схожими схемами, які відрізнялися за інтенсивністю.

В одному випадку були виявлені значущі відмінності в загальній інтенсивності в маркуванні групи -SH, протеїни фолікулярної рідини було ізольовано за допомогою двовимірного електрофорезу та вестерн-блоту для того, щоб проаналізувати детально такі розходження. Вони аналізувалися як напівкількісно, так і якісно.



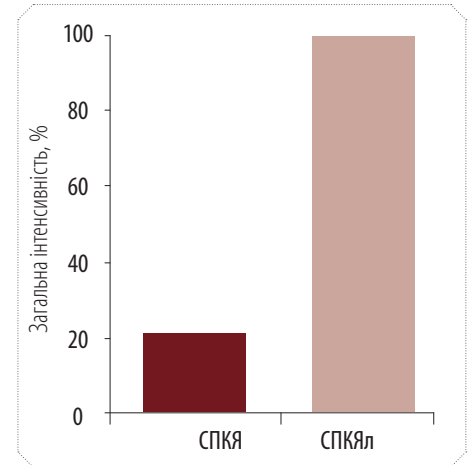
Рисунку 1. ДСН-ПААГ електрофорез і вестерн-блот фолікулярної рідини, маркованої МПБ, в жінок із СПКЯ, які отримували DXI (СПКЯл) та не отримували DXI (СПКЯ)

Якісний аналіз показав, що у двовимірному блоті групи жінок із СПКЯ, які отримували DXI (рис. 2А), багато показників розподілилися на відмітці рН 4–7. Вони мали молекулярну масу приблизно від 75 до 15 кДа включно. Група жінок із СПКЯ, які не отримували DXI (рис. 2Б), мала меншу кількість показників, молекулярна маса яких наближалася до 75 та 37 кДа.

Для напівкількісного аналізу було проаналізовано загальну інтенсивність показників двовимірного блоту. Загальні показники інтенсивності в групі жінок із СПКЯ, які отримували DXI, були взяті за 100%.

Як видно з графіку на рисунку 3, інтенсивність розподілення протеїну в групі СПКЯ дорівнює 22,2%, у групі СПКЯл – 100%. Цей результат свідчить про те, що у фолікулярній рідині хворих на СПКЯ після застосування DXI виробляються нові типи протеїнів із вільними

маркованими групами -SH, які відсутні в жінок, котрі не застосовували DXI.



Рисунку 3. Схематичне зображення загальної інтенсивності категорій СПКЯ та СПКЯл

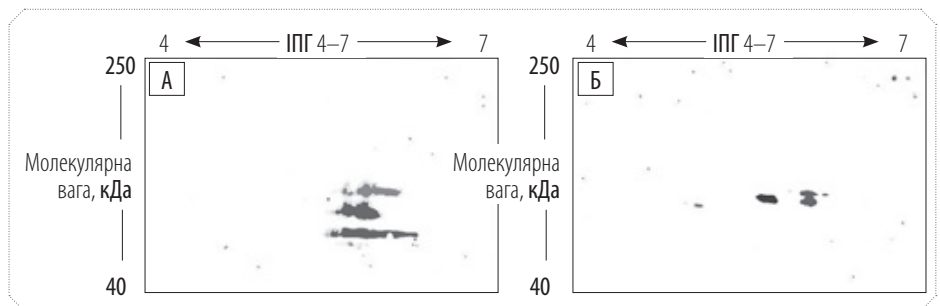
Стосовно якості овуляції було помічено, що в жінок, які використовували DXI у схемі з гонадотропіном, вироблялися ооцити кращої якості порівняно з жінками, які отримували лише гонадотропін.

Параметрами для оцінювання вважались цитоплазматичні та екстрацитоплазматичні диморфізми, а також комплекс ооцит-корона-кумулус [16]. Серед ооцитів, відібраних у жінок, які отримували DXI + гонадотропін, було більше (70%) тих, які належали до I ступеня, що відповідає кращій якості. У контрольній групі 60% відібраних ооцитів належали до II ступеня і 40% – до I ступеня (див. таблицю).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Отримані результати в першу чергу демонструють антиоксидантний ефект DXI на рівні фолікулярної рідини в жінок із СПКЯ, які пройшли курс ДРТ.

Добре відомо, які оксидативні ушкодження можуть заподіяти ради-



Рисунку 2А, Б. Двовимірний електрофорез та вестерн-блот фолікулярної рідини пацієнок з СПКЯ, які отримували DXI (А), та жінок з СПКЯ, які не отримували DXI (Б)
ІПГ – іммобілізований поліакриламідний гель

кальні окисники, у найгірших випадках – це ушкодження та компрометування функцій усіх структур і клітинних макромолекул із подальшою клітинною смертю [17]. Насправді небезпечна не стільки наявність вільних радикалів, скільки їх концентрація. У нормі організм може протистояти радикалам, запускаючи серію захисних механізмів, які перешкоджають появі радикальних молекул або знищують їх, перш ніж вони пошкодять життєві компоненти клітини [18].

Найосновнішими мішенями вільних радикалів є ліпіди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи і протеїни. Внаслідок окисднативних реакцій протеїни зазнають протеолізу, структурних модифікацій, абераційних агрегацій, окисдування бічних ланцюгів амінокислот. На очищених протеїнах було показано, що вільні радикали повністю знищують їхні хіміко-фізичні властивості. Крім того, було зареєстровано як зміну ізоелектричної точки (спричинену окисдацією групи R амінокислот через карбонілювання) [19], так і дефект молекулярної ваги, що пов'язано з формуванням інтрамолекулярних зв'язків або розщепленням протеїну на пептидні фрагменти [20]. Деякі амінокислоти більш чутливі до атаки вільних радикалів, як, наприклад, цистеїн і метіонін, що містять атоми сірки [21]. Характеристикою тіолів є їхня здатність до оборотної окисдації, яка відбувається таким чином, що вони визначаються як ключові елементи в механізмі, який бере участь в окислювально-відновлювальній рівновазі.

Дослідженню ролі та зміни рівнів вільних радикалів за умови здоров'я та хвороби у людини перешкоджає важкість методології оцінювання рівнів маркерів ОС за біологічними зразками [22]. Крім того, пряма оцінка рівня ОС біологічних рідин дуже складна через відсутність клітинних елементів, які їх виробляють, і тому радикали виникають та розпадаються постійно. Але вплив вільних радикалів може бути оцінений опосередковано, наприклад, завдяки протеомному аналізу, який виявляє окисднативну шкоду за рахунок протеїнів.

Так, було проведено дослідження, яке показало ефективність кількісного аналізу вільних SH-груп фолікулярних протеїнів для оцінки впливу ОС на фолікулярну рідину [23]. Вплив вільних радикалів на репродуктивний потенціал є причиною інтенсивних досліджень, які проводяться в усьому світі [24], і не дивлячись на численні успіхи у сфері репродуктивної біології, якість ооцитів залишається проблемою у сфері жіночої фертильності. Вважають, що однією з причин недостатньої якості ооцитів є саме ОС. З цієї точки зору фолікулярну рідину можна розглядати як «біологічне вікно», яке показує всі метаболічні та гормональні процеси, що проходять у мікросередовищі, де відбувається визрівання ооцитів, та дозволяє прогнозувати результати деяких параметрів, наприклад, запліднення, ембріонального поділу та коефіцієнту фертильності [25].

У фолікулярному мікросередовищі, окрім клітин зернистого шару, факторів росту і стероїдних гормонів, можна зустріти також лейкоцити, макрофаги та цитокіни, які є продуктами дії вільних радикалів [26]. Крім того, було продемонстровано експресію антиоксидантних ензимів на клітині, які виробляють стероїди (клітини зернистого шару, текальні та клітини жовтого тіла) [27]. Це доводить, що ооцит у фолікулі зазнає природного впливу ОС [1], і що антиоксидантні ензими, наявні у фолікулярній рідині, допомагають ооциту захищатися від окисднативних ушкоджень [28].

Численні дослідження довели, що рівень цукру в крові збільшує кількість вироблених вільних радикалів лейкоцитами периферичної крові [29]. Отриманий в результаті цього ОС може викликати прозапальний стан, який провокує інсулінорезистентність і гіперандрогенію в жінок, які страждають на СПКЯ [30].

Було запропоновано багато варіантів лікування СПКЯ, але досі з них не було обрано оптимальний з точки зору безпліддя. Антиоксидантний ефект різних речовин визначається на основі знань щодо різних типів клітин і тканин, але наразі недостатньо інформації про вплив вільних радикалів на якість ооцитів, зокрема при СПКЯ, через який показники неуспішних циклів ДРТ є досить високими.

ВИСНОВКИ

У цьому дослідженні було проаналізовано вплив DXI на стан ОС фолікулярної рідини в жінок, хворих на СПКЯ. Завдяки маркуванню групи вільних тіольних протеїнів МПБ було виявлено шкоду, завдану фолікулярним протеїнам, а також встановлено обернену пропорційність між маркуваннями та ОС.

Отримані результати свідчать про меншу кількість SH-груп вільних протеїнів, а саме 77,8% у фолікулярній рідині хворих на СПКЯ, які не застосовували DXI, порівняно з жінками, які його застосовували. Ці результати підтвердили, що в жінок із СПКЯ зростає рівень окислення тіольних груп фолікулярних протеїнів, який можна співвіднести з прогресивним збільшенням ОС цієї системи, і що використання DXI пацієнтками, які страждають на цю патологію, здатне зменшити окислення тіольних груп.

Результати нашого дослідження дозволяють припустити, що ОС може бути однією з причин морфологічних ушкоджень на початку визрівання ядра (під час мейозу) і цитоплазми під час перивуляторного періоду, який визначає якість ооциту [31]. Крім того, можна припустити, що DXI не лише зменшує гормональні та метаболічні аномалії, але й відновлює інтрафолікулярне середовище, здатне протистояти руйнівним ефектам ОС, покращуючи таким чином якість ооцитів та, як наслідок, ембріона, що позитивно позначається на показниках імплантації.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Asuncion, M., Calvo, R.M., San Millan, J.L., et al. "A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain." *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000): 2434–8.
- Azziz, R., Woods, K.S., Reyna, R., et al. "The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population." *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004): 2745–9.
- Goodarzi, M.O., Quinones, M.J., Azziz, R., et al. "Polycystic ovary syndrome in Mexican-Americans: prevalence and association with the severity of insulin resistance." *Fertil Steril* 84 (2005): 766–9.
- Stein, I.F., Leventhal, M.L. "Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries." *Am J Obstet Gynecol* 29 (1935): 181–91.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome." *Fertil Steril* 81 (2004): 19–25.
- Kalro, B.N., Loucks, T.L., Berga, S.L. "Neuromodulation in polycystic ovary syndrome." *Obstet Gynecol Clin North Am* 28 (2001): 35–62.
- Rebar, R., Judd, H.L., Yen, S.S., et al. "Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome." *J Clin Invest* 57 (1976): 1320–9.
- Berger, M.J., Taymor, M.L., Patton, W.C. "Gonadotropin levels and secretory patterns in patients with typical and atypical polycystic ovarian syndrome." *N Engl J Med* 320 (1989): 559–65.
- Dahlgren, E., Johansson, S., Lindstedt, G., et al. "Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long term follow up focusing on natural history and circulating hormones." *Fertil Steril* 57 (1992): 505–13.
- Talbott, E., Guzik, D., Clerici, A., et al. "Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome." *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 15 (1995): 821–6.
- Dunaif, A. "Insuline resistance and polycystic ovary syndrome: mechanism and implication for pathogenesis." *Endocr Rev* 18 (1997): 774–800.
- Amowitz, L.L., Sobel, B.E. "Cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome." *Endocrinol Metab Clin North Am* 28 (1999): 439–58.

SCHONEN

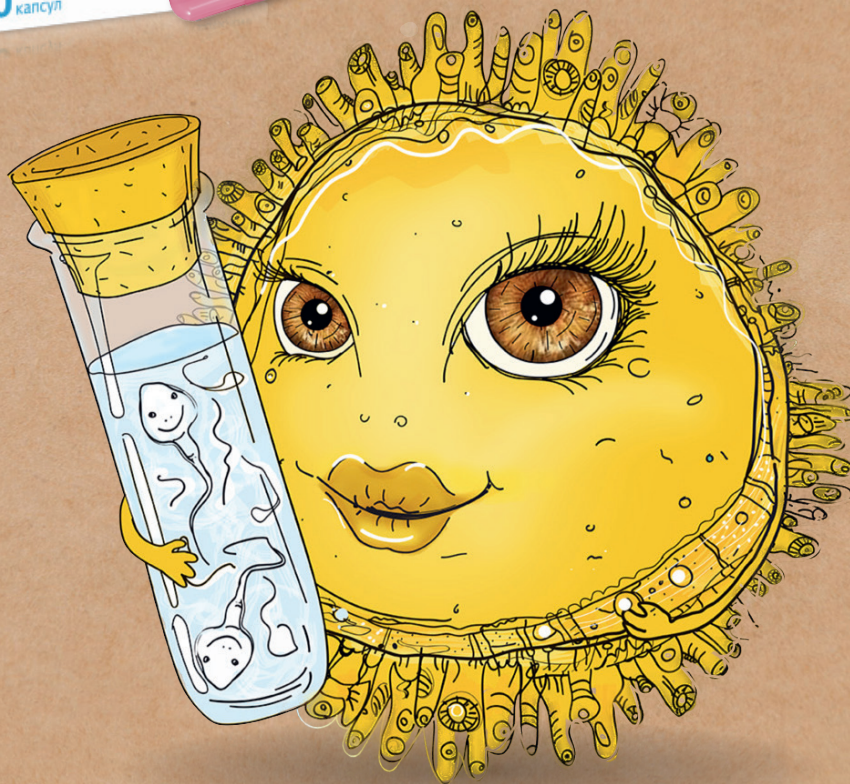


Protalis
IVF

Проталіс АйВіЕф

сприяє

покращенню якості ооцитів



А Я ТАКА ФЕРТИЛЬНА...

13. Franks, S., McCarthy, M.L., Hardy, K. "Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors." *Int J Androl* 29 (2006): 278–85.
14. Chang, R.J., Nakamura, R.M., Judd, H.L., Kaplan, S.A. "Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease." *J Clin Endocrinol Metab* 57 (1983): 356–9.
15. Ciaraldi, T.P., El-Roeiy, A., Madar, Z., et al. "Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 75 (1982): 577–83.
16. Marsden, P.J., Murdoch, A., Taylor, R. "Severe impairment of insulin action in adipocytes from amenorrhoeic subjects with polycystic ovary syndrome." *Metabolism* 43 (1994): 1536–42.
17. Morales, A.J., Laughlin, G.A., Butzow, T., et al. "Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common distinct features." *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996): 2854–9.
18. Velazquez, E., Acosta, A., Mendoza, S.G. "Menstrual cyclicity after metformin therapy in polycystic ovary syndrome." *Obstet Gynecol* 90 (1997): 392–5.
19. De Leo, V., Musacchio, M.C., Morgante, G., et al. "Metformin treatment is effective in obese teenage girls with PCOS." *Hum Reprod* 21 (2006): 2252–6.
20. Nestler, J.E., Jakubowicz, D.J., Evans, W.S., Pasquali, R. "Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome." *N Engl J Med* 338 (1998): 1876–80.
21. De Leo, V., La Marca, A., Ditto, A., et al. "Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with PCOS." *Fertil Steril* 72 (1999): 282–5.
22. Larner, J. "Multiple pathways in insulin signalling: fitting the covalent and allosteric puzzle pieces together." *Endocr J* 2 (1994): 167–71.
23. Evans, J.L., Heymann, C.J., Goldfine, I.D., Gavin, L.A. "Pharmacokinetics tolerability, and fructosamine lowering effect of a novel, controlled release formulation of alpha-lipoic acid." *Endocr Pract* 8 (2002): 29–35.
24. Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., et al. "Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP activated protein kinase." *Nat Med* 10 (2004): 727–33.
25. Zache, M.M., Caputo, L., Filippis, S., et al. "Efficacy of myo-inositol in the treatment of cutaneous disorders in young women with polycystic ovary syndrome." *Gynecol Endocrinol* 25 (2009): 508–13.
26. Papaleo, E., Unfer, V., Baillargeon, J.P., et al. "Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction." *Gynecol Endocrinol* 23 (2007): 700–3.
27. Papaleo, E., Unfer, V., Baillargeon, J.P., Chiu, T.T. "Contribution of myo-inositol to reproduction." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 147 (2009): 120–3.
28. Gerli, S., Papaleo, E., Ferrari, A., Di Renzo, G.C. "Randomized, double blind placebo-controlled trial: effects of myo-inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 11 (2007): 347–54.
29. De Leo, V., La Marca, A., Petraglia, F. "Insuline lowering agents in the management of PCOS." *Endocr Rev* 24 (2003): 633–67.
30. Glueck, C.J., Streicher, P., Wang, P. "Treatment of polycystic ovary syndrome with insulin lowering agents." *Expert Opin Pharmacother* 8 (2002): 1177–89.
31. Franks, S. "Genetic and environmental origins of obesity relevant to reproduction." *Reprod Biomed Online* 12 (2006): 526–31. □

ОЦІНКА ВПЛИВУ D-ХІРО-ІНОЗИТОЛУ НА РІВЕНЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ПАЦІЄНТОК ІЗ СИНДРОМОМ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ

В. Де Лео, кафедра молекулярної медицини та розвитку Центру з дослідження безпліддя подружжя Наукового інституту Сієни, м. Сієна, Італія

А. Ла Марка, Клініка акушерства та гінекології Наукового інституту Модени, м. Модена, Італія

В. Каппеллі, кафедра Молекулярної медицини та розвитку Центру з дослідження безпліддя подружжя Наукового інституту Сієни, м. Сієна, Італія та інші автори

Нещодавні дослідження патофізіології безпліддя показали, що оксидативний стрес (ОС) може бути одним з його чинників. ОС — це порушення балансу між активними формами кисню та системами антиоксидантного захисту. Вочевидь, ОС відіграє важливу роль майже в усіх фазах розмноження людини. Фактично активні форми кисню залучені до модуляції широкого спектру репродуктивних функцій, таких як дозрівання ооцитів, овариальний стероїдогенез, функції жовтого тіла, до процесів запліднення, розвитку ембріона та перебігу вагітності, а також до проявів низки захворювань, які спричиняють безпліддя. Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) останнім часом пов'язують з посиленням ОС, часто в зв'язку з типовими метаболічними порушеннями при прояві синдрому. Інозитол — це внутрішньоклітинний медіатор інсуліну, який широко застосовується як терапевтичний препарат при СПКЯ. В той час як основна його дія відбувається через сенсibiliзацію інсуліну, мало відомо про можливий вплив інших пов'язаних із СПКЯ порушень, таких як оксидативний стрес.

Мета дослідження. Оцінка впливу D-хіро-інозитулу на стан ОС у фолікулярній рідині жінок із СПКЯ.

Матеріали та методи. Фолікулярну рідину отримали в жінок із діагнозом СПКЯ в ході застосування допоміжних репродуктивних технологій. Жінки застосовували D-хіро-інозитол (по 500 мг 2 рази на день) впродовж 3 місяців перед циклом штучного запліднення *in vitro*. Стан ОС оцінювався шляхом маркування вільних тиольних груп білків у фолікулярній рідині 3-(N-малеїмидопропіоніл)-біоцитином.

Результати. У фолікулярній рідині жінок з СПКЯ, які не отримували D-хіро-інозитол, була менша кількість вільних тиольних груп білків, що склала 77,8%, у порівнянні з пацієнтками, які отримували D-хіро-інозитол.

Висновок. Отримані результати свідчать, що в жінок із СПКЯ підвищене окислення тиольних груп білків у фолікулах пов'язане з прогресуючим посиленням ОС, а застосування D-хіро-інозитулу, ймовірно, знижує окислення тиольних груп.

Ключові слова: синдром полікістозних яєчників, інозитол фосфоглікан, фолікулярна рідина, оксидативний стрес, стимуляція овуляції.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ D-ХИРО-ИНОЗИТОЛА НА УРОВЕНЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОК С СИНДРОМОМ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

В. Де Лео, кафедра молекулярной медицины и развития Центра по исследованию бесплодия супругов Научного института Сиены, г. Сиена, Италия

А. Ла Марка, Клиника акушерства и гинекологии Научного института Модены, г. Модена, Италия

В. Каппелли, кафедра молекулярной медицины и развития Центра по исследованию бесплодия супругов Научного института Сиены, г. Сиена, Италия и другие авторы

Последние исследования патофизиологии бесплодия показали, что оксидативный стресс (ОС) может быть одним из его факторов. ОС — это нарушение баланса между активными формами кислорода и системами антиоксидантной защиты. Очевидно, ОС играет важную роль почти во всех фазах размножения человека. Фактически активные формы кислорода привлечены к модуляции широкого спектра репродуктивных функций, таких как созревание ооцитов, овариальный стероидогенез, функции желтого тела, к процессам оплодотворения, развития эмбриона и течения беременности, а также вовлечены в проявления ряда заболеваний, вызывающих бесплодие. Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) в последнее время связывают с усилением ОС, часто в связи с типичными метаболическими нарушениями при проявлении синдрома. Инозитол — это внутриклеточный медиатор инсулина, который широко применяется в качестве терапевтического препарата при СПКЯ. В то время как основное его действие происходит путем сенсibiliзации инсулина, мало известно о возможном влиянии других связанных с СПКЯ нарушений, таких как оксидативный стресс.

Цель исследования. Оценка влияния D-хино-инозитола на состояние ОС в фолликулярной жидкости женщин с СПКЯ.

Материалы и методы. Фолликулярную жидкость получили у женщин с диагнозом СПКЯ в ходе применения вспомогательных репродуктивных технологий. Женщины применяли D-хино-инозитол (по 500 мг 2 раза в день) в течение 3 месяцев перед циклом искусственного оплодотворения *in vitro*. Состояние ОС оценивалось путем маркировки свободных тиольных групп белков в фолликулярной жидкости 3-(N-малеимидопропионил)-биоцитином.

Результаты. В фолликулярной жидкости женщин с СПКЯ, не получавших D-хино-инозитол, было меньшее количество свободных тиольных групп белков, которые составили 77,8%, по сравнению с пациентками, получавшими D-хино-инозитол.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют, что у женщин с СПКЯ повышенное окисление тиольных групп белков в фолликулах связано с прогрессирующим усилением ОС, а применение D-хино-инозитола, вероятно, снижает окисление тиольных групп.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, инозитол фосфогликан, фолликулярная жидкость, оксидативный стресс, стимуляция овуляции.

EVALUATION OF THE TREATMENT WITH D-CHIROINOSITOL ON LEVELS OF OXIDATIVE STRESS IN PCOS PATIENTS

V. De Leo, Department of Molecular and Developmental Medicine, Couple Infertility Center, University of Siena, Siena, Italy

A. La Marca, Clinic for Obstetrics and Gynecology, Modena Scientific Institute, Modena, Italy

V. Cappelli, Department of Molecular and Developmental Medicine, Couple Infertility Center, University of Siena, Siena, Italy and other authors

Recent studies on the pathophysiology of infertility have shown that oxidative stress (OS) can be one of the causal factors. The OS is, by definition, an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defense systems. It seems that oxidative stress plays an important role in almost all phases of human reproduction. In fact, reactive oxygen species are involved in the modulation of a large spectrum of reproductive functions such as oocyte maturation, ovarian steroidogenesis, corpus luteum functions and are involved in the processes of fertilization, embryo development and pregnancy, but also in some diseases that cause infertility. Polycystic ovary syndrome (PCOS) has recently been associated with increased oxidative stress, often put in relation to the syndrome's typical metabolic disorder. Inositol is an intracellular mediator of insulin, currently much used as a therapeutic agent in PCOS. While its main action takes place via insulin sensitization, little is known about the possible effects of other disorders, such as oxidative stress, associated with PCOS.

Purpose of study was therefore to assess the effect of D-chiro-inositol on the state of oxidative stress in the follicular fluid of women with PCOS.

Materials and methods. Follicular fluids were obtained from women who have turned to the Center for Diagnosis and Treatment of Sterility of Obstetrics and Gynecology of the University Hospital of Siena and Modena diagnosed with PCOS. The women were treated with D-chiro-inositol (500 mg x 2 per day) for 3 months before being subjected to cycles of *in vitro* fertilization. The state of oxidative stress was measured by marking of free thiol groups of proteins in the follicular fluid with 3-(N-maleimidopropionyl)-biocytin.

Results. In our study we obtained a lesser presence of free thiol protein groups equal to 77.8% in the follicular fluid of women with PCOS not treated with D-chiro-inositol, compared to patients who instead have carried out such treatment.

Conclusions. These results suggest that in PCOS women there is an increase of the oxidation of thiol groups of proteins follicular, correlated to a progressive increase of the oxidative stress and that the administration of D-chiro-inositol in patients with this disease seems to reduce the oxidation of thiol groups.

Keywords: polycystic ovary syndrome, inositol phosphoglycan, follicular fluid, oxidative stress, ovulation stimulation.