

УДК 618.11-006.2-06-078.839-092.4/94.618.177-07:618.145-007.61

© Колектив авторів, 2011.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ АРОМАТАЗИ У ГРАНУЛЬОЗНИХ КЛІТИНАХ ЯЄЧНИКІВ У ЖІНОК З КЛОМІФЕН-РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ СИНДРОМУ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ

А. В. Чайка, О. М. Носенко, Г. М. Яковець, І. О. Могільовкіна, С. М. Корниенко, Д. Кіріловас, М. Бергстром, Е. Бергстром-Петтерман, К. Карлстром, Т. Нессен

*НДІ медичних проблем сім'ї (директор – проф. А. В. Чайка),
Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, м. Донецьк.*

EXPERIMENTAL STUDY OF AROMATASE ACTIVITY IN GRANULOSIS CELLS IN WOMEN WITH OVARIAN CLOMIFENE-RESISTANT FORM OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

A. V. Chaika, O. M. Nosenko, G. M. Yakovets, I. O. Mogilevkina, S. M. Kornienko, D. Kirilovas, M. Bergstrom, E. Bergstrom-Petterman, K. Carlstrom, T. Nessen

SUMMARY

In the article there are experimental results aromatase activity in granulosa cells of the ovary. It is proved that, in ovarian follicular fluid from patients with clomiphene-resistant form of polycystic ovary syndrome, there is increased concentration of androstendione in a 6,68 times. This leads to reduced activity of the enzyme aromatase in the granulosa cells of ovarian and violations of the conversion of androgens into estrogens due to changes in affinity of substrate to enzyme and blocking the active site of aromatase.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АРОМАТАЗЫ В ГРАНУЛЕЗНЫХ КЛЕТКАХ ЯИЧНИКОВ У ЖЕНЩИН С КЛОМИФЕН-РЕЗИСТЕНТНОЙ ФОРМОЙ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

А. В. Чайка, Е. Н. Носенко, А. М. Яковец, И. А. Могильовкіна, С. М. Корниенко, Д. Кириловас, М. Бергстром, Е. Бергстром-Петтерман, К. Карлстром, Т. Нессен

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты экспериментального исследования активности ароматазы в гранулезных клетках яичников. Доказано, что в фолликулярной жидкости яичников от пациенток с кломифен-резистентной формой синдрома поликистозных яичников отмечается повышенная концентрация андростендиона в 6,68 раз. Это приводит к снижению активности фермента ароматазы в гранулезных клетках яичников и нарушению конверсии андрогенов в эстрогены за счет изменений аффинитета субстрата к энзиму и блокирования активных сайтов ароматазы.

Ключові слова: безпліддя, синдром полікістозних яєчників, ароматаза, андростендіон, конверсія андрогенів в естрогени, [¹⁴C]-ворозол, позитронна емісійна томографія.

S.G. Hiler et al. (1981) [4] запропонували гіпотезу, що тимчасова індукція ароматазної системи гранульозних клітин і супроводжуючі зміни в інтрафолікулярній продукції стероїдів є основними чинниками, які дозволяють селекцію домінуючого фолікула в оваріальному циклі. Численні речовини, присутні у фолікулярній рідині (активін, епідермальний фактор росту, інтерлейкін-6, інсуліноподібний фактор росту і лейкемію інгібуючий фактор, різні стероїди, антимюлерів гормон), мають можливість негативно або позитивно модулювати функціональну потужність ароматази [2, 3, 5, 6]. Присутність активатора ароматази в обробленій деревним вугіллям фолікулярній рідині від пацієнток з синдромом полікістозних яєчників (СПКЯ) і присутність активатора ароматази в обробленій ефіром підтверджує те, що в фолікулярній рідині від пацієнток з СПКЯ система активації/

інгібування ароматази не збалансована по відношенню до блокади функції ензиму. Таким чином, з'ясування причин такого дисбалансу може створити нові гіпотези для лікування СПКЯ.

Метою дослідження стало експериментальне дослідження активності ароматази у гранульозних клітинах яєчників і виявлення її інгібіторів у фолікулярній рідині.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

В експериментальне дослідження було включено 40 пацієнток I групи з СПКЯ, 46 жінок контролю з трубним безпліддям і нормальним овуляторним циклом, 7 пацієнток, яким було проведено екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) з приводу трубного безпліддя.

Фолікулярна рідина забиралася з яєчників в групах I та K під час виконання ендокхірургічного втручання на 5-й день фолікулярної фази. Розмір фолі-

кулів, з яких аспірували вміст, контролювався ультразвуковим дослідженням (УЗД) під час виконання оперативного втручання. В групі з ЕКЗ фолікулярна рідина забиралася під час забору яйцеклітин з фолікулів діаметром понад 15 мм. Забрана фолікулярна рідина негайно центрифугувалася протягом 30 хвилин при 3000 обертів, заморожувалася і зберігалася при температурі -20°C . Заморожені зразки, обкладені сухим льодом транспортували з м. Донецька в м. Уппсалу (Швеція). На транспортовку було отримано дозвіл МОЗ України.

Обробка фолікулярної рідини перед проведенням експерименту in vitro. Тала фолікулярна рідина від 3-5 жінок контролю, 2-3 пацієток з СПКЯ та свіжа фолікулярна рідина від пацієток з ЕКЗ, донорів гранульозних клітин були використані для підготовки окремих п'яти пулів (для кожної серії експерименту готували новий пул): 1) фолікулярна рідина від жінок контролю; 2) необроблена фолікулярна рідина від пацієток з СПКЯ; 3) фолікулярна рідина від пацієток з СПКЯ, попередньо оброблена деревним вугіллям; 4) ефірний екстракт фолікулярної рідини від пацієток з СПКЯ; 5) фолікулярна рідина ФСГ-стимульованих жінок в циклі ЕКЗ. Контрольним інкубатом було середовище Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

Усі 5 пулів і DMEM були розділені відповідно на дві аліквоти для конверсії та обробки набором $[^{11}\text{C}]$ ворозолу. Фолікулярна рідина від жінок з СПКЯ та контролю була розморожена за один день перед запланованим експериментом. Необроблена контрольна фолікулярна рідина і аліквоти фолікулярної рідини від пацієток з СПКЯ зберігалися до початку експерименту при температурі 4°C , поки виконувалася обробка ефіром та деревним вугіллям двох інших аліквот від пацієток з СПКЯ.

Екстракція стероїдів та ліпідів (приготування ефірного екстракту). 1 мл фолікулярної рідини від жінок з СПКЯ екстрагували 3 мл діетилового ефіру, які були поміщені в окрему тестову трубку і випарували насухо. Сухий залишок розбавляли 50 мл етанолу з 0,95 мл фосфат-буферної солі (PBS).

Видалення стероїдів деревним вугіллям. Вміст стероїдів був видалений додаванням деревного вугілля (25 мг/мл). Після змішування протягом двох годин деревне вугілля було видалено центрифугуванням при 2000 обертів за 20 хвилин при температурі 4°C . Залишкова концентрація E_2 у фолікулярній рідині після обробки була 0,1% від фізіологічного рівня.

Підготовка гранульозних клітин. Гранульозні клітини були отримані від 7 пацієток, у яких був здійснений забір овоцитів в циклі ЕКЗ. Після видалення яйцеклітин, гранульозні клітини відділялися від фолікулярної рідини центрифугуванням 500 обертів за 10 хвилин. Гранульозні клітини були відділені від червоних клітин крові центрифугуванням з градієнтом Перколля при 9850 обертів за 30 хвилин. Клітини

були промиті DMEM і «Glutamax IMX» з додаванням пеніциліну G 100 Од/мл і стрептоміцину сульфату 100 мг/мл («Gibco Laboratories», Grand Island, NY, USA), підраховані гемоцитометром і зберігалися в 1 мл DMEM при 0°C до проведення експерименту.

Аналіз ароматазної активності (естрогеновий синтез). Ароматазна активність визначалася вимірюванням $[^3\text{H}]_2\text{O}$, який продукується при стероїдспецифічному визволенні ^3H з C-1 β позиції 4-андростен-3,17-діона ($[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-A4}$). Стисло, 10 мл розчину етанолу, який вміщує ($[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-A4}$ (1 μCi , 40 пмоль; «New England Nuclear», Boston, MA, USA) був доданий до 0,1 мл фолікулярної рідини, яка вміщувала 15000 гранульозних клітин. Інкубація була проведена двічі разом з кип'яченою заготовкою. Реакція каталізації ароматазою була ініційована додаванням NADPH («Sigma Chemical Co.», St. Louis, MO, USA) в 50 мл PBS, і гранульозні клітини були інкубовані протягом 2 годин при 37°C . Наприкінці періоду реакції було додано 0,5 мл PBS для компенсації випареної рідини, і стероїди були екстраговані трьома порціями діетилового ефіру, які були відкинуті. Трихлорацетова кислота (1,0 мл, 30%) була додана для решти водної фази і суміш була перемішана. Преципітовані протеїни були седиментовані центрифугуванням 10 хвилин при 1500 обертах, і був зібраний 1 мл отриманого супернатанта. Стероїди, що залишилися, були видалені додаванням 1 мл суспензії, яка вміщувала 0,5% декстрану і 5% деревного вугілля в PBS. Після змішування та центрифугування 20 хвилин при 2000 обертах 1,0 мл чистого супернатанта було прийнято для рідинного сцинтиляційного підрахунку $[^3\text{H}]\text{2O}$ радіоактивності. Ароматазна активність визначалася в аттомолях утворених естрогенів/1000 клітин/час.

Сцинтиляційний підрахунок $[^3\text{H}]_2\text{O}$ радіоактивності здійснювали методом позитронної емісійної томографії (ПЕТ), застосовували короткоживучий позитронвипромінюючий радіонуклід ^{11}C . Ворозол – високочутливий нестероїдний конкурентний інгібітор ароматази, може бути міченим ^{11}C . Кількісна оцінка ароматази в гранульозних клітинах базується на визначенні зв'язаного $[^{11}\text{C}]$ ворозолу. Кожне визначення було виконано на 15000 гранульозних клітин в 0,08 мл фолікулярної рідини в різних наборах експерименту. $[^{11}\text{C}]$ ворозол ($[\text{N-метіл-}^{11}\text{C}]\text{ворозол}$; $4,2 \pm 2,0$ Сі/ $\mu\text{моль}$, $>98\%$ радіохімічної чистоти) був доданий ворозол в концентрації 0,3, 1,0 і 5,0 нМ. Подвійні зразки були інкубовані з 1 μM нерадіоактивного ворозолу для оцінки неспецифічного зв'язування. Шість подвійних інкубацій були виконані з різними пулами фолікулярної рідини і DMEM. Після інкубації протягом 30 хвилин клітини були зібрані і промиті з використанням 48-зразкової системи збирання клітин (Brandel, Gaithersburg, MD, USA). Усі інкубати були одночасно аспіровані і вміст був пропущений через скловолоконні фільтри Whatman GF/B (Brandel). Три послідовні промивання були виконані з PBS. Фільтри

були видалені і розміщені на фосфорзберігальній тарілці (Molecular Dynamics, Sunyvale, CA, USA) на 40 хвилин експозиції ^{11}C радіактивності. Як стандарт, зразок 20 мл 1 нМ інкубованого розчину [^{11}C] ворозолу було здано на зберігання на фільтрі разом із зразками гранульозних клітин.

Пластини відображень були прочитані лазерним фосфорним зчитувачем (модель 400S, Molecular Dynamics, CA, USA) і цифрові зображення були збережені для наступного кількісного підрахунку з використанням програмного забезпечення ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunyvale, CA, USA). На зображеннях області радіоактивності були намічені для позначення загальної радіоактивності по кожному з фільтрів. Процедура включала автоматичне віднімання фону. Кількісна оцінка специфічної зв'язуючої радіоактивності була проведена шляхом вирахування кожного неспецифічного зразка (1 μM ворозолу) з відповідної пари (1 нМ). Читання загального підрахунку 20 мл стандарту дозволило калькуляцію калібрувального фактору виразити у фмоль/підрахунок. Застосовуючи цей калібрувальний фактор, специфічна зв'язувальна радіоактивність була перерахована у фмоль. Тільки 5 із 7 експериментів зі зв'язування були технічно успішними, таким чином кількість зразків з вивчення зв'язування було 5.

Отримані дані оброблені за допомогою IBM PC з використанням електронної таблиці «EXCEL».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед жінок, включених в експериментальне дослідження 40 пацієток групи I з СПКЯ, 46 пацієток контрольної групи і 7 жінок, що проходили цикл ЕКЗ і були стимульовані ФСГ, не відрізнялися за МЗІ ($23,55 \pm 0,52$, $22,28 \pm 0,58$, $22,86 \pm 1,80$ кг/м²), тютюнопалінням ($35,00 \pm 0,95$, $41,30 \pm 0,96$, $42,86 \pm 2,67\%$), але мали вірогідні відмінності за віком ($24,75 \pm 0,67$ ($p_k < 0,001$, $p_{\text{ЕКЗ}} < 0,01$), $27,63 \pm 0,50$, $27,29 \pm 0,61$ років), гірсутним числом ($9,00 \pm 0,48$ ($p_k < 0,0001$, $p_{\text{ЕКЗ}} < 0,0001$), $2,83 \pm 0,27$, $3,00 \pm 0,53$ балів) і числом менструальних циклів за останні 12 місяців ($5,80 \pm 0,43$ ($p_k < 0,0001$, $p_{\text{ЕКЗ}} < 0,0001$), $12,04 \pm 0,03$, $12,00 \pm 0,00$).

Порівняння з інкубацією гранульозних клітин з *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*. Інкубація гранульозних клітин з фолікулярною рідиною від жінок контролю і пацієток з СПКЯ в обох випадках приводила до значно нижчої активності конверсії андрогенів (продукції естрогенів) (в 2,54 і 3,30 рази, обидва $p < 0,0001$) порівняно з інкубацією з DMEM, тоді як інкубація з фолікулярною рідиною від ФСГ-стимульованих жінок приводила до підвищення активності в 2,14 рази ($p < 0,0001$).

Паралельно, інкубація з фолікулярною рідиною від жінок контролю і від жінок з СПКЯ привела до значно нижчої спорідненості до субстрату і підвищення константи дисоціації в 6,93 ($p_d < 0,001$) і 4,20 ($p_d < 0,001$, $p_{1-k} < 0,02$) рази відповідно. Зв'язування [^{11}C]-

ворозолу в гранульозних клітинах після інкубації у фолікулярній рідині від ендокринологічно здорових жінок перевищувало таке з DMEM в 2,03 рази ($p_d < 0,006$), тоді як від жінок з СПКЯ і ФСГ-стимульованих вірогідно не відрізнялося від такого з DMEM.

Проведення кореляційного аналізу показало, що загальні варіації ароматазної активності при інкубації з фолікулярною рідиною від ендокринологічно здорових жінок, пацієток з СПКЯ і ФСГ-стимульованих, можуть бути пояснені як зміна числа активних сайтів ароматази, доступних для конверсії ($r = 0,56$, $p < 0,03$), та змінами афінитету субстрату до ензиму (K_d) ($r = -0,67$, $p < 0,05$).

Порівняння з інкубацією гранульозних клітин з фолікулярною рідиною від ендокринологічно здорових жінок. Активність конверсії андрогенів (естрогенової продукції) була вірогідно вище в гранульозних клітинах, інкубованих з фолікулярною рідиною від ФСГ-стимульованих жінок порівняно з інкубацією з фолікулярною рідиною жінок контролю (в 5,42 рази, $p < 0,0001$) і пацієток з СПКЯ (в 7,05 рази, $p < 0,0001$), тоді як не було вірогідних відмінностей активності поміж інкубацією з фолікулярною рідиною жінок контролю і пацієток з СПКЯ. Паралельно, константа дисоціації зв'язування [^{11}C]-ворозолу була вірогідно в 2,81 рази нижче (високий афінитет) в гранульозних клітинах, інкубованих з фолікулярною рідиною від ФСГ-стимульованих жінок ($p < 0,003$), в 1,65 менше в гранульозних клітинах, інкубованих з фолікулярною рідиною від пацієток з СПКЯ ($p < 0,02$). Зв'язування [^{11}C]-ворозолу в гранульозних клітинах після інкубації у фолікулярній рідині від ендокринологічно здорових жінок перевищувало таке від жінок з СПКЯ в 1,92 ($p < 0,005$) і від ФСГ-стимульованих – в 1,81 рази ($p < 0,007$), тоді як різниці між зв'язуванням [^{11}C]-ворозолу після інкубації у фолікулярній рідині від жінок з СПКЯ і від ФСГ-стимульованих не мало вірогідних відмінностей.

Кореляційний аналіз показав загальні відмінності ароматазної активності гранульозних клітин при інкубації їх з фолікулярною рідиною від жінок з СПКЯ і від ФСГ-стимульованих порівняно з ендокринологічно здоровими жінками, що може бути пояснено варіаціями афінитету попередника ензиму ($r = -0,68$, $p < 0,04$) та змінами числа активних сайтів ароматази, доступних для конверсії.

Ефект фолікулярної рідини від пацієток з СПКЯ після обробки деревним вугіллям (видалення стероїдів) та екстракції ефіром (видалення протейнів) порівняно з фолікулярною рідиною без обробки. Активність конверсії андрогенів була вірогідно вище в гранульозних клітинах, інкубованих з фолікулярною рідиною, обробленою деревним вугіллям, в 4,21 рази ($p < 0,0001$), у протилежність до вірогідно нижчої після інкубації з фолікулярною рідиною, обробленою ефіром, в 3,50 рази ($p < 0,0001$) порівняно з інкубацією з необробленою фолікулярною рідиною від жінок з СПКЯ.

Активність конверсії відрізнялася в 14,75 разів ($p < 0,0001$) поміж гранульозними клітинами, інкубованими з обробленою деревинним вугіллям фолікулярною рідиною від пацієнок з СПКЯ і з такою, обробленою ефіром. Афінітет до субстрату був значно вищий – константа дисоціації зв'язування [^{11}C]-ворозолу була вірогідно нижче в гранульозних клітинах, інкубованих з фолікулярною рідиною, обробленою деревинним вугіллям – в 2,50 рази ($p < 0,0006$), ефіром – в 6,67 рази ($p < 0,0001$) порівняно з необробленою фолікулярною рідиною від пацієнок з СПКЯ. Максимальне зв'язування [^{11}C]-ворозолу було в 4,00 рази нижче для фолікулярної рідини, обробленої ефіром ($p < 0,0001$), і в 1,35 ($p < 0,006$) – деревинним вугіллям. Константа дисоціації і зв'язування [^{11}C]-ворозолу були більшими при інкубації з фолікулярною рідиною, обробленою деревинним вугіллям, порівняно з обробленою ефіром – відповідно в 2,67 ($p < 0,02$) і в 2,96 рази ($p < 0,006$).

Кореляційний аналіз показав, що загальні варіації ароматазної активності гранульозних клітин, інкубованих з фолікулярною рідиною від пацієнок з СПКЯ, обробленою деревинним вугіллям і ефіром, порівняно з необробленою фолікулярною рідиною, не мали вірогідних залежностей варіацій афінітету попередника ензиму або змін числа активних сайтів ароматази, здатних до конверсії.

Таким чином, порівняно з інкубацією гранульозних клітин з ДМЕМ, інкубація з фолікулярною рідиною від ендокринологічно здорових жінок і з СПКЯ дали істотно менший естрогеновий синтез, тоді як з фолікулярною рідиною від ФСГ-стимульованих жінок – інтенсивну естрогенову продукцію. Ці результати відповідають даним літератури щодо інгібуючого ефекту фолікулярної рідини від нестимульованих жінок і стимулюючого ефекту від ФСГ-стимульованих пацієнок [2]. Варіації активності ароматазної конверсії в гранульозних клітинах можуть бути пояснені змінами афінітету субстрату до ензиму додатково зі змінами числа сайтів, здатних до зв'язування. Це положення може бути модифіковано та доповнено взагалі теорією, що стимуляція фолікулів ФСГ збільшує кількість гранульозних клітин і супутнє число молекул ароматази, тобто зв'язуючих сайтів. Однак, ефекти стимуляції ароматази в гранульозних клітинах ФСГ в попередніх роботах [4] спостерігалися після тривалого культивування (2-3 доби) гранульозних клітин. У нашому дослідженні час інкубації був тільки не більше 2 годин, урахувавши те, що речовини фолікулярної рідини можуть швидко змінювати кінетичні властивості ензиму ароматази і робити неможливим швидке підвищення активності конверсії. Аналогічні швидкі зміни в синтезі естрогенів характерні для преовуляторного піку рівня сироваткового E_2 *in vivo*. Цей пік необхідний для успішної овуляції.

Сполуки, які знаходяться у фолікулярній рідині, можуть швидко регулювати функцію ензиму ароматази в гранульозних клітинах через зміни афінітету субстрату до ензиму та через блокування активних сайтів. Це положення співпадає з гіпотезою щодо блокади ароматазної активності у жінок з СПКЯ, запропонованою S.K. Agarwal et al. (1996) [1], відповідно якій високі концентрації 5α -редуктованих андрогенів у фолікулярній рідині блокують при СПКЯ активні сайти ароматази, знижують продукцію естрогенів і зупиняють розвиток маленьких фолікулів. В проведеному нами дослідженні поліпшення ароматазної активності гранульозних клітин, інкубованих з обробленою деревинним вугіллям фолікулярною рідиною від пацієнок з СПКЯ, було очікуваним, тому що вугільна обробка елімінує стероїдні інгібітори ароматази, збільшує афінітет ензиму до субстрату, що приводить до естрогенового синтезу. Ефірна обробка фолікулярної рідини від пацієнок з СПКЯ (видаляє протеїни, але не стероїди) знижувала конверсію переважно через блокаду активних сайтів ароматази, незважаючи на подальше збільшення афінності. Підвищену активність конверсії ФСГ-стимульованої фолікулярної рідини можливо пояснити підвищеною афінністю субстрату. Ці результати базуються на порівнянні конверсії андрогенів і, впершу чергу, на розробленому і затвердженому наборі для вивчення зв'язування [^{11}C]-ворозолу з припущенням, що природа зв'язування прекурсора ароматизації і [^{11}C]-ворозолу з активним центром ферменту подібні.

ВИСНОВКИ

1. Агенти у фолікулярній рідині від різних типів пацієнок розрізняються за своїм впливом на швидкі зміни функціональних властивостей ферменту ароматази в яєчниках.

2. В даному дослідженні фолікулярна рідина від пацієнок з СПКЯ знижувала ароматазну активність, в основному, за рахунок зменшення афінітету до субстрату, ефект якого може бути видалений після обробки деревинним вугіллям. Таким чином, швидше за все, ці агенти – стероїди. Оброблена ефіром фолікулярна рідина від пацієнок з СПКЯ позбавлена білків, але яка має стероїди, зменшує активність конверсії, в основному, через блокаду активних сайтів ароматази, не дивлячись на високий афінітет, і таким чином модулює ефекти агентів, що присутні в деревинному екстракті (стероїди). Можна припустити, що ці молекули мають протеїновий характер.

3. Подальші дослідження механізмів і специфічних речовин, відповідних за швидку активацію/інгібіцію ароматазної активності в оваріальних фолікулах, може бути наступним шагом щодо тлумачення селекції домінантного фолікулу в нормальному оваріальному циклі і у пацієнок з ановуляцією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Agarwal S. K. A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome / S. K. Agarwal, H. L. Judd, D. A. Magoffin // J. Clin.

Endocrinol. Metab. – 1996. – Vol. 81. – P. 3686–3691.

2. Aromatase activity of human granulosa cells in vitro: effects of gonadotropins and follicular fluid / P. Guet, D. Royere, A. Paris [et al.] // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14. – P. 1182–1189.

3. Granulosa cell aromatase enzyme activity: Effects of follicular fluid from patients with polycystic ovary syndrome, using aromatase conversion and [C^{11}]-vorozole-binding assays / D. Kirilovas, A. Chaika, M. Bergstrom [et al.] // Gynecological Endocrinology. – 2006. – Vol. 22, № 12. – P. 685–691.

4. Hiller S. G. Evidence that granulosa cell aromatase

induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro / S. G. Hiller, F. A. De Zwart // Endocrinology. – 1981. – Vol. 109. – P. 1303–1305.

5. Knight P. G. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development / P. G. Knight, C. Glister // Anim. Reprod. Sci. – 2003. – Vol. 78. – P. 165–183.

6. Seifer D. B. Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance / D. B. Seifer, D. T. MacLaughlin // Fertil. Steril. – 2007. – Vol. 88. – P. 539–546.