



Софийски университет “Св. Климент Охридски”

Биологически Факултет

Катедра „Цитология, хистология и ембриология“

**КЛЕТЪЧНИ И МОЛЕКУЛНИ МАРКЕРИ ЗА
ЕНДОМЕТРИАЛНА РЕЦЕПТИВНОСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**За придобиване на ОНС доктор
в професионално направление 4.3. Биологически науки
(Клетъчна Биология)**

на Елена Василева Маринова

Научен ръководител:

Проф. дбн Росица Конакчиева

София, 2022 г.

Дисертационният труд е написан на 130 страници, илюстриран е с 25 фигури и 20 таблици. В библиографския списък за цитирани 197 литературни източници.

Научно жури:

Вътрешни членове:

1. Проф. дбн Росица Конакчиева, БФ-СУ
2. Проф. д-р Христо Гагов, БФ-СУ

Външни членове:

1. Проф. дбн Сорен Хайрабедян, ИБИР-БАН
2. Проф. д-р Савина Хаджидекова, МУ-София
3. Доцент д-р Иван Бочев, ИБИР-БАН

Защита на дисертационния труд ще се състои на 2022 г., от часа, в заседателната зала на Биологически Факултет – Софийски Университет, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в библиотеката, както и на уеб-страницата на Биологическия Факултет на Софийския Университет.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертационния труд.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“



SOFIA UNIVERSITY
ST. KLIMENT OHRIDSKI

Софийски университет “Св. Климент Охридски”

Биологически Факултет

Катедра „Цитология, хистология и ембриология“

**КЛЕТЪЧНИ И МОЛЕКУЛНИ МАРКЕРИ ЗА
ЕНДОМЕТРИАЛНА РЕЦЕПТИВНОСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**За придобиване на ОНС доктор
в професионално направление 4.3. Биологически науки
(Клетъчна Биология)**

на Елена Василева Маринова

Научен ръководител:

Проф. дбн Росица Конакчиева

София, 2022 г.

Използвани Съкращения

- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – съдов ендотелен растежен фактор
- GLC - гранулозо-лутеинни клетки
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism) - единичен нуклеотиден полиморфизъм
- 5'-UTR (5'-Untranslated region) - 5'- нетранслиращ регион
- PCR (Polymerase Chain Reaction) - полимеразна верижна реакция
- HIF (Hypoxia-Inducible Factor) – хипоксия индуциращ фактор
- IL - интерлевкин
- IVF-ET (*in vitro* fertilization - Embryo transfer) - ин витро оплождане - ембриотрансфер
- Wt (Wild type) - див тип генотип
- Mut (Mutation) - мутантен генотип
- Het (heterozygote) - хетерозиготен генотип
- RIF (Repeated Implantation Failure) - Повтарящи се имплантационни неуспехи
- ESCs – ендометриални стромални клетки
- E2 - естрадиол-17 β
- ELISA - Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- FACS - флуоресцентно активирано клетъчно сортиране (Fluorescence-activated cell sorting)
- FSH - Follicle-stimulating hormone (фоликуло-стимулиращ хормон)
- IVF- ин витро оплождане (*in-vitro* fertilization)
- LH - лутеинизиращ хормон (luteinizing hormone)
- AMP – анти-мюлеров хормон
- LIF - левкемия инхибиращ фактор (leukemia inhibitory factor)
- NK клетки - гранулирани стромални клетки (естествени клетки убийци, NK cells)
- P4 - прогестерон
- PCOS - синдром на поликистозни яйчници
- TNF– тумор-некротизиращ фактор алфа (Tumor necrosis factor alpha)
- CD68 - Cluster of Differentiation 68
- β hHG - човешки хорион гонадотропин бета (β human chorionic gonadotropin)
- ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
- РНК - рибонуклеинова киселина

Въведение

Успешната имплантация, образуването на плацентата и протичането на бременността изискват координирани процеси на формиране мрежа от кръвоносни съдове и молекулярно-клетъчна адаптация на фетуса към майчиния организъм. В процеса участват два основни компонента - развиващият се еуплоиден ембрион, притежаващ потенциал за имплантиране, и рецептивният ендометриум, способен да взаимодейства и активно да подпомага развитието на новия индивид. Интеракцията между ембриона и ендометриума води до апозиция, закрепване и инвазия на трофектодермалните клетки - основна предпоставка за успешна имплантация и формиране на плацентата. Процесът зависи от множество промени и в двата компонента, като молекулните механизми, които регулират пролиферацията и взаимодействието на трофектодермата с ендометриума, не са проучени особено добре при човека. От друга страна, ендометриумът е под влияние на циклично променяща се хормонална и паракринна среда, върху която се наслагват допълнително системни фактори, свързани с индивидуалната предиспозиция и имунен статус.

Предварителни резултати насочват вниманието към значението на неоваскуларизацията (ангиогенезата) за успешния процес на рецептивност и имплантацията. При експерименти с моделни организми и инхибиране на ангиогенезата с анти-ангиогенен компонент (AGM-1470), точно преди или непосредствено след имплантиране на ембриона, се наблюдава прекъсване на процеса на образуване на плацентата като резултатът е отмиране на концептусите. Успешната бременност, до голяма степен, зависи от ангиогенните функции на ендометриума, способността да изгражда спирални артерии в миометриума и възможността да произвежда растежни фактори, чието освобождаване контролира кръвоснабдяването на плацентата и изхранването на ембриона по време на началото и в края на развитието ѝ.

Имунната система също участва в процесите чрез макрофагите, които могат да подтискат процеса на образуване на кръвоносни съдове чрез секрецията на анти-ангиогенни посредници, какъвто е рецепторът на съдовия ендотелен растежен фактор (sVEGFR-1, или sflt-1), който най-често се асоциира със загуба на плода при евентуална

бременност.

На базата на клиничен материал в център за медицински асистирана репродукция бе разработено сравнително проучване върху подобрени групи пациенти с имплантационна недостатъчност и здрави контроли, имащо за цел проучване полиморфизма в гена за VEGF, активирането на основните типове рецептори за растежния фактор и клетъчната сигнализация, индуцирана от тяхното стимулиране. За изследването бяха използвани както рутинни клинични и биохимични анализи, така и набор от специфични съвременни методи на клетъчната и молекулярната биология като клетъчно култивиране, имунохистохимия, имуноблотинг, ELISA, имунофлуоресценция, qRT-PCR, конфокална микроскопия, FACS анализ, количествен PCR, клониране на ДНК и др.

В резултат от разработването на дисертационния труд бяха получени нови научни данни за молекулните механизми, участващи в етиологията на имплантационната недостатъчност, а също така и повече информация, обясняваща патологичните ефекти, които съпътстват нарушенията, асоциирани с понижена фертилна функция и предразположеност към нарушена ендометриална функция. Чрез комплексен методичен подход при използване на клиничен и биологичен материал от пациенти с неуспехи в имплантацията и реализиране на бременност, проучването е фокусирано върху изследване функцията на гена за VEGF като основен регулатор на ангиогенезата и процесите на ремоделиране на ендометриалната тъкан в предшестващ период, и по време на имплантацията. Важен аспект от проучването заема изследването върху значението на епифизния хормон мелатонин като имуноневроендокринен модулатор на репродуктивната система при жената свързан с репродуктивното здраве и качество на живот. Изследването включва обхватно проучване на експресията на рецептори за мелатонин в клетъчни модели, както и генетични аспекти на ролята на гена MTNR1B при патологии свързани с имплантацията.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящата работа е да се проучи ролята на клетъчни и молекулни маркери, чиято генна експресия повлиява ендометриалната рецептивност и репродуктивното здраве при жени от българската популация..

За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

Задачи:

1. Да се извърши подбор на пациенти с репродуктивни проблеми и контролни групи жени с успешно реализирана спонтанна бременност. Да се създадат техни клинични досиета и да им се снемат анамнеза.
2. Да се проведе анализ на клиничните данни и избор на методи за комплексно проучване на статуса, свързан с невъзможността за реализиране на бременност.
3. Да бъдат създадени работни протоколи за изолиране, съхранение и обработка на клиничните проби от биопсична тъкан и периферна кръв.
4. Да бъде изследвана чрез генетични анализи връзката на полиморфизми (SNP) в гена VEGFA, кодиращ съдов ендотелен растежен фактор VEGFA, с клиничния статус на пациенти и здрави жени.
5. Да бъде изследвано чрез генетични анализи асоциирането на полиморфизми (SNP) в гена MTNR1B, кодиращ рецептора за мелатонин 1B, с клиничния статус на пациенти и здрави жени.
6. Да бъде извършена комплексна оценка на маточен инфламаторен профил по време на средно – лутеална фаза чрез генетични и клетъчни анализи.
7. Да бъдат разработени подходящи клетъчни модели за проучване ин-витро на молекулни маркери.
8. Да се проведе биоинформатичен анализ на данните.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Подбор на пациенти и контроли

Извършен бе подбор на групи пациенти с репродуктивни проблеми, повтарящи се имплантационни неуспехи или с няколко спонтанни аборта. На базата на предварителна консултация бе предложена Декларация за информирано съгласие за участие в изследването. Пациентките бяха избрани между жени на възраст от 25 до 43 г. с доказан стерилитет и/или патология на ендометриума.

Най-общо в дисертацията са използвани както рутинни клинични и биохимични анализи, така и набор от специфични съвременни методи на клетъчната и молекулярната биология, като клетъчно култивиране, автоматизиран клетъчен образен анализ (Cytell CIS, Delta Vison Ultra, GE Healthcare), имунохистохимия, имуноблотинг, ELISA, имунофлуоресценция, , количествен PCR, PCR в реално време, секвениране, клониране на ДНК и др., които бяха проведени в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ и МЦ Репробаиомед. Хормоналните анализи са извършени в Клинична лаборатория към УСБАЛЕ“Акад. Иван Пенчев“, FACS анализ в ИБИР-БАН.

Биологичен и експериментален материал

При пациентите съгласно утвърден протокол бе предприета ендометриална биопсия в средна лутеална фаза. От биопсичния материал бяха подготвени проби за различни анализи включително, изолиране на ДНК и РНК, за провеждане на генетични изследвания и експресионен анализ на таргетни гени. За провеждането на генетичния анализ и изследваните полиморфизми в гените за VEGF и MTRN посредством полимеразно-верижна реакция PCR, рестрикционен анализ, и секвениране по метода Сенджър, бе използвана високомолекулна ДНК, изолирана от 3-10 мл венозна кръв, събрана във вакуумна епруветка, съдържаща антикоагулант (K₃EDTA). Кръвта се съхраняваше при +4°C в продължение на максимум 48 часа. За ензим-имунологичните изследвания беше събиран серум във вакуумна епруветка (с обем от 3–5 ml), съдържаща гел-активатор и съхранявана при +4°C в продължение на максимум 48 часа.

За провеждане на генетичен експресионен анализ беше използван биопсичен материал от ендометриална тъкан. Биопсията бе извършвана съгласно стандартна

процедура чрез офис- хистероскопия или вакуумно щрих-абразио (по Пипеле). Взетата тъкан за анализ се съхранява не повече от 24 часа при +4°C във физиологичен разтвор. Съгласно протокола на изследването от биопсичния материал беше отделяна част за изолиране на стромални ендометриални клетки които се подлагаха на култивиране в първични култури. В култивираните клетки бяха изследвани клетъчни протеинови маркери посредством имунофлуоресценция, FACS, Western blot. В супернатантите от културите съгласно протокола беше определяна експресия на набор от цитокини в цели клетъчни лизати. Паралелно бяха събирани проби от периферна кръв за определяне на хормонален статус посредством ELISA базирани анализи.

За изучаване процесите на фоликулогенеза и зреене на жълтото тяло, паралелно с нарастване на васкуларния пермеабилитет и ролята на цитокини и растежни фактори в тези процеси бе използван комбиниран подход, който включваше изследване на периферна кръв и фоликулна течност за съдържание на полови стероиди (E2, P4, Кортизол и цАМР), цитокини и растежни фактори (IL-1b, VEGF, EGF, TGF-b и др). Данните бяха обработвани за корелация с изследването на определени генни полиморфизми и клиничните резултати от контролираната овариална стимулация (брой фоликули, оплодени яйцеклетки, ембриони и имплантация).

От фоликулните пунктати съгласно протокола бяха изолирани и впоследствие култивирани гранулозни и кумулусни клетки за проучване нива на апоптоза, експресия на специфични маркери за пролиферация и диференциация, цитоскелетни компоненти, клетъчно-адхезивни молекули, с оглед оценка качеството на фоликулите и използваните за процедурите яйцеклетки/.

Използвани методи

- Преданалитични методи
 - *Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв*
 - *Оценка на количеството и качеството на получената ДНК*
 - *Изолиране на тотална РНК от ендометриална тъкан*

- Аналитични методи
 - *Полимеразна Верижна Реакция (Polymerase Chain Reaction – PCR)*
 - *Хоризонтална агарозна електрофореза*
 - *Рестрикционен (RFLP) анализ*
 - *Полимеразна верижна реакция в реално време (Real time PCR)*
 - *Генетичен експресионен профил на възпалителни маркери*
 - *Секвенционен анализ по Сенджър*

- *Биоформатична обработка на получените резултати*
- *Моделни клетъчни анализи за проучване на молекулни маркери*
- *Имунофлуоресценция и FACS анализи*
- *SDS-PAGE и Western Blot анализи*
- *Хормонални анализи за естрадиол, прогестерон, кортизол и АМХ*
- *Статистическа обработка и анализ на данните*

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За целите на дисертационния труд всички случаи на репродуктивни неуспехи са отнесени към една от следните две основни групи: А - с повтарящи се имплантационни неуспехи (RIF) и Б - повтарящи се спонтанни аборти (RPL) (*Таблица 12*)

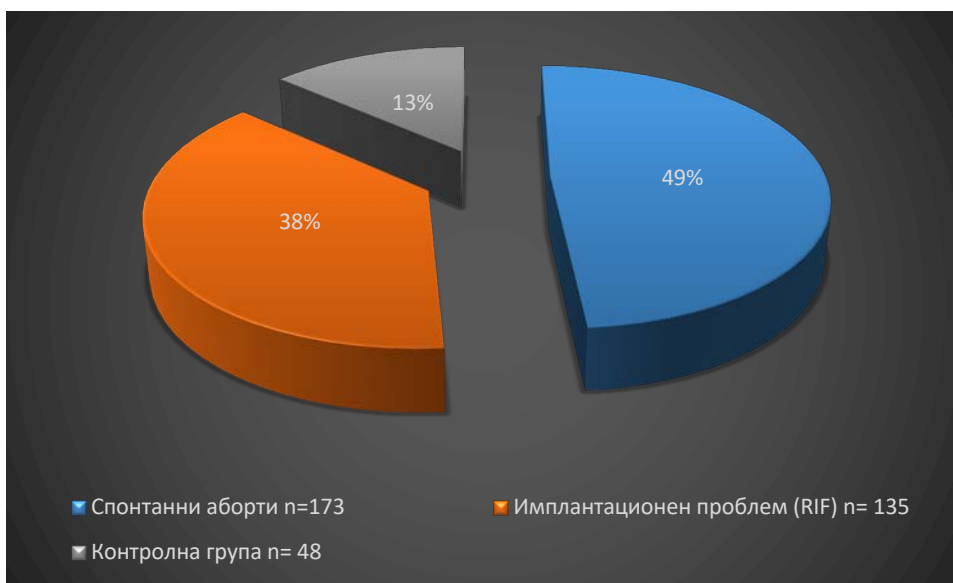
RIF свързан с неуспешни IVF цикли може да се определи като повтаряща се липса на имплантиране след два поредни трансфера на поне 4 ембриона на ден 3^{ти} от развитието им или на две висококачествени бластоцисти (Polanski et al., 2014 RBMO). Неуспехът при имплантиране е с неясна етиология и може да се дължи както от ембрионални така и от ендометриални фактори.

Съгласно Ford H. and Schust D. 2009, повтарящите се спонтанни аборти (RPL) представляват ранна загуба на три бременности преди 20^{та} гестационна седмица. Тъй като тази група жени е сравнително по-хетерогенна по отношение на възможните причини за репродуктивния неуспех, при избора на пациенти за проучването сме изключили такива с вродени аномалии на матката (мюлерови аномалии), с маточна миоматоза (вкл. след оперативна корекция), както и случаи, суспектни за или с известна истмико-цервикална инсуфициенция.

Таблица 12: Разпределение на патологичните фенотипове, установени в групата пациенти.

Патологии	брой пациенти
Общо обхванати пациенти	307
Имплантационен проблем (RIF)	134
Спонтанни аборти	173

Процентното разпределение по групи е както следва:



Фигура 8: Процентно разпределение на общия брой пациенти, включени в проучването

3.1. Биологична оценка на биопсичен материал от ендометриална тъкан

За оценка на биопсичния материал използван в проучванията на молекулни и клетъчни маркери свързани с репродуктивни неуспехи бяха използвани общо 32 проби и четири, изолирани от здрави жени в репродуктивна възраст. От изследвания материал беше изолирана РНК за експресия на гени свързани с про-инфламаторен отговор (по-долу).

Част от тъканта беше диспергирана в монослойни култури и култивирана за различни периоди (с пасажирание чрез трипсинизиране). Културите бяха наблюдавани под фазов контраст на инвертен микроскоп Leica dm1 (Фиг.9). В някои случаи беше извършен имунофлуоресцентен анализ на цитоскелетни протеини и повърхностни маркери характеризиращи адхезията на клетките (Фиг.21).

Част от клетъчните култури бяха използвани за оценка на състав и типа на културите във флоуцитометричен анализ (Фиг. 10).

На селектирана група беше събирана периферна кръв за изследване на хормони (Таблица 13)

Таблица 13. Средни стойности на получените резултати от хормонални нива на пациенти със спонтанен аборт, повтарящи се имплантационни неуспехи и контролна група.

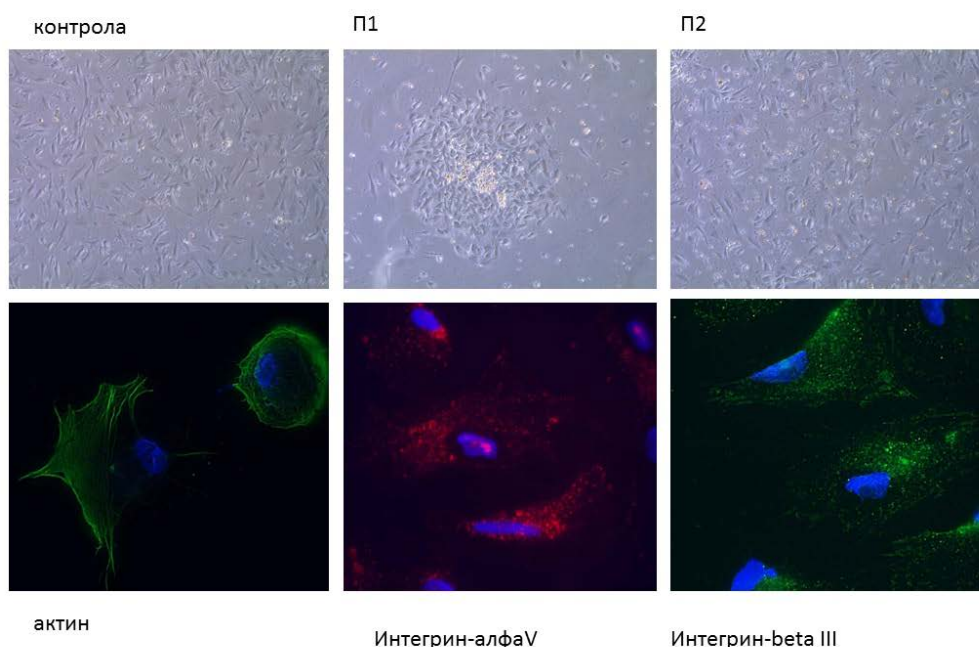
	E2	P4	Cortisol	AMH
Спонтанен аборт N=15	217,46	7,73	692,7	0,3425
RIF N=8	258,075	3,04	839,8	0,2935
Контролна група N=8	319	1,3	223,3	0,318

- ***Растеж и морфологична оценка на първични култури от ендометриална тъкан***

Стромата на ендометриума предсравлява съединителна тъкан, съставена от клетки и сложен по състав на макромолекули, растежни фактори и паракринни регулатори извънклетъчен (екстрацелуларен) матрикс, съдържащ фибриларни компоненти и нефибриларен компонент (основна субстанция). За извънклетъчния матрикс на ендометриума се знае много. Промените в състава на извънклетъчния матрикс се отразяват върху динамичната структура на стромата (Edwards, 1995) (Aplin, 2008). Стромалните клетки са фибробластоподобни клетки, отговорни за производството на повечето от компонентите на матрикса. Други клетъчни типове, включват свободни клетки с произход от моноцитния и лимфоидния ред, NK клетки. През един нормален менструален цикъл, стромалните клетки претърпяват различни морфологични изменения - пролиферация, диференциация и матурация (узряване). През ранната пролиферативна фаза стромалните клетки наподобяват недиференцирани фибробласти с мезенхимни характеристики. С прогресиране на фазата, те все повече започват да наподобяват фибробласти. Стромалните клетки участват в ремоделирането на извънклетъчния матрикс по време на менструалния цикъл, а първите морфологични доказателства за тази дейност се виждат около периода на овулацията.

Рецептивността на ендометриума зависи от излагането му на естроген и след него на прогестерон. Тези хормони действат основно чрез ядрените рецептори естроген рецептор α (ER α), ER β , прогестерон рецептор α (PR α) и PR β , съответно, които действат, променяйки генната транскрипция (DeMayo et al., 2002)

(Имунохистохимични изследвания, използващи антитела, специфични за всеки клетъчен подтип, са показали, че при LH+3 ER и PR подтипове, се експресират в епителни и в стромални клетки. Двата рецептора намаляват в епитела в началото на имплантационния прозорец, поради влиянието на прогестерона (Slayden et al., 1998) В същото време, епителните клетки експресират много секреторни протеини и клетъчни повърхостни маркери, които са важни за рецептивността. В някои случаи тези ефекти върху епителните клетки, са медиранни чрез рецепторите за прогестерон на стромалните клетки (Kurita et al., 2000).



Фигура 9: Клетъчни култури, наблюдавани под фазов контраст на инвертен микроскоп. Горен ред: първични клетъчни култури (2-5 ден преди трипзинизация) изолирани от биопсичен материал (фазов контраст 20x; Leica Dmi1); визуализация на актин (Phalloidin Atto 488 (Sigma) + Hoechst 33342 (Sigma)); визуализация на интегрин αV (mouse anti-human anti-integrin αV – Alexa 594-L-230, 1:100) + Hoechst 33342 (Sigma); интегрин βIII (mouse anti-human anti-integrin βIII – Alexa 488, 1:100) + Hoechst 33342 (Sigma) (Delta Vision Ultra™ GE Healthcare, 63x)

За оценка на биопсичния материал са използвани смесени ендометриални култури – бързо растящи и достигащи конfluence на 4-5 ден. В някои от културите

се наблюдава инфилтрация на лимфоидни клетки с интимни комуникации между стромалните фибробласти и лимфоцитите (Фиг. 9). Тези лимфоидни инфилтрации постепенно се загубват в процеса на култивиране. Липсата им се доказва чрез установената чистота на популациите чрез извършения FACS анализ (Фиг. 10). Посредством имунофлуоресценция при използване на белязани специфични антитела, в културите се установява експресия на интегрин $\alpha\beta 3$, характерен за периода на повишена възприемчивост на ендометриума. Поради малкият брой контролни клетъчни култури не може да се потвърди наличието на различие в стромалната експресия на интегрин $\alpha\beta 3$, в полза на което съществуват публикувани данни (Ceydeli et al., 2006).

Третиране на стромални клетки с прогестерон стимулира секрецията на хепарин свързващ епидермален растежен фактор (HB-EGF, heparin binding epidermal growth factor), който може да действа върху епитела, индуцирайки експресията на $\alpha\beta 3$ (Lessey et al., 2000)). Следователно, стероидите могат, да действат директно върху таргетната клетка или косвено, чрез стимулиране на паракринни медиатори в близкостоящата строма или епител.

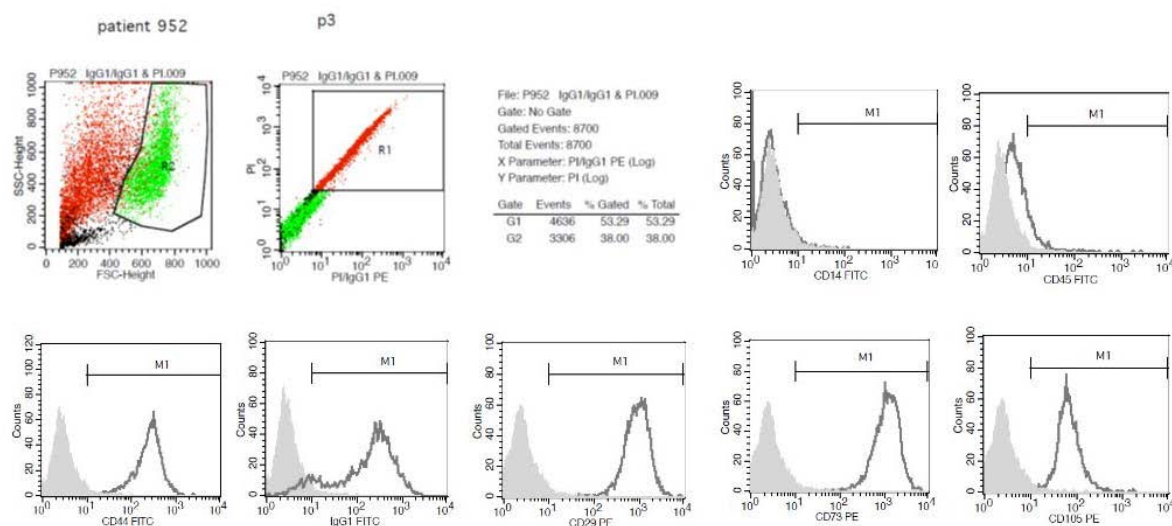
Интегрините са хетеродимерни CAMs, които служат като рецептори за ЕСМ или клетъчни повърхностни лиганди (като колаген, ламинин, фибронектин) и действат като модулатори на ендометриалната и ембрионалната функция. $\alpha\beta 3$ интегрин например участва в трансдукцията на сигнали от разтворими лиганди като остеопонтин (Humphries, 2000). Те са може би най-добрите имунохистохимични маркери, характеризиращи рецептивността на матката (Lessey, 1998). В репродуктивния тракт има повишено ниво на интегрини. Натрупващите се данни предполагат участието им както в оплождането, така и в имплантацията (Daniel D. Carson, 2000) Ендометриумът показва комбинация от конститутивна и цикъл-зависима интегринова експресия (Lessey et al., 1992).

- *Характеризиране на клетъчни маркери в култури от ендометриални клетки*

Посредством флоуцитометричния анализ културите се доказват като типични стромални фибробласти с мезенхимен произход. Изследването на стромални клетъчни маркери за характеризиране на ендометриалните клетки изолирани от биопсичен материал бяха извършени със съдействието и експертизата на доцент Цветелина Орешкова-Велева от ИБИР-БАН, на апарат FACS Calibur BD. Резултатите са получени

и анализирани със специален софтуер (BD CellQuest Pro, FACStation Macintosh). Отделни проби от клетки на различни пациенти на 10 ден от култивиране (след трипсинизация и не по-малко от 1×10^6 клетки в $100 \mu\text{l}$) бяха инкубирани със специфични антители, измити, утаени и незабавно измерени.

Резултатите за експресията на панел от специфични клетъчни маркери са представени на фигура 10



Фигура 10: Експресия на стромални маркери в биопсичен материал култивиран в продължение на 10 дни (представителен анализ за един пациент)

В двупараметровата хистограма е показана хомогенността на популацията на анализираните клетки по отношение жизненост и размери. В два цвята е обозначено разпределението на живи (зелени) и мъртви клетки (червени). Средно добивът на живи клетки в зависимост от конfluентността на културата варира между 35-60 %. FACS анализът на експресията на панел от молекулни маркери в култивираните ендометриални клетки от пациенти не показва отклонения от наличието на характерни за стромални, мезенхимни по произход клетки. Липсва наличието на маркери характеризиращи моноцитния и лимфоцитния ред (CD14, CD45), като експресията на CD44, CD73, CD29 и CD 105 е добре представена. Експресията на CD90 е частично понижена в сравнение със стволови мезенхимни клетки, което може да бъде обяснено с напредваща диференциация в процеса на култивиране.

Важен участник в динамичните процеси по време на имплантацията и при оформяне на плацентата са стромалните фибробласти и макрофагите. Мезенхимните

фибробласти са разположени в стромата на вилите между трофобластите и феталните кръвоносни съдове. Основна функция на макрофагите привлечени в стромата на тъканта е фагоцитоза на апоптирвали тела и клетъчни остатъци като част от нативния клетъчен имунитет. Стромалните фибробласти и макрофагите в ендометриума на майката подпомагат трофобластната диференциация и неоангиогенезата, като продуцират редица растежни фактори и цитокини, между които с особено значение VEGF и интерлевкин-1 β (IL-1 β). Тези молекули действат като медиатори, отговорни за фоликулогенезата и овогенезата, зреенето на жълтото тяло и нарастването на васкуларния пермеабилитет. Диференцирането на макрофагите и насочването на про-или антиинфламаторен локален отговор се влияе от своя страна от балансираното въздействие на адаптивни имуноендокринни сигнални вериги в отговор на външни стимули (начин на живот, диета, инфекции, психоендокринни и метаболитни смущения).

3.2. Оценка на генетичен имунологичен профил

- *Експресионен анализ и количествено определяне на възпалителни маркери*

Получените резултати от експерименталното проучване са количествено определяне нивата на експресия на инфламаторни маркери при 15 здрави пациенти и 171 с повтарящи се имплантационни неуспехи и спонтанни аборти.

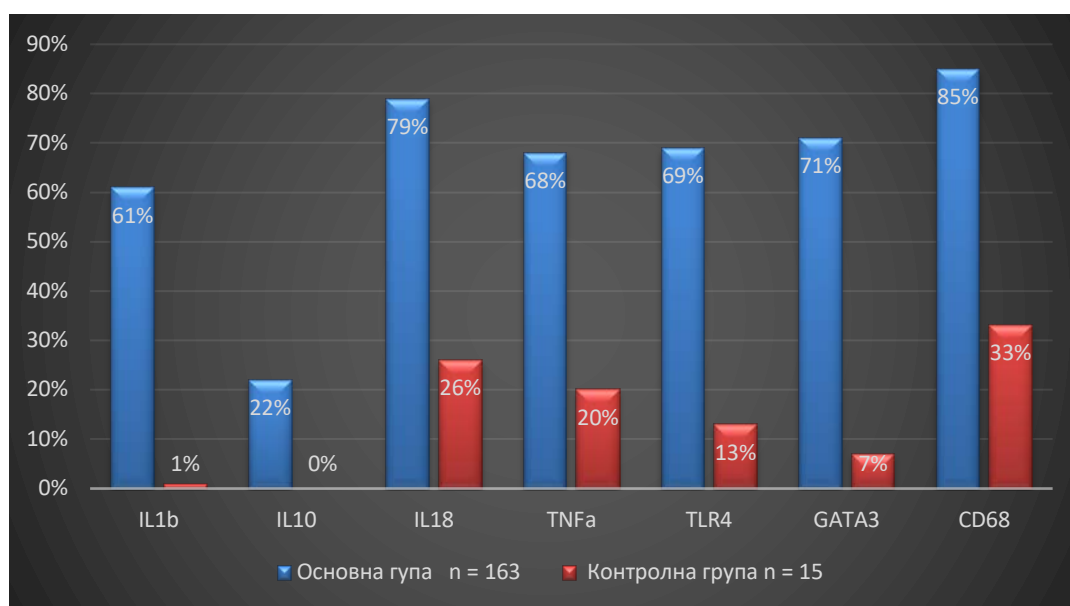
Системният ход на генетичният анализ включваше следните стъпки:

- Обратен транскрипционен метод с полимеразно верижна реакция (PCR) Обратната транскриптаза (RT), известна още като РНК-зависима ДНК полимераза, е ензим на ДНК полимераза, който транскрибира едноверижна молекула РНК в ДНК.
- Количествен експресионен анализ с полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR- анализ) за определяне нивата на експресия на 7 възпалителни маркери (IL1 β , IL10, IL18, TNF α , TLR4, GATA3, CD68) и вътрешна контрола B2M, показваща нивата на получения след екстракцията генетичен материал.
- Анализ на данните.

Последователността на изследванията, проведени в рамките на настоящия дисертационен труд, се основаваше на литературни данни и връзката на възпалителните маркери с репродуктивни нарушения. В хода на генетичния анализ получихме следните резултати: (Таблица 14 и 15)

Таблица 14: Разпределение на случаите с високи нива на експресия при пациенти с репродуктивни неуспехи (общо) и при контролната група. (p < 0.002)

Маркер	Основна група n = 163	Контролна група (n = 15)
<i>IL1b</i>	61%	1%
<i>IL10</i>	22%	0%
<i>IL18</i>	79%	26%
<i>TNFa</i>	68%	20%
<i>TLR4</i>	69%	13%
<i>GATA3</i>	71%	7%
<i>CD68</i>	85%	33%



Фигура 11. Процентно разпределение на случаите с високи нива на експресия при пациенти с репродуктивни неуспехи (общо), сравнени с контролната група

Таблица 15: Разпределение на случаите с високи нива на експресия при основната група пациенти (Подгрупа 1А - спонтанни аборти и Подгрупа 1Б - неуспешни имплантации) и при контролната група.

Ген	Основна група n = 163		Контролна група (n = 15)	p2	p3
	Подгрупа1А. n = 90	Подгрупа1Б n = 73			
<i>IL1b</i>	56 (62%)	42 (58%)	1(7%)	0,001	0,07
<i>IL10</i>	21 (23%)	15 (21%)	0	0,3	0,14
<i>IL18</i>	68 (76%)	61 (84%)	4 (26%)	0,001	0,001
<i>TNFa</i>	57 (63%)	54 (74%)	3 (20%)	0,004	0,032
<i>TLR4</i>	60 (67%)	53 (73%)	2 (13%)	0,014	0,03
<i>GATA</i> 3	65 (72%)	52 (71%)	1 (7%)	0,004	0,012
<i>CD68</i>	75 (83%)	63 (86%)	5 (33%)	0,004	0,004
<i>B2M</i>	90 (100%)	90 (100%)	15 (100%)		

Анализът на концентрациите на цитокини/хемокини в ендометриума показва статистически значимо по-високи нива на IL1b, IL18, TNF α , GATA3 и CD68 от взети проби в лутеална фаза при експерименталната група (пациенти), в сравнение с тази на контролната група. (P<0.001).

Интересен факт е, че най-съществена разлика в нивата на експресия между пациенти и контроли, бе наблюдавана при маркера CD68. (p <0.004) Също така направи впечатление, че по отношение на анти-инфламаторния цитокин IL10, не се откри статистически значима разлика в експресията между двете групи.

Експресията на TNF- α , ранен провъзпалителен цитокин, свързан с увреждане и възстановяване на тъканите, също е значително по-висока в пробите от пациентската група, в сравнение с тази на контролната група.

3.3 Изследване +405 G/C полиморфизъм в гена за VEGF в българска популация на жени с репродуктивни проблеми

VEGF е високо специфичен митоген под контрола на LH и FSH, който индуцира пролиферацията на ендотелните клетки, тяхната миграция и инхибира апоптозата. В резултат на което те могат да участват в модулиране на ангиогенезата чрез изменения в секрецията и на анти-ангиогенни посредници, какъвто е напр. рецепторът на съдовия ендотелен растежен фактор (sVEGFR-1, или sflt-1). Той се асоциира често със загуба на плода при евентуална бременност, което основава необходимостта от комплексно изследване на имуноендокринните взаимодействия контролиращи тези процеси.

По време на настоящото проучване беше извършено изследване на SNP полиморфизъм (+405 G/C) в гена за *VEGF* и асоцирането му с повтарящи се имплантационни неуспехи и спонтанни аборти в асистираната репродукция, патологии, свързани с женското репродуктивно здраве. Съвременните методи за анализ на известни точкови мутации в човешкия геном, наричани SNP полиморфизми, се основават на специфична амплификация на участъка от генома, който подлежи на изследване чрез класическа полимеразна верижна реакция (PCR), последвана от рестрикционен анализ (RFLP) или секвениране, или чрез real-time PCR (qPCR) генотипиране с две специфични сонди, които разграничават дивия от мутантния генотип.

Последователността на изследванията проведени в рамките на настоящият дисертационен труд се основаваше на литературните данни за VEGF гена и +405 G/C полиморфизма. Системният ход на генетичният анализ включваше следните стъпки:

- полимеразна верижна реакция (PCR- анализ) за откриване и намножаване на търсеният фрагмент състоящ се от 469 базови двойки (bp);
- рестрикционен анализ (RFLP) чрез Real time PCR генотипиране с две сонди, разграничаващи дивия от мутантния тип;
- секвениране по метода на Сенджър- BigDye Terminator (техника с флуоресцентно белязани терминаторни ди-дезоксинуклеотиди) за доказване на достоверността на получените резултати от генотипиране чрез RFLP-метода;
- анализ на данните.

- **Оптимизиране на условията на полимеразна верижна реакция (PCR)**

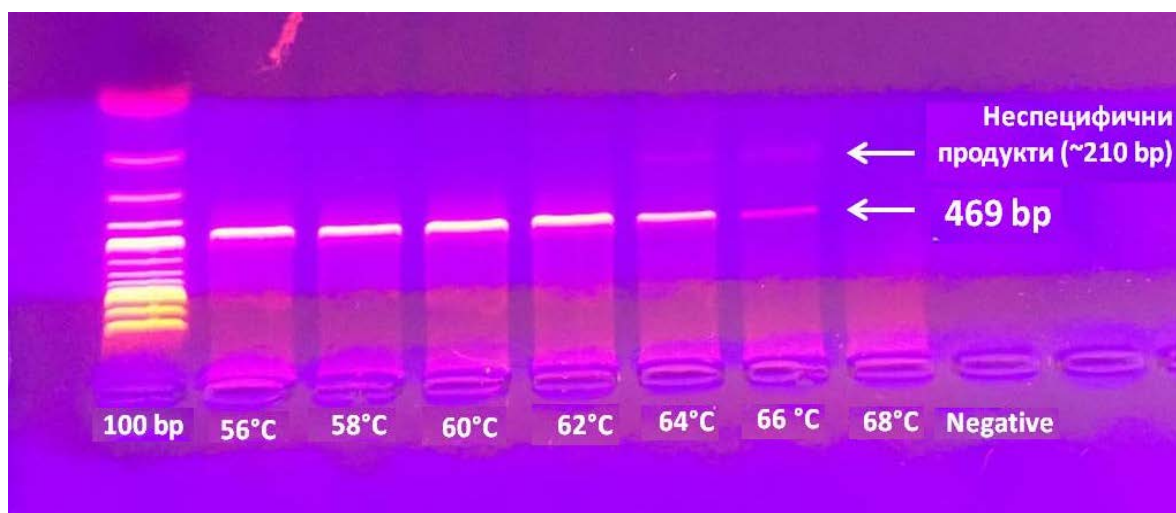
За оптимизиране на реакционните условия за PCR бяха направени общо 50 анализа на изолирана от контролната и пациентската група геномна ДНК с подходяща концентрация и интегритет. Последните бяха определени спектрофотометрично и електрофоретично. Концентрацията на всички изолирани ДНК проби беше между 100 и 160нг/мкл, а интактността им- удостоверена в 0.8% агарозен гел (*Фигура 12*)



0.8% агарозен гел/ TBE/ 105V

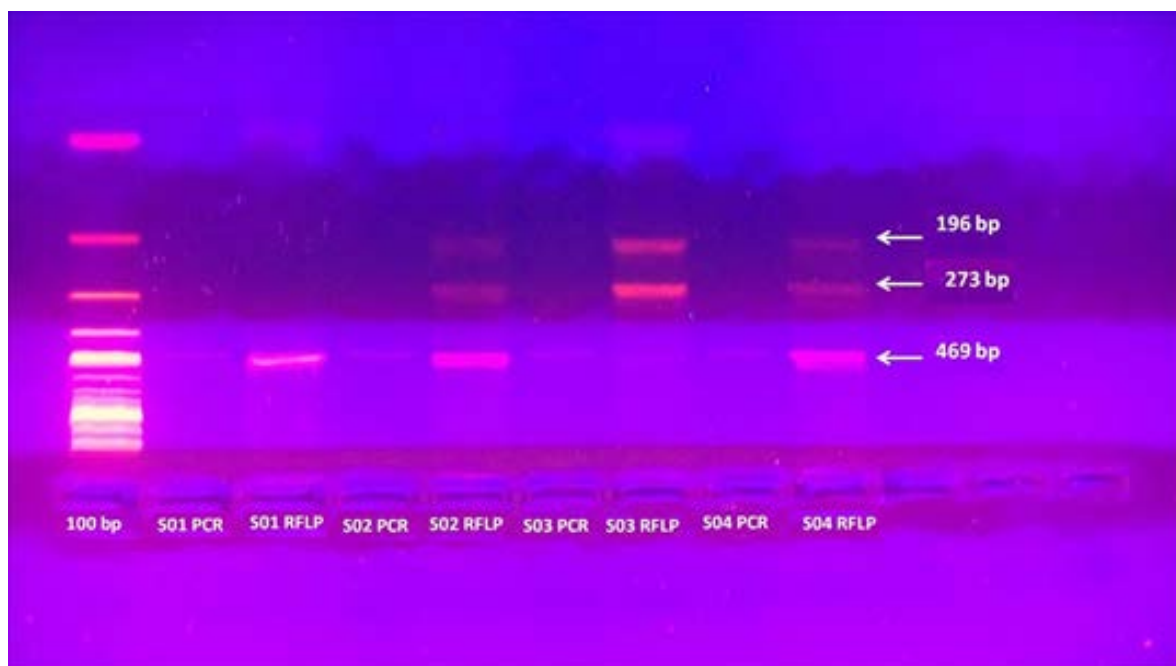
Фигура 12. Доказване на интактност на геномна ДНК в 0.8% агарозен гел (представителна извадка - проби RFLP08, RFLP010, RFLP023, RFLP041)

На *Фигура 13* са представени получените продукти за всяка от седемте различни PCR реакции (представителна извадка). Очакваният специфичен PCR продукт е с големина 469 базови двойки (bp). Той не се получава при температура на хибридизация на праймерите 68°C. При хибридизационни температури 66°C и 64°C ясно се вижда присъствието на неспецифичен продукт с големина около 210 бази. Най-богат и специфичен е добивът на 469bp продукт при 62°C и 60°C. На базата на получените резултати за оптимална се прие температурата от 62°C.



4% агарозен гел/ ТВЕ/105V

Фигура 13: Резултат от PCR реакция при различни температури на хибридизация на праймерите.



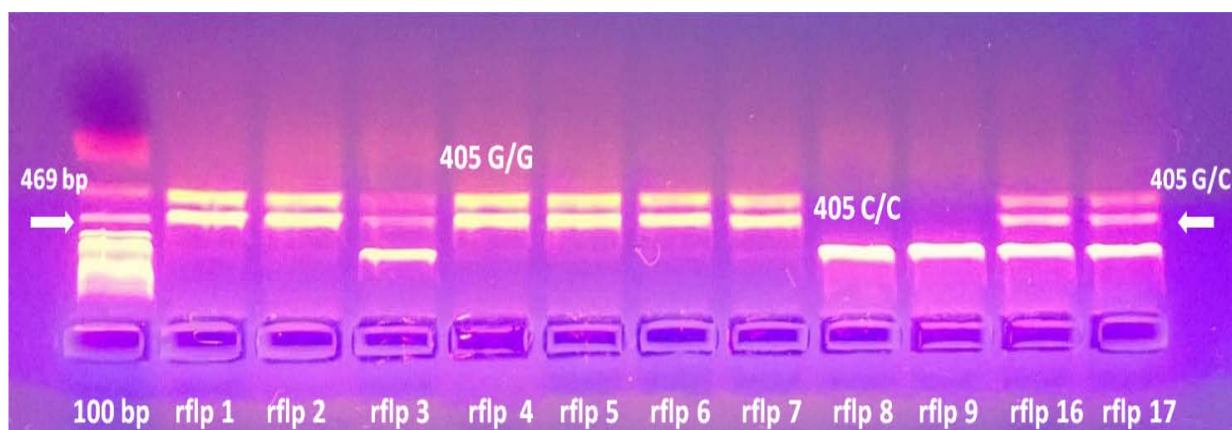
4% агарозен гел/ ТВЕ/ 105V

Фигура 14А: Резултати от рестрикционен (RFLP) анализ на контролни проби с различни VEGF-A +405G/C генотипи. Използвани са за стандарти.

- **Рестрикционен анализ**

При генотип G/G, BsmFI ензимът срязва специфичният PCR продукт (469bp) и се получават два по-къси фрагмента-273bp и 196bp. При генотип C/C, ензимът не срязва специфичния PCR продукт (469bp). При генотип C/G, ензимът срязва едната верига, а другата остава интактна, при което на агарозен гел се установяват три фрагмента -469bp, 273bp и 196bp (Фигура 14А и 14В).

Представителна извадка на резултатите при пациентите от рестрикционния анализ са представени на фигура 14. За достоверност на резултатите използвахме стандартите, показани на фигура 13.

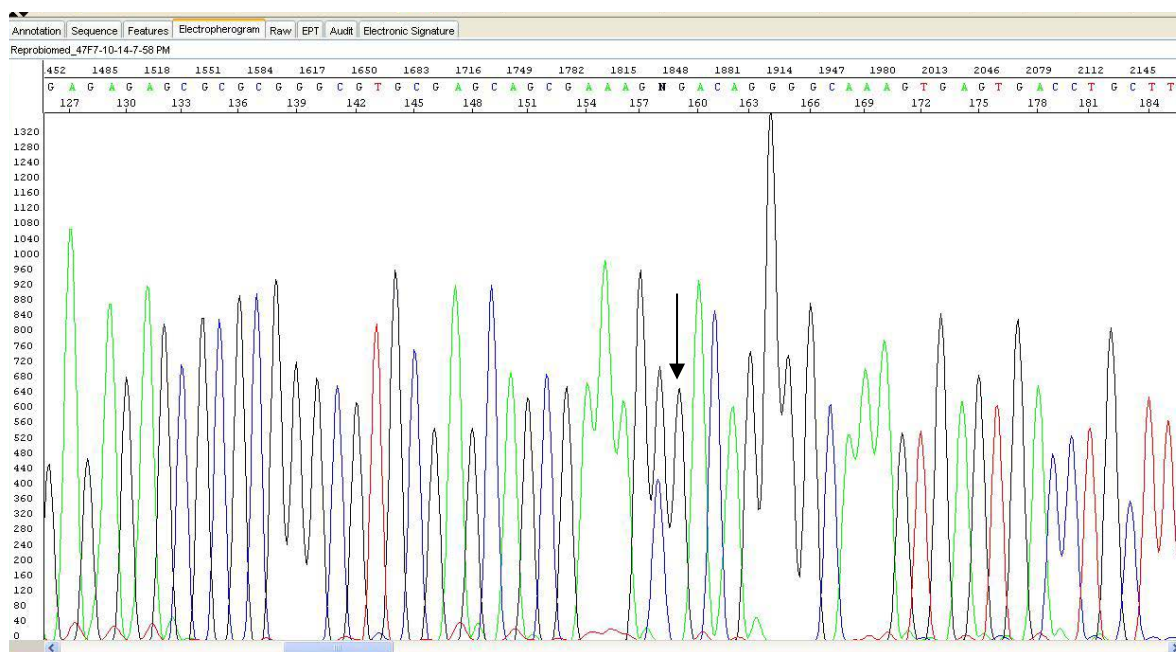


Старт №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Проба	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S16	S17
Генотип	100 bp маркер	G/G	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/G	C/G

Фигура 14В: Резултати от рестрикционен (RFLP) анализ на част от пациентите, имащи различни +405G/C генотипове.

- **Секвенционен анализ по метода на Сенджър на трите генотипа за VEGF A**

Представените резултати от секвениране на всеки един от трите генотипа за VEGF A гена, доказват достоверността на получените резултати от рестрикционния анализ. Данните от секвенирането са обработени със софтуер Sequencing Analysis във вид на електрофореграми, като трите генотипа са показани на фигура 15 А, Б, С;



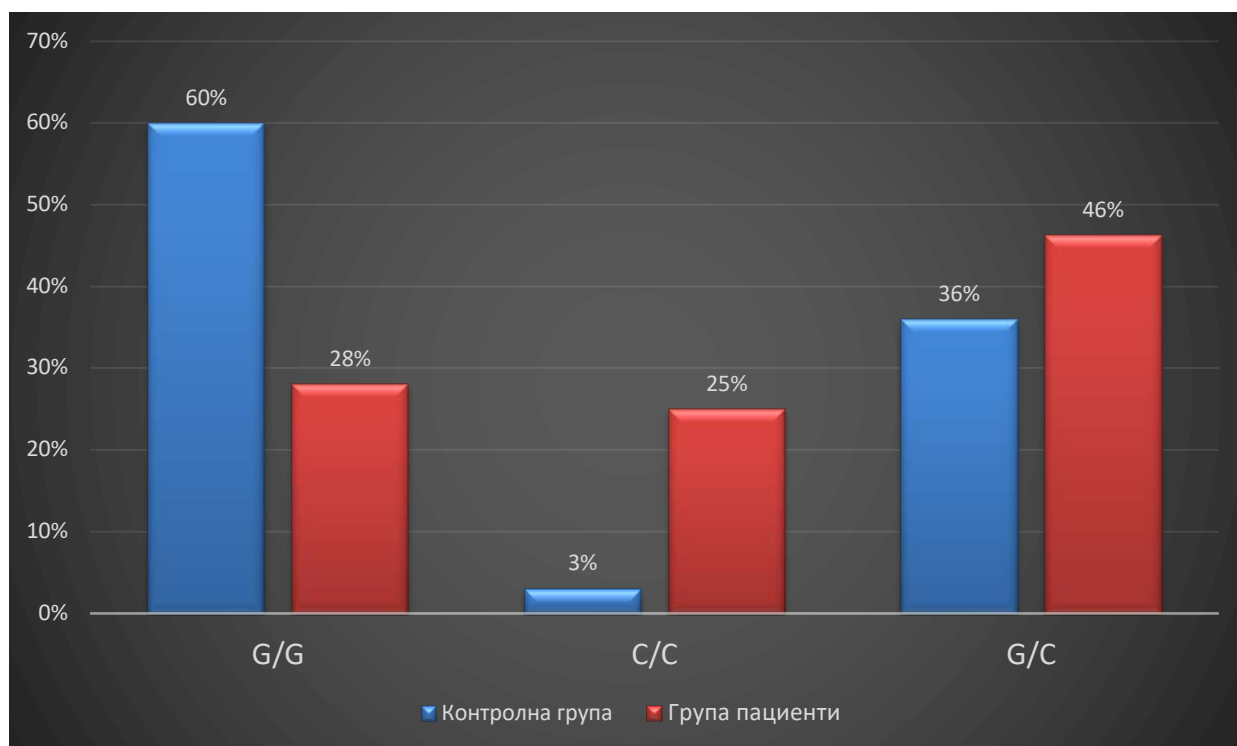
Фигура 15С: Електрофореграма, показваща хетерозигот VEGF-A +405G/C (стрелката).

• **Статистически данни**

Резултатите и съответните честоти на VEGF +405G/C полиморфизма при пациентите с патологични нарушения и контролната група са представени в таблица 16. Съществува статистически значима разлика между двете групи, включени в настоящото изследване. VEGF+405 C/C генотипът е открит в голяма част от пациентите страдащи от репродуктивни нарушения, в сравнение с контролната група (25% и 3%, съответно, OR=0.12, 95% CI [0.01; 0.09], $p=0.04$).

Таблица 16: Генотипна честота на VEGF +405 G/C полиморфизма при пациенти с патологични изяви и контролна група.

Полиморфизъм	Пациенти с RIF, спонтанни аборти n=164	Контролна група n=33	p-value	OR-95%CI
GG	28%	60%	NA	1.78 [0.69;4.60]
CC	25%	3%	0.04	0.12 [0.01;0.95]
GC	36%	46%	0.34	1.27 [0.48;3.32]

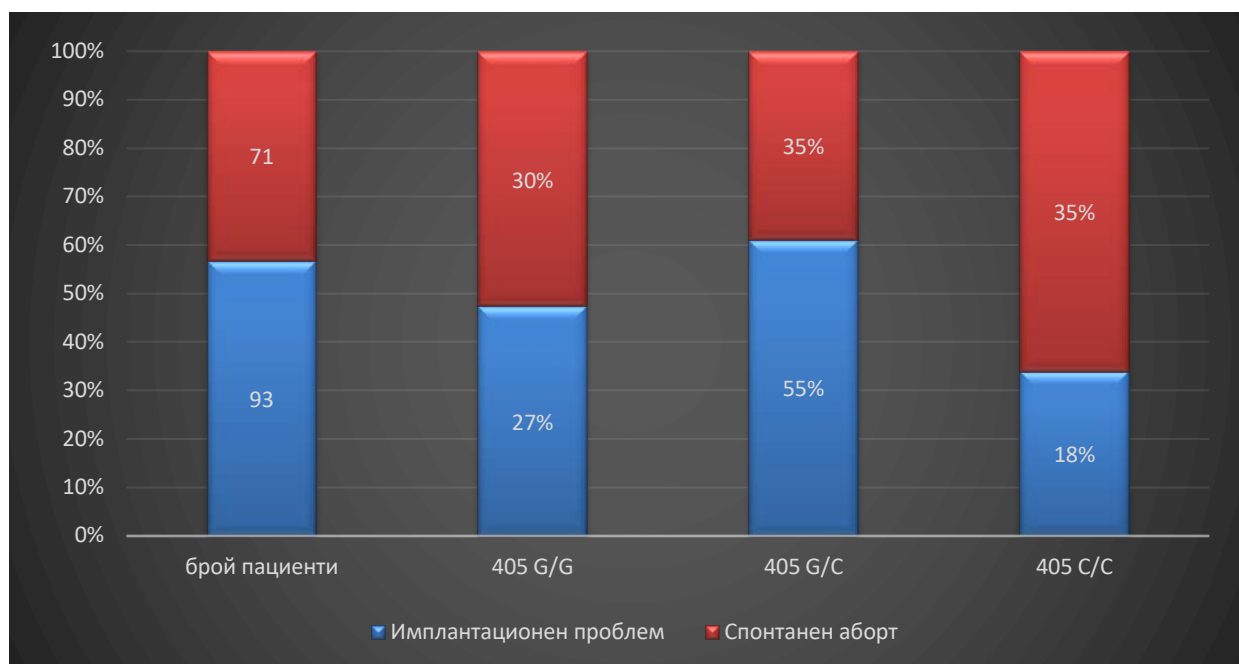


Фигура 16: Процентно разпределение на генотипната честота на VEGF-A +405 G/C полиморфизма при пациенти с патологични изяви и контролна група.

В таблица 17 и фигура 17 са представени и сравнени генотиповете на пациенти с повтарящи се имплантационни неуспехи и групата със спонтанни аборти. Честотата на +405 C алела е най-висока при пациенти, имащи един или няколко спонтанни аборта (n=71, 35%), следвана от групата пациенти с повтарящи се имплантационни неуспехи. (n=93, 18%).

Таблица 17: Генотипни честоти на VEGF-A +405 G/C полиморфизма при пациентите с нарушения, включени в настоящата работа.

	брой пациенти	405 G/G	405 G/C	405 C/C
Имплантационен проблем	93	27%	55%	18%
Спонтанен аборт	71	30%	35%	35%



Фигура 17: Процентно разпределение на генотипните честоти на пациентите с нарушения

- **Сравнение на серумните нива на естроген, прогестерон и кортизол с VEGF 405 G/C получените варианти**

За да проверим дали има връзка между някои стероидни хормонални нива и VEGF-изследвания полиморфизъм от генетичния анализ, сравнихме средните серумни нива на прогестерон, естрадиол и кортизол при избрана група с 3 различни хаплотипа от VEGF 405 изследвания полиморфизъм.

Няма намерена връзка между серумните концентрации на естрадиол, прогестерон и кортизол и изследвания полиморфизъм във VEGF.

Таблица 18: Сравнителна извадка между хормоналните серумни нива и трите хаплотипа от VEGF 405 G/C полиморфизма.

	405 G/G, N=11	405 G/C, N=12	405 C/C, N=3
E2 (pmol/l)	226	273,4	395, 8
P4 (nmol/l)	6,04	0,98	17,7
Cort (nmol/l)	582,8	553	789,13

3.4. Физиологично значение на рецептори за мелатонин в репродуктивната система при жената

При човека хроничното излагане на изкуствена светлина по време на тъмната фаза от денонощието има неблагоприятно въздействие върху организмовите системи вследствие промяна на денонощния профил на ендогенната мелатонинова секреция. В редица случаи това е свързано с нарушения в метаболитната и ендокринната регулация. Десинхронизацията на циркадните ритми настъпваща при хроничен неблагоприятен светлинен режим и променен мелатонинов ритъм вероятно е важна причина за установени смущения на надбъбречната ос и адаптацията към стрес (Konakchieva et al., 1997, 1998; Tomova et al., 2008), промени в имунната реактивност (Taushanova et al. 2007, Tomova et al. 2008), хиперинсулинемия и инсулинова резистентност (Seto-Young, Avtanski, Varadinova, et al., 2011), свързани с репродуктивни нарушения и при двата пола.

Периферните нива на мелатонин при хората изразяват значителни индивидуални флукуации и зависят от възрастта, репродуктивния статус и наличието на психосоматични нарушения (Tomova et al., 2008). Мелатонинът е хронобиологичен агент и поне при фотопериодичните видове сигналът, чрез който контролира репродукцията, е свързан с неговата нощна секреция. При човека, промененият стереотип в ежедневната светлинна експозиция вследствие съвременния начин на живот, предизвиква десинхронизация на циркадните ритми при някои индивиди и вероятно е важна причина за установените хиперинсулинемия, репродуктивни смущения и повишена честота на сърдечно-съдови заболявания (Karlsson et al., 2005; Knutsson, 2003) (Tomova et al., 2008).

- ***Асоцииране на полиморфизмите rs1562444, rs10830962 and rs10830963 в гена MTNR1B с имплантационни неуспехи при жени от българската популация***

Периферните нива на мелатонин при хората изразяват значителни индивидуални флукуации и зависят от възрастта, репродуктивния статус и наличието на психосоматични нарушения (Tomova et al., 2008) Изменения в мезора или амплитудата на ендогенния циркаден профил на секреция на хормона са наблюдавани в асоциация с редица заболявания като шизофрения, депресия, хипоталамична аменорея, анорексия

нервоза, както и редица тумори (Brzeziński et al., 1996); (Tomova et al., 2008) Мелатонинът е хронобиологичен агент и поне при фотопериодичните видове сигналът, чрез който контролира репродукцията, е свързан с неговата нощна секреция. Значението на рецептивността към външни сигнали осъществявана посредством съответни специфични рецептори добива все повече актуалност. Точкови мутации в гените кодиращи рецепторни протеини или растежни фактори свързани с имуноендокринна регулация все повече са обект на проучвания като в редица случаи се доказва значението на определни полиморфизми за дадено заболяване. В случая с полиморфни варианти на гените кодиращи MT1 и MT2 се свързват повишена чувствителност към редица заболявания на имунната система, сърдечно-съдов риск, включително и репродуктивни тумори (Tanev et al., 2016).

В настоящото проучване беше извършено изследване на SNP полиморфизми (rs1562444, rs10830962 and rs10830963) в гена за *MTNR1B* при здрави жени и такива с повтарящи се имплантационни неуспехи в процедури по асистирана репродукция и спонтанни аборти. Системният ход на генетичният анализ включваше следните стъпки:

- полимеразна верижна реакция (PCR- анализ) за откриване и намножаване на търсеният фрагмент състоящ се от 210, 125 и 400 базови двойки (bp);
- рестрикционен анализ (RFLP) чрез Real time PCR генотипиране с две сонди, разграничаващи дивия от мутантния тип;
- анализ на данните.

1. Последователността на изследванията, проведени в рамките на настоящият дисертационен труд се основаваше на литературни данни за *MTNR1B* и връзката му с репродуктивни нарушения. В хода на генетичният анализ получихме следните резултати:

В резултат на полимеразно верижния анализ, замяната G>C при рецептора rs10830962, замяната C>G при рецептора rs10830963 и A>G при рецептора rs1562444 води до създаване на рестрикционно място и получаването на два типа алели (фиг.18):

- G>C rs10830962

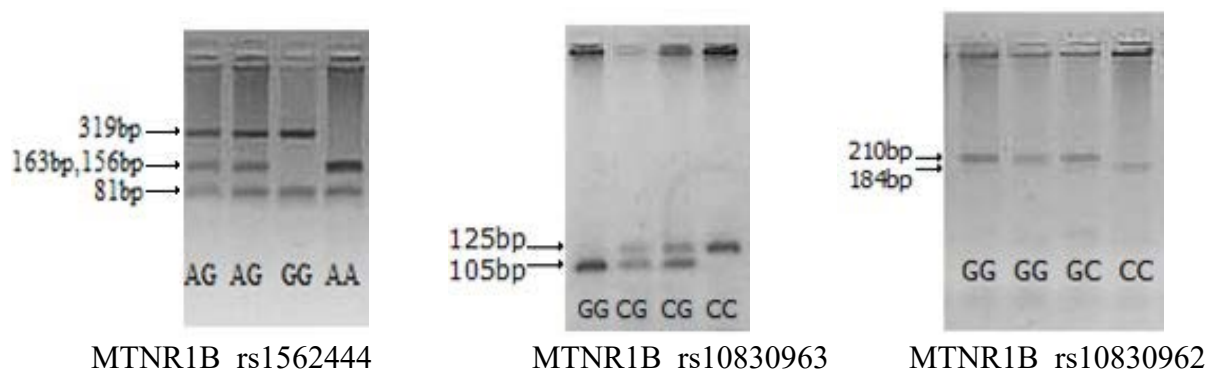
Липсата на място, разпознавано от съответния ензим за rs10830962 G/C беше обозначено като алел G - дължина от 210 bp, наличието на рестрикционно място, като алел C - получени фрагменти с дължина 184 bp и 26 bp;

- C>G rs10830963

По отношение на rs10830963 C/G рецепторния полиморфизъм, дължините на наблюдаваните фрагменти бяха 105 bp и 20 bp (при алел G) и 125 bp (при алел C);

- A>G rs1562444

При обработката на амплифицирания продукт с големина от 400 bp за полиморфизма rs1562444 A/G с ендонуклеазата NlaIII се получават 2 фрагмента (319 bp и 81 bp). Замяната A>G създава допълнително рестрикционно място за използваната ендонуклеаза, при което се отчитат 3 различни генотипа: G/G (с фрагменти с дължина 319 bp и 81 bp), G/A (с фрагменти с дължина 319 bp, 163 bp, 156 bp и 81 bp) и A/A (163 bp, 156 bp и 81 bp).



Фигура 18: Получени PCR продукти след RFLP анализ за трите полиморфизма в гена за MTNR1B

• **Статистически данни и сравнителен анализ**

Резултатите и разпределението на генотипа на MTNR1B полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 не показва сигнификантна разлика между пациенти с репродуктивни нарушения (спонтанни аборти или неуспех на имплантиране) и контролната група жени с поне едно раждане (Таблица 19)

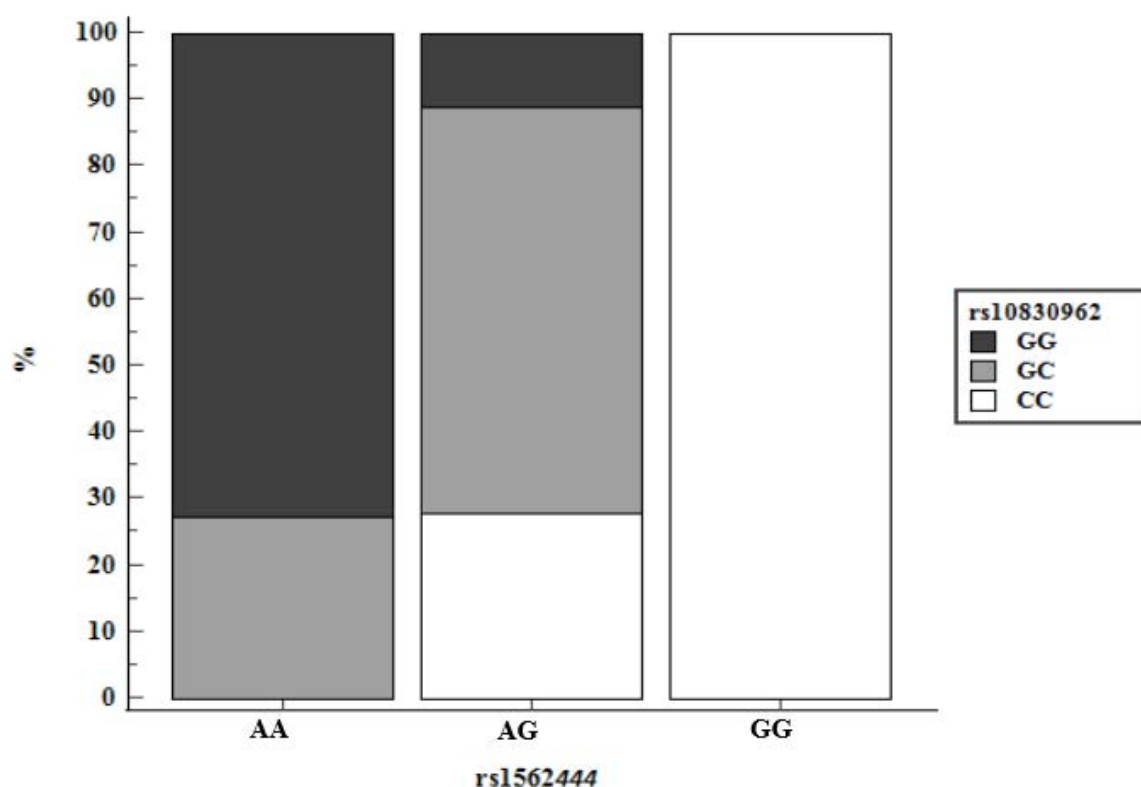
Таблица 19: Генотипна честота на полиморфизмите на MTNR1B rs1562444, rs10830962 и rs10830963 при пациенти с репродуктивна недостатъчност (спонтанни аборти или неуспех на имплантиране) и жени с поне едно раждане; p - разлики между жени с репродуктивна недостатъчност и жени с поне едно раждане.

MTNR1B полиморфизъм	Генотип	Жени с репродуктивна недостатъчност N=35	Жени с поне едно раждане N=36
rs1562444 p=0.961	AA	30.3%	33.3%
	AG	51.5%	50.0%
	GG	18.2%	16.7%
rs10830962 p=0.470	CC	20.6%	29.4%
	CG	55.9%	41.2%
	GG	23.5%	29.4%
rs10830963 p=0.517	CC	55.9%	42.9%
	CG	35.3%	48.6%
	GG	8.8%	8.6%

Разпределението на генотипа на MTNR1B полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 при пациенти с репродуктивна недостатъчност (спонтанни аборти или имплантационна неуспех) е подобно на описаното при здрави българки (Tanev et al., 2016) ($p > 0.5$). Пациенти с един или повече спонтанни аборта ($n=15$) не се различават от жените с имплантационна недостатъчност ($n=20$) по отношение на изследваните полиморфизми на MTNR1B ($p > 0,05$ за всички). Всички пациенти с повтарящи се аборти (RPL) ($n=7$) са с rs1562444 (AG) или (GG), но без (AA) генотип, докато при други пациенти от женски пол разпространението на rs1562444 AA генотип е 38,5% ($p=0,073$). Не са установени разлики в генотипното разпределение на

полиморфизмите на MTNR1B rs10830962 или rs10830963 между жени с RPL и други пациенти ($p > 0,05$ за всички). Разпределението на трите полиморфизма показва неравновесие на връзката при здрави жени. Жените с rs1562444 AA генотип имат съпътстващ генотип rs10830962 GG значително по-често от други генотипове, докато жените с генотип rs1562444 GG обикновено са с генотип rs10830962 CC ($p < 0.001$) (Фиг.20). Наличието на хаплотип rs1562444 AA / rs10830962 GG е значително по-рядко при жени със спонтанни аборти или неуспех на имплантиране, отколкото при жени с поне едно раждане (2,9% срещу 22,2%, $p = 0,028$). Наличието на хаплотип rs1562444 GG / rs10830962 CC не е значимо свързано с репродуктивни неуспехи ($p > 0,05$).

Наличието на генотип rs1562444 GG обикновено се свързва с наличието на генотип rs10830963 CC ($p = 0,003$). Комбинираният хаплотип rs1562444 GG / rs10830963 CC не е свързан с репродуктивната недостатъчност ($p > 0,05$). Разпределението на генотипа на rs10830962 и генотипното разпределение на rs10830963 също са свързани ($p = 0,001$), но не са установени асоциации на комбинираните генотипове с разпространението на спонтанни аборти и/или неуспех на имплантиране ($p > 0,05$ за всички).

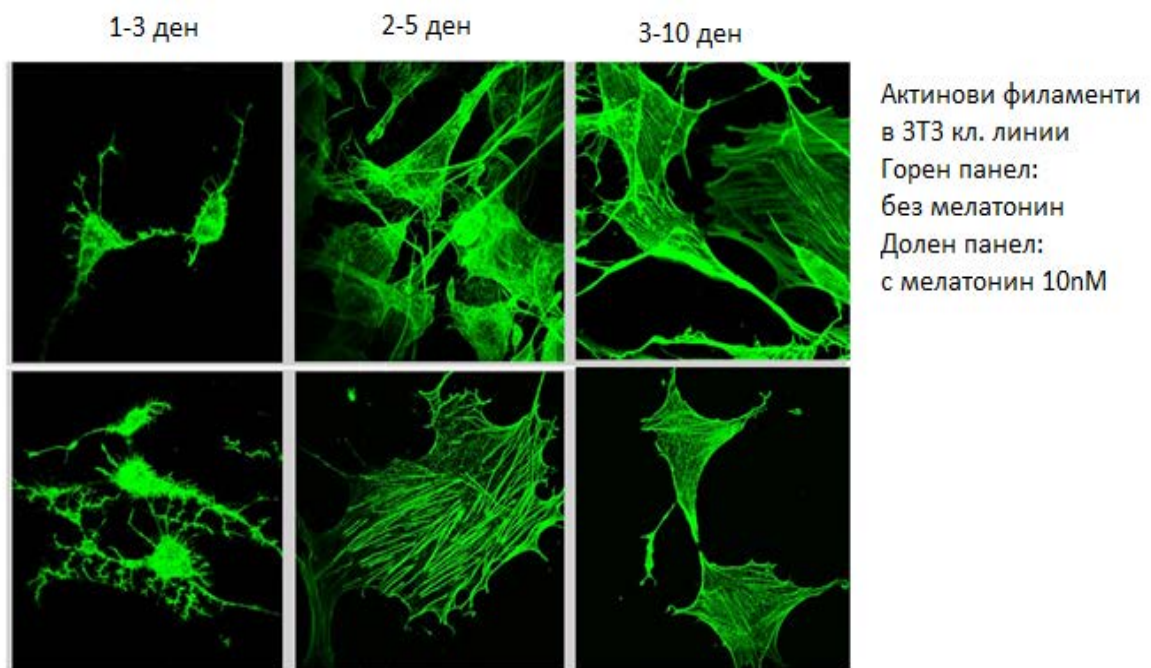


Фигура 19: Асоциации между *MTNR1B* полиморфизмите *rs1562444* и *rs10830962* при здрави жени ($p > 0,001$)

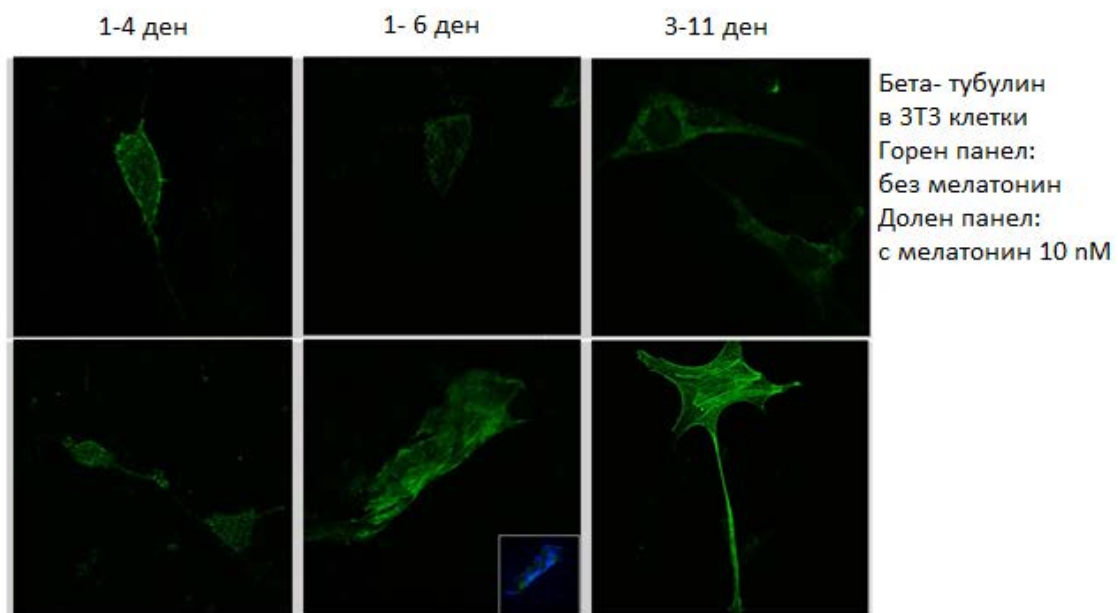
3.5. Ин-витро проучване ефекта на мелатонин върху клетъчния растеж и диференциация

- **Ефект на мелатонин ин витро върху цитоскелетната динамика**

Цитоскелетът е филогенетично добре запазена структура, която играе ключова роля в клетъчната физиология. Тази структура е сложна мрежа, съставена от микротубули, актин и миозин, интермедиерни филаменти, както и от адапторни протеини. Цитоскелетът регулира редица жизнено важни клетъчни процеси, като например: клетъчна адхезия и миграция, транспорт и организация на клетъчните органи, митоза, секретирание и формиране на клетъчни удължения (напр. ламелоподи и филоподи)(Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000).



Фигура 20А: Ефект на мелатонин ин-витро върху динамиката на актиновите филаменти по време на растеж и спонтанна диференциация на 3Т3 L клетъчна линия

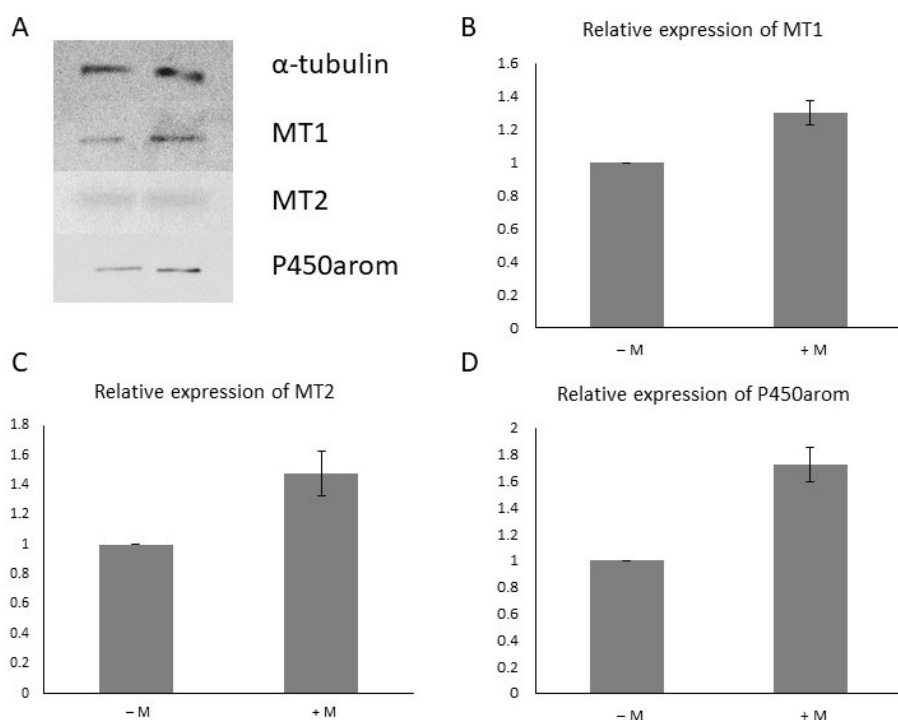


Фигура 20В: Ефект на мелатонин ин-витро върху динамиката на бета – тубулин по време на растеж и спонтанна диференциация на 3Т3 L клетъчна линия.

В клетъчните процеси се наблюдават динамични и диференциални промени в цитоскелетната организация, в зависимост от типа на клетката и специфичната и функция. Мелатонинът е способен да влияе върху организацията на микрофиламенти, микротубули и интермедиерни филаменти, посредством действието си като цитоскелетен модулатор по време на тъмната фаза на фотопериода когато секрецията му се повишава. Предполага се, че хормонът участва в регулирането на сглобяването на трите основни цитоскелетни компонента. Освен това е установено, че мелатонинът има важно стимулиращо действие върху имунната система при физиологични и патологични механизми, предпазвайки организъмът от бактериални и вирусни инфекции, правейки го много по-устойчив за оцеляване. Мелатонинът, в присъствието на Ca^{++} , увеличава образуването на тубулин, което води до уголемяване на микротубулите, докато 10 μM мелатонин без Ca^{++} инхибира полимеризацията на тубулина и предизвиква разрушаване на микротубулите. Организацията на актиновите микрофиламенти също се променя в присъствието на мелатонин. В MDCK клетки от бъбрек мелатонинът предизвиква увеличение на стресовите влакна, разположени в основния край на клетката и удебеляване на кортикалния пръстен, локализиран в апикалния и край. Реорганизация на интермедиерни филаменти, предизвикана от мелатонин е изследвана посредством имунофлуоресцентно оцветяване с виментин. Авторите са наблюдавали, че 3 и/или 6 часа след инкубацията на мелатонин се извършва временно разпадане на оцветяването за виментин. Дифузно оцветяване и концентрирани петна се наблюдават около ядрото, докато нишковидната мрежа вече не се наблюдава. Организацията на имунофлуоресцентното оцветяване за виментин зависи от фосфорилирането на виментин от protein kinase C (PKC), серин треонин киназа, която може да бъде активирана от форболови естери. Стимулирането на PKC е последвано от нейната транслокация към цитоскелета, фосфорилирането на виментин и разпадане на оцветяването. PKC е включена също в механизмите, посредством които мелатонина разпознава актиновите филаменти. Мелатонинът и PMA (phorbol12-myristate 13-acetate - PKC инхибитор) увеличават количеството на филаментозен актин с 40 %, докато PKC инхибитора bisindolylmaleimide инхибира този ефект. Не е установен рецепторния механизъм за ефектите на мелатонина върху цитоскелета. Ремоделирането на актиновия цитоскелет е неделима част от активирането на T клетки. Известно е, че полимеризираният актин се акумулира в capping местата на TCRs20. Установената от нас локализация на MT1 наподобяваща sar- структура, характерна за мигриращите

лимфоцити, е важна насока за бъдещи изследвания. Още повече, че по време на ранно активиране на РВМС мелатонинът ин-витро предизвиква пренареждане на перинуклеарните актинови микрофиламенти, което е съпътствано от количествени промени в ядрения индекс (Georgiev et al. 2019).

Микротубулите участват в поддържане формата на клетките, изграждат някои клетъчни органели и стабилизират вътреклетъчното им разположение. Също така участват в цитоплазмения транспорт (придвижване на везикули) и при деленето на клетката (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000). Ние наблюдавахме стимулиране на метаболитния транспорт се в присъствие на 10 nM мелатонин още на трети ден от третирането. Очевидно и двата рецептора взимат отношение в тези процеси, като данните ни сочат че преобладаващо MT1 рецепторът има въздействие върху микротубуларния апарат, докато MT2 участва в метаболизма на пипидните капчици и има по-дискретно разпределение.



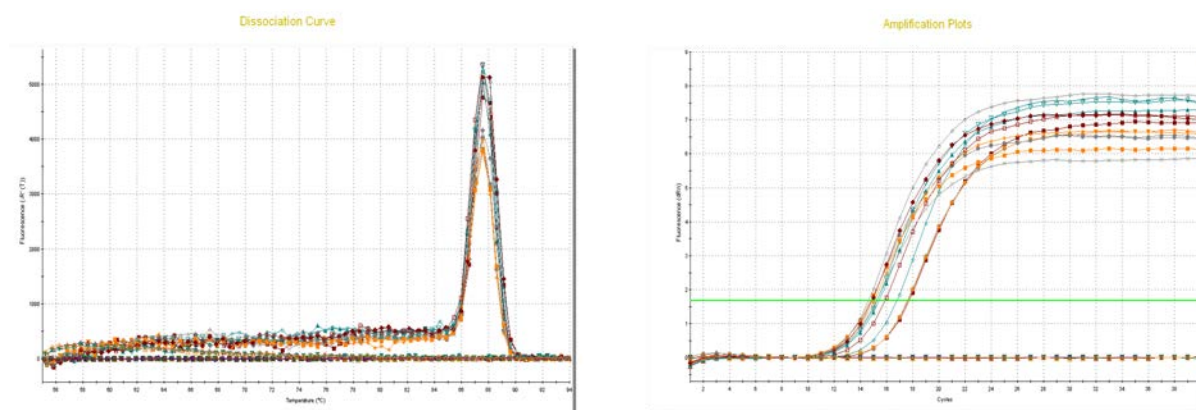
Фигура 21: Ефект на мелатонин върху диференциацията на гранулозо-лутеинни клетки

- **Оценка на мелатонин ин-витро върху гени за транскрипционни фактори с роля в диференциацията и пролиферацията**

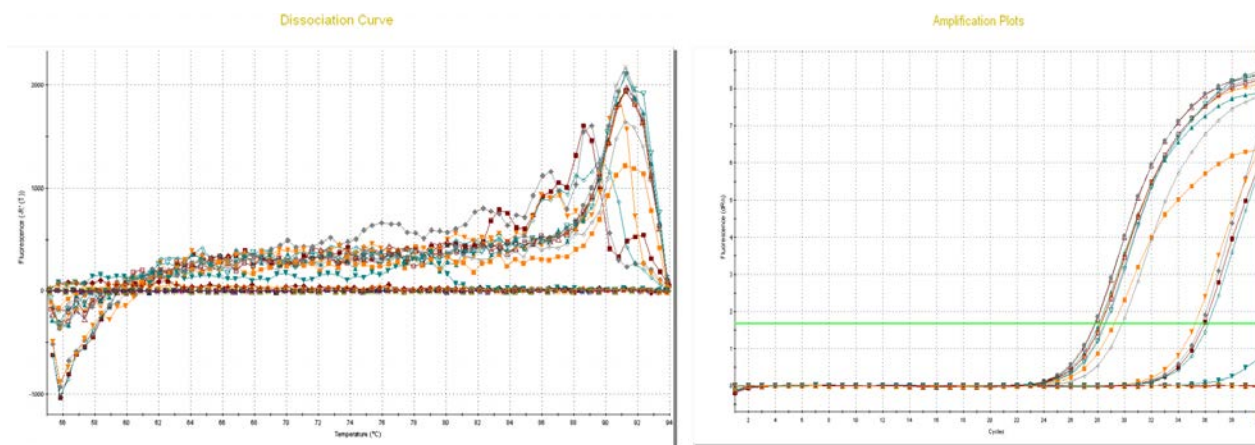
Пластичността на гранулозните клетки, техният потенциал за репрограмирани, ни даде повод да проверим експресията на гени за транскрипционни фактори, участващи в регулацията на диференциацията и пролиферацията, както при базални условия, така и след стимулация с мелатонин.

В проведената от нас real-time PCR анализ установихме амплификация на транскрипти за Klf-4, c-Myc и Nanog. При използваните от нас условия и праймери не беше отчетен продукт за Oct-4 и Sox2.

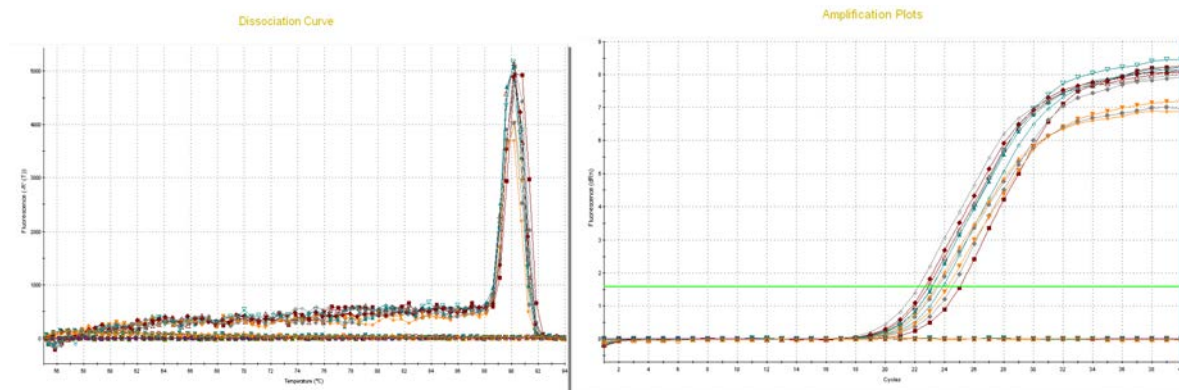
A. β -actin (контрол)



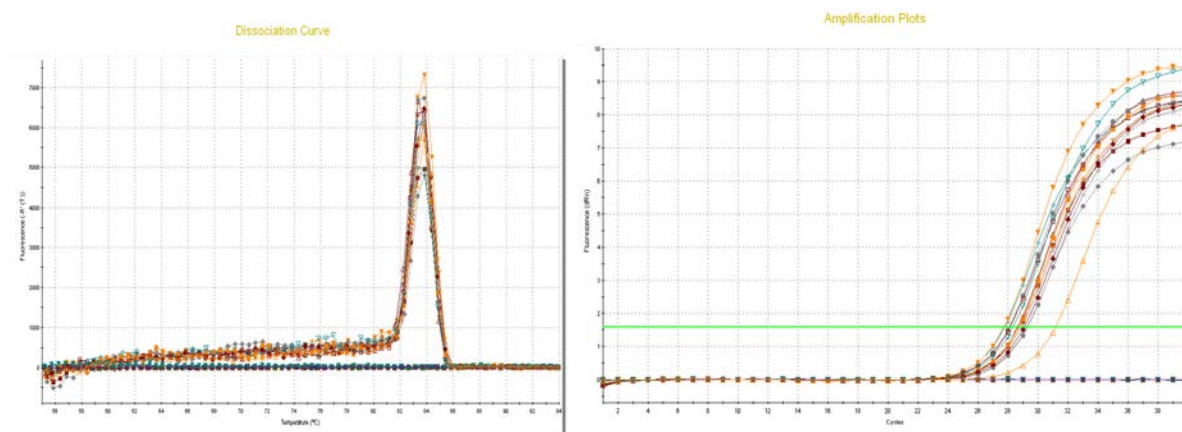
B. Klf-4



C. c-Мус

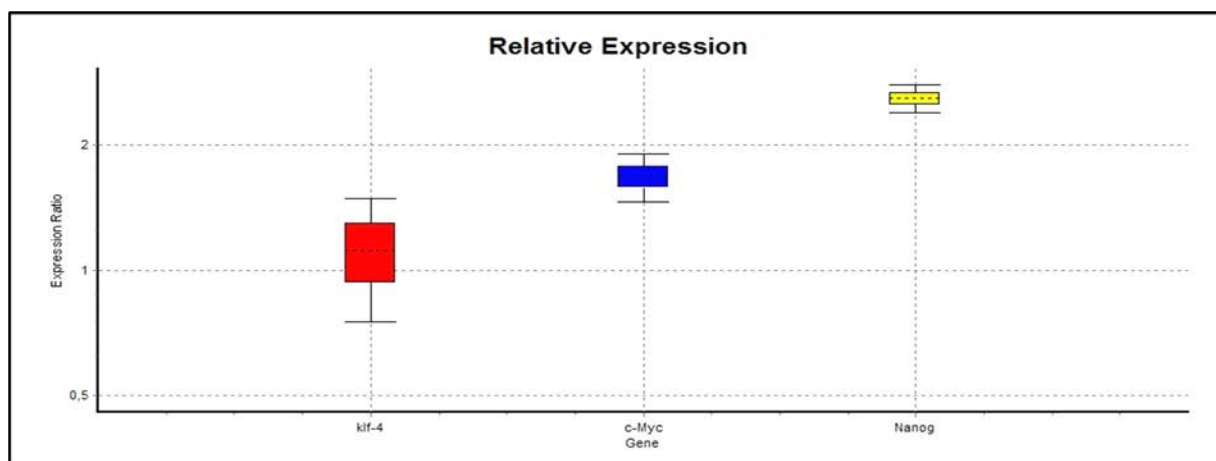


D. Nanog



Фигура 22: Дисоциационни и амплификационни криви от *real-time qPCR* реакциите за *Klf-4* (B), *c-Мус* (C) и *Nanog* (D). Като референтен ген за нормализиране на получените данни беше използван β -актин (A) (От ляво – дисоциационни криви, отдясно – амплификационни криви).

Данните от анализа показаха и достоверно повишена експресия за *c-Мус* и *Nanog* в пробите от гранулозни клетки, третирани с мелатонин (10 nM) за 24 часа. Не беше отчетено статистически значимо повишение в експресията на *Klf-4* след третиране с хормона.



Фигура 23. Влияние на мелатонин (10 nM) върху експресията на гени в гранулозни клетки. Данните са представени като относителна промяна в нивата на експресията, изчислена по метода на Livak et. al. (Livak & Schmittgen, 2001) $(p < 0,0001)$

Установената експресия на гени, пряко свързани с регулация на клетъчната диференциация, е показателна за пластичността на гранулозните клетки и демонстрира, че притежават потенциал за репрограмане, който тепърва предстои да бъде изследван. Физиологични концентрации на епифизния хормон демонстрират стимулиращ ефект върху експресията на анализирания гени. Предвид, че те са сред основните фактори, определящи и поддържащи недиференцираното състояние, се потвърждават резултатите за положителен ефект на мелатонина върху ефективността при процеси на клетъчно репрограмане. Такъв ефект е доказан както при репрограмане по метода на SCNT (Nakano et al., 2012) така и при директно индуциране на iPSCs (Gao et al., 2013) Мелатонинът има също установен поддържащ ефект на плюрипотентното състояние на ESC, което на база на получените от нас резултати, може да предположи и участието му в поддържане на състоянието на гранулозните клетки и в регулацията на тяхната диференциация.

Различни проучвания посочват, че гранулозните клетки притежават стволово-клетъчен характер, без това да е доказано убедително дотози момент. Такива потенциални характеристики са важни имайки предвид противоречивите данни за техния произход и ролята им в ремоделиране на яйчниковата строма особено след овиулацията Установено е наличието на редица общи свойства между гранулозните и стволовите клетки – наблюдавана е теломеразна активност, експресия на типични стволово-клетъчни маркери като Oct-4 и мезенхимните маркери CD29, CD44, CD90,

CD105, CD117, CD166; диференцирани са *ин витро* в други клетъчни типове, като неврони, хондроцити, остеобласти; оцеляват при трансплантация в имунонекомпетентни мишки, формирайки *ин vivo* тъкани с мезенхимен произход (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009). Освен това гранулозните клетки се използват като ядрени донори при SCNT, като е доказано че повишават ефективността на процеса при сравнение с използване на други клетъчни типове (Chronowska & Kott, 2012).

3.6. Експресия на рецептори за мелатонин в клетъчни модели.

Добре известно е, че мелатонинът е високоефективен при предпазване на клетките от увреди в условия на остро възпаление. Този ефект на епифизния хормон може да се осъществява на няколко нива. Данните за подтискане на активирането и цитоплазмените нива на NF- κ B от мелатонин, по неизяснен към момента механизъм, предоставят съществена насока на изследване на антиинфламаторните свойства на хормона, имайки предвид неговата циркадна характеристика и множеството фактори на средата, които водят до нарушения в секреторния му профил.

Мелатонинът се открива в повечето телесни течности като концентрациите му са по-високи през нощта отколкото през деня. Това е резултат от нощната синтеза на хормона под действието на стимулаторни сигнали. При гръбначните тези сигнали се генерират чрез симпатикови нервни влакна, които доставят информация от супрахиазматичното ядро главно чрез освобождаването на невротрансмитера норадреналин (Dubocovich et al., 2010).

В женска репродуктивна система се съобщава за повишени нива на мелатонин през лутеалната фаза на менструалния цикъл в сравнение с фоликуларната (Brun et al., 1987). Специфични мембранно свързани рецептори за мелатонин са установени в човешки гранулоза-лутеинни клетки като се предполага участието му в регулацията на лутеалната фаза и секрецията на прогестерон в яйчника. (Georgiev et al., 2019) Освен това други автори установяват, че мелатонинът повишава значително експресията на иРНК за LH (но не и за FSH) рецептор в човешки гранулоза-лутеинни клетки, докато в същото време потиска експресията на GnRH и GnRH рецептор (Woo et al., 2001). Той

повишава hCG-стимулираната секреция на прогестерон в тези клетки вероятно именно чрез повишената експресия на LH рецептора.

Приложен самостоятелно *ин-витро* мелатонинът не оказва ефект, но потенциира чрез *Pertusis toxin* - чувствителен сигнален път индуцираната от PGF2 α хидролиза на фосфатидилинозитол в миши фибробластни клетки, трансфектирани да експресират човешки мелатонинови рецептори (Morgan et al., 1994). Резултатите демонстрират потенциалната значимост на мелатонина в контрола върху фосфолипаза (PLC) - зависимата сигнална трансдукция в някои клетки. Например, гонадотропоцитите от предния дял на хипофизата отговарят *ин-витро* на GnRH-стимулация чрез увеличаване активността на фосфолипаза C и последващо генериране на 1,2-диацилглицерол и инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3). Диацилглицеролът активира мембранно-свързаната протеинкиназа C (PKC), докато IP3 води до увеличаване вътреклетъчното ниво на Ca²⁺. Двете събития имат за последствие увеличаване секрецията на лутеинизиращия (LH) и на фоликуло-стимулиращия хормон (FSH) от хипофизата.

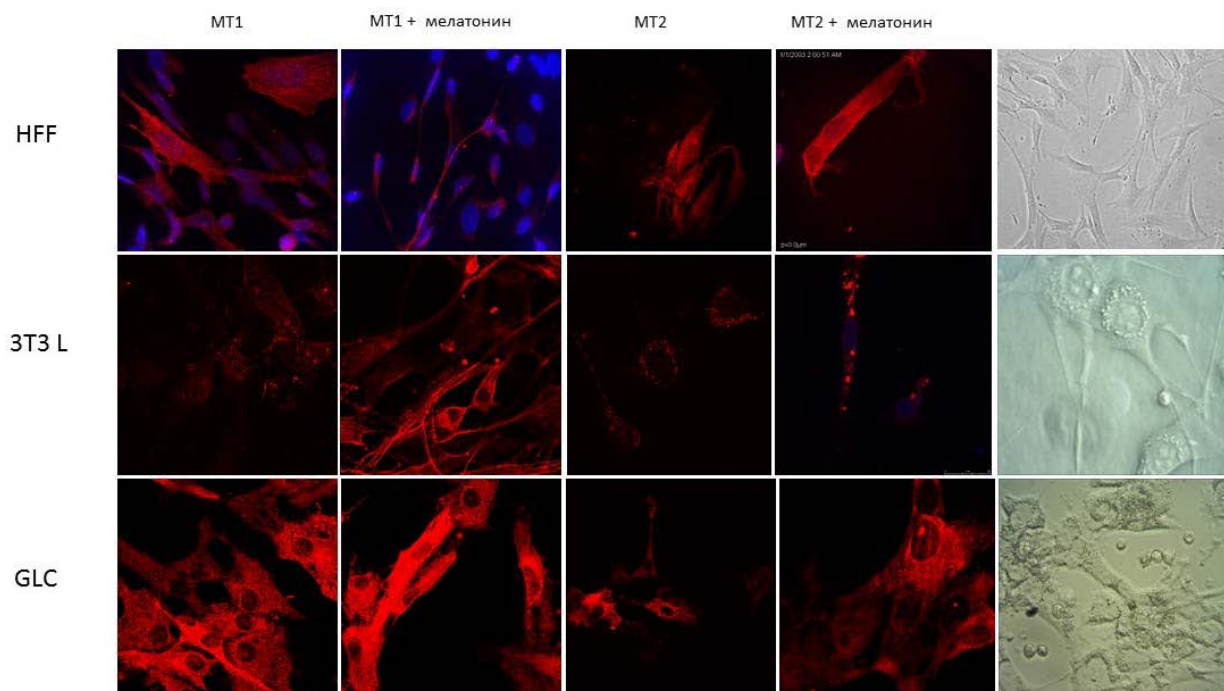
Мелатонинът може да се възприема като сигнална молекула, секретирана с циркаден ритъм, с доказано уникално значение за контрола на циркадната и сезонна физиология, включително репродуктивното поведение (Vanescak, 1998). Въпреки че рецептори за мелатонин са вече клонирани при редица видове и тяхното разпределение и характеристики интензивно се проучват (Browning et al., 2000; Dubocovich & Markowska, 2005; Reppert et al., 1994) все още не са изяснени клетъчните мишени за хормона, както и физиологичното значение на рецептор-активирани сигнални пътища.

За мелатонина са установени със сигурност два високо-афинитетни G-протеин свързани рецептори, активирани от лиганда, които се обозначават MT1 и MT2, кодиращите гени се обозначават съответно MTRN1A и MTRN1B (Таблица 20).

Таблица 20: Характеристика на човешките мелатонинови рецептори

MT1 (mt ₁ , Mel _{1A})	MT2 (Mel _{2A} , Mel _{2B})
Клониран (1A, 1B, MRR)	Не е клониран
Високоафинитетен, $Kd < 200$ pmol/l	Нискоафинитетен, $Kd > 1$ nmol/l
Йодомелатонин \geq мелатонин \gg N-ацетилсеротонин	Йодомелатонин $>$ N-ацетилсеротонин $>$ мелатонин
Свързан с G протеин	Идентифициран е в В лимфоцити и меланомни клетки
Локализиран в мозък, ретина, хипо-физа, простата, гранулозни клетки, лимфоцити, меланоми и в клетки на рак на гърдата.	

В обхватно проучване на експресията на MT1 и MT2 в различни клетъчни типове, ние успяхме да докажем наличието и на двата типа в различни по вид и произход клетки (Фиг. 24)



Фигура 24: Визуализация на рецептори за мелатонин тип MT1 и MT2 във фибробласти и гранулозо-лутеинни клетки. (Подробности в гл. ММ). Използвани са клетъчни линии HFF, 3T3 L, първични култури от гранулозо-лутеинни клетки (GLC). Клетките са култивирани в присъствие или отсъствие на мелатонин. Наблюдавани са под фазов контраст (увел. 20x, краен десен ред). Имунофлуоресценцията е извършена с белязани с Alexa 594 втори антители срещу специфични анти- MT1 и MT2 антители (Santa Cruz, USA)

При продължително инкубиране на изследваните култури с мелатонин в концентрации сходни до физиологичния обхват се наблюдава усилване на интензитета на сигнала, както и неговото транслоциране. Този феномен е особено валиден за ембрионални фибробласти в процеса на тяхното спонтанно диференциране, като ефектът е различен за двата типа рецептори. Обикновено MT1 е свързан в по-голяма степен с клетъчните контакти и фибриларни израстъци, докато MT2 се свързва с процеси на диференциране и секреторна функция (Фиг. 24) .

Регулацията на сигналната трансдукция е от особено значение за поддържането на навременния и ефикасния клетъчен отговор и хомеостаза (Dubocovich et al., 2010). Активирането на G-протеин свързаните рецептори води до промяна в чувствителността

на рецепторите – десензитизация, повишаване на чувствителността, импорт на рецептори, и трафика, което води до лигандната ефикасност (Ferguson, 2001). MT1 и MT2 рецепторите характерно и различно се регулират от физиологични (30-400pM) и супрафизиологични (1-1000nM) концентрации на мелатонин. Физиологичните концентрации на мелатонин през нощта (100-400 pM) са над ефективната концентрация за мелатониновите рецептори, които се активират от пикомоларни концентрации на мелатонин ((Reppert et al., 1994); (Dubocovich et al., 1996). Дневните концентрации обикновено са под 30 pM и все пак те индуцират активиране и десензитизиране на мелатониновите рецептори след продължително излагане на действието на хормона (минимум 8 часа). Кръвните нива на мелатонин след взимане на орална доза от 0.3 g са подобни на ендогенните нива през нощта при хората (Dollins et al., 1994). При период на излагане към мелатонин с приблизителна до нормална продължителност на нощта – около 8 часа, при MT1 експресирани в SCN се отчита увеличение гъстотата на рецепторите и понижение в техния афинитет (Dubocovich et al., 2010).

Възстановяването на MT2 рецепторите след мелатонин-медирана десензитизация/интернализация частично зависи от нов белтъчен синтез. Ресензитизацията на MT2 рецепторите след излагането им на физиологични нива на мелатонин, продължава до 8 часа, докато излагането на супрафизиологични нива, води до по-силна десензитизация и по-дълъг възстановителен период – до 24 часа, за достигане на изходните нива. Връзката между десензитизацията и/или интернализацията на MT1 и MT2 рецепторите и циркадианната продукция на мелатонин може да води до промяна на мелатонин рецепторната функиця в SCN (Dubocovich et al., 2010). Мелатонинът например повишава диференциацията на човешки възрастни мезенхимни стволови клетки в остеобласти чрез активация на MT2 рецепторите. Редукция в MT2-медираното намаляване на ензимната активност на алкалната фосфатаза, се наблюдава когато MT2 рецепторите са напълно десензитизирани, което предполага че понижението на рецепторната чувствителност е нужна стъпка при горната диференциация(Radio et al., 2006).

Наши резултати от експерименти ин-витро с човешки кожни фибробласти (HFF) показват, че MT1 и MT2 рецепторите могат да бъдат десензитизирани под въздействието на мелатонин, рецепторите се регулират спрямо нивата на мелатонин – физиологични или супрафизиологични, продължителността на влиянието (Dubocovich et al., 2010)

Активирането на G-протеин свързаните рецептори води до промяна в чувствителността им – десензитизация, повишаване на чувствителността, импорт на рецептори, и трафика, което води до лигандната ефикасност (Ferguson, 2001). Данните за пик в нивата на MT1 под влиянието на физиологична концентрация на мелатонин и спад при високи концентрации са напълно логични. Протеинов анализ на рецептора чрез Western blot = показва повишена експресия на MT1 при третиране на фибробластите с физиологични нива на мелатонин, спрямо контролата. Наблюдава се увеличаване на концентрацията на рецепторите вероятно в следствие на позитивна обратна връзка във физиологични условия, с цел амплифициране на сигнала.

При третиране с високи концентрации на мелатонин се наблюдава негативна обратна връзка, в резултат на което концентрацията на MT1 е понижена. Предполага се че механизма, по-който се достига понижаване на концентрацията на MT1, вероятно е този на рецепторна интернализация.

Имайки предвид, че физиологичните нива на мелатонин ин-виво варират спрямо циркадния ритъм, клетките, експресиращи мелатонинови рецептори, трябва да имат механизъм за регулацията на рецепторната гъстота, чувствителност, афинитет, интернализация/десензитизация и ресензитизация. Резултатите от наши изследвания потвърждават наличието на такъв механизъм при линия HFF фибробласти. Интересно е дали промените на физиологичните нива на мелатонин през денонощието оказват влияние върху метаболизма и регулацията на клетъчен цикъл във фибробласти и други клетъчни типове. Например връзката между десензитизацията и/или интернализацията на MT1 и MT2 рецепторите и циркадийната продукция на мелатонин може да води до промяна на мелатонин рецепторната функция в супрахиазматичното ядро (Dubocovich et al., 2010). Има данни, че намаляването на рецепторната чувствителност на MT2 рецепторите е нужна стъпка при диференциацията на човешки възрастни мезенхимни стволови клетки в остеобласти под действието на мелатонин (Radio et al., 2006).

4. ОБЩА ДИСКУСИЯ

Значение на експресията на *VEGFA* при физиологични и патологични процеси в човешкия ендометриум

Една от целите на настоящата дисертация бе извършването на анализ за откриване на точкова мутация, +405 G/C полиморфизъм в 5' нетранслиращ участък от *VEGF-A* гена и асоциирането му с патологични изяви като имплантационни неуспехи и спонтанни аборти при пациенти, преминали един или няколко неуспешни цикъла по асистирана репродукция (IUI, IVF-ET, ICSI-ET). Анализът не включваше установяване на връзка с други фактори, определени като причини за репродуктивни неуспехи.

Във възрастния организъм, процесът на образуване на нови кръвоносни съдове (неоангиогенеза) е сравнително рядко явление (при някои патологични състояния и изграждане на колатерално кръвообращание); докато в репродуктивната система е физиологично явление, като ангиогенезата зависи от притичащите процеси във яйчниковите фоликули, жълтото тяло и маточния ендометриум (Gordon et al., 1995; Salamonsen et al., 1986). Въз основа на тези физиологични обстоятелства, образуването на кръвоносни съдове е строго регулирано, което означава, че е било активирано за кратък период и след това е напълно инхибирано (Folkman, 1995). Заболявания, като рак, пролиферативна диабетна ретинопатия и болест на периферните съдове са съпътствани от неправилна регулация в тези процеси (Folkman, 1995; Klagsbrun, 1991).

Ангиогенезата в матката се счита за процес, участващ в реконструкцията на ендометриума след менструална фаза и подготовката на добре кръвоснабдена, рецептивна децидуа, напълно готова за процесите на имплантиране и образуване на плацента (Torru et al., 2007). В женската репродуктивна система аномалии в процеса на образуване на кръвоносни съдове се свърза с нарушения, като дефект в лутеалната фаза, ендометриоза, загуба на плода, пре-еклампсия и рак (Helzlsouer et al., 1995).

При евентуално нарушение в регулацията на ангиогенезата, тя може да бъде инхибирана или прекалено активирана. И в двата случая се стига до патологично състояние, което е трудно за овладяване. В единият случай може да не се постигне добро кръвоснабдяване на определени участъци от ендометриума, да не пролиферира или да не успява да снабди с хранителни вещества и различни фактори развиващия се ембрион. При подобни състояния се стига до спонтанни аборти, както и до повтарящи се

неуспешни опити на асиситирана репродукция. (Almawi et al., 2013; Magdoud et al., 2012) При хиперактивация на VEGF може да се стигне до патологичен фенотип, включващ ендометриоза (Bhanoori et al., 2005; McLaren et al., 1996).

Подготовката на ендометриума (децидуализация), имплантирането на ембриона, както и плацентацията, се регулират от освобождаването на различни фактори и хормони. От тях VEGF е считан за основен регулатор в процеса на образуване на кръвоносни съдове *in vivo*. Той действа директно на ендотелните клетки като влияе върху сигналните пътища, засягащи клетъчната пролиферация и диференциация. Изключително важна се оказва ролята на VEGF в ранните ангиогенни процеси, по време на следменструалната регенерация на ендометриума и реепитеализацията. Ефектът на VEGF върху миграцията на епителните клетки в ендометриума се постига чрез рецептор 2 на VEGF (VEGFR2) и невропилин 1 рецептори (NP1) (Fan et al., 2008). Кислородният дефицит, настъпващ често в ендометриалната тъкан, наречен хипоксия отключва хипоксия-индуциращ фактор 1 (HIF-1), който е ключов регулатор в експресията на VEGF и процеса на образуване на кръвоносни съдове в широки вариации на тумори.

VEGF-A гена е разположен в хромозома 6p21.3 и притежава 8 екзона. Няколко единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) са открити във *VEGF-A* гена, като някои от тях са свързани с промени в експресията на гена: VEGF -2578 A/C, в промоторния участък, -1154 G/A, също в промоторния участък и +936 C/T в 3'нетранслиращия участък (Brogan et al., 1999; Croll et al., 2004).

В настоящия дисертационен труд изследвахме +405 G/C полиморфизма в гена за *VEGF-A* и предложихме асоциирането му с патологични изяви, засягащи женската репродуктивната система (RIF и RPL). Това са често срещани патологични изяви в репродуктивната биология и медицина с нарастваща необходимост от диагностициране и лечение. От получените резултати става ясно, че пациентите с повтарящи се репродуктивни неуспехи се различават значително от контролната група. Наблюдавахме висока честота на +405 C/C мутантния вариант при пациентите с патологична изява (25%), докато при контролната група бе само 3%. Честотата в групата със спонтанни аборти бе 35%, а при пациентите с RIF – 18%. Определено бихме могли да асоциираме VEGFA +405 C/C генотипа с повтарящи се спонтанни аборти и неуспешни опити за имплантация след *in vitro* оплождане. Това ни дава основание да считаме, че генотипирането на VEGF A

полиморфизма може да служи като основа за разработване на рутинен тест за диагностика на неизяснени репродуктивни неуспехи.

Асоцииране на полиморфизми в гена за *MTNR1B* с репродуктивния статус на жени от българската популация

Разпределението на генотипа на *MTNR1B* полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 при пациенти с репродуктивни неуспехи (RPL и RIF), като цяло е подобно на описаното при здрави българки (Tanev et al., 2016). Пациентите с повтарящи се спонтанни аборти не се различават от жените с имплантационна недостатъчност по отношение на изследваните от нас полиморфизми на *MTNR1B*. Прави впечатление обаче, че при пациенти с повтарящи се аборти (RPL) липсва мутантният вариант (AA) на rs1562444 рецептора, докато при други пациенти от женски пол разпространението на rs1562444 AA генотип е 38,5%.

Разпределението на трите полиморфизма показва неравновесие на връзката при здрави жени, като тези с rs1562444 AA генотип имат съпътстващ генотип rs10830962 GG значително по-често от други варианти, докато тези с генотип rs1562444 GG, обикновено са с генотип rs10830962 CC.

Наличието на хаплотип rs1562444 AA / rs10830962 GG е значително по-рядко при жени със спонтанни аборти или неуспех на имплантиране, отколкото при жени с поне едно раждане. Също така, генотип rs1562444 GG обикновено се свързва с наличието на rs10830963 CC, като това изглежда, че няма връзка с репродуктивни неуспехи. Разпределението на генотипа на rs10830962 и генотипното разпределение на rs10830963 също са свързани, но не са установени асоциации на комбинираните генотипове с разпространението на спонтанни аборти и/или неуспех на имплантиране.

Експресия на цитокинови маркери и тяхната роля в етиологията на повтарящи се репродуктивни неуспехи

Възпалението е биологична реакция на нарушена тъканна хомеостаза и би могло да бъде предизвикано от всеки интерфериращ фактор (Ashley et al., 2012; L. Chen et al., 2018; Medzhitov, 2008) [Chen et al. 2018]. Световната здравна организация (СЗО) счита хроничните възпалителни заболявания като особено значими за човешкото здраве, засягащи всеки орган на тялото и сред основните причини за смърт в световен мащаб (L. Chen et al., 2018; Pahwa & Jialal, 2019)

Възпалението на матката е често причина за необясним стерилитет, неуспешни процедури IVF и повтаряща се загуба на бременност, дори в случаите, когато трансферираните ембриони са генетично тествани и времето за трансфер е оптимизирано. Неговата роля в патогенезата на нарушенията на репродуктивната система все още се обсъжда (L. Chen et al., 2018). Предвид тревожната епидемиология на хроничното възпаление и наличието на предполагаеми данни, немикробното възпаление заслужава допълнителни изследвания, за да се изясни дали играе ключова роля (поне отчасти) за асистираната репродукция и гинекологичните заболявания (Drizi et al., 2020).

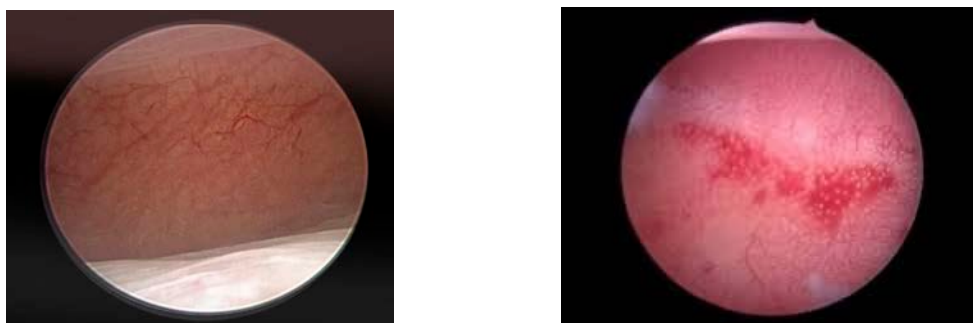
Различни проучвания разкриват зависимости от времето количествени и качествени промени на различни възпалителни маркери и кръвоснабдяване през целия менструален цикъл и бременност ((Jabbour et al., 2009a; Kumar et al., 2010) (Faas & de Vos, 2017; Maybin & Critchley, 2015)

Съдовите промени се състоят главно от вазоконстрикция, вазодилатация, повишена капилярна пропускливост и ангиогенеза. Доказано е, че интерлевкин IL-1, IL-8, IL-18 и пептидните растежни фактори имат ключова роля в репродуктивната физиология и патология, главно чрез биосинтетичния път на простагландините (Jabbour et al., 2006, 2009). Освен това проучванията демонстрират ключова роля на активните пътища, насочени към контролиране на възпалението, (Jabbour et al., 2009a; Serhan et al., 2008; Serhan & Petasis, 2011). Повишеното активиране на про-възпалителните пътища и/или потискането на противовъзпалителните процеси вече са описани като причина за репродуктивни нарушения (Jabbour et al., 2009).

Деликатният баланс между про- и противовъзпалителните, бързо променящи се процеси в нормалния ендометриум е добре документиран, като по този начин се

установява как прекомерното активиране на възпалението е също толкова проблематично, колкото и неговото потискане (Jabbour et al., 2009a)(Robertson, 2010). Обективната оценка на нормалния ендометриален инфламаторен профил изисква да се вземат предвид променящите се във времето количествени и качествени възпалителни модели. Въпреки това, към днешна дата тази оценка е изцяло зависима и до известна степен субективна от преценката на оператора (хистероскопист) и е особено променлива.

Диагностичен аспект би бил трудно постигнат, като се има предвид стромалния оток, съдовите модели, както и разпределението и броя на възпалителни маркери за всяка репродуктивна фаза. Наблюдението на маточната лигавица в секреторна фаза (около 21-ден), може да е полезно при пациенти с репродуктивни неуспехи. Хистероскопската диагностика на ендометриума се основава на консенсус върху наличието на модел с ягодообразни изменения, фокална хиперемия, хеморагични петна, микро-полипи и стромален оток (Cicinelli et al., 2018, 2019) фиг.26. Въпреки това, в имунологията е добре установено, че хиперемията и отокът са типични основни признаци за остро възпаление, а не за хронично, което е по-скоро с атенюирана изява (Medzhitov, 2010; Rahwa & Jialal, 2019). Наличието на признаци на остро възпаление може да се обясни с факта, че хроничното възпаление е идеална основа за повтарящи се остри епизоди, като инфекциите, вече не би трябвало да се разглеждат като единственият причинител на възпаление.



Фигура 25: Снимки от офисна хистероскопия на нормална (в ляво) и възпалена (вдясно) ендометриална лигавица.

С настоящата работа, предлагаме един допълнителен и по-обективен поглед върху инфламаторния статус на ендометриума и значението му във връзка с повтарящи се репродуктивни неуспехи. В допълнение към оценката на маточната лигавица през средна лутеална фаза чрез хистероскопия, може да се приложи и количествена оценка на инфламаторния статус на маточната кухина чрез експресионен анализ на ключови цитокинови маркери. Ние показахме това с анализиране на няколко възпалителни маркера - IL1b, IL10, IL18, TNFa, GATA3 и CD68, като особено висока статистическа значимост получихме при CD68 и TNFa при пациенти с RPL. Също така не открихме съществена разлика между двете подгрупи пациенти в експресията на изследваните маркери, което показва, че по отношение на инфламаторния си статус те са по-скоро хомогенна група.

Редица автори посочват ключовото значение и на IL6, IL17 и CD45(L. Chen et al., 2009; Neo et al., 2020).

По отношение на анти-инфламаторния IL10, получихме сравнително ниски нива на експресия, както при пациентската група, така и в контролната, което се различава от данните на (J. Wang et al., 2018). Това може да се обясни с подбора на случаите при посочените автори, които изследват предимно жени с хистероскопски и хистологично доказан хроничен ендометрит, претърпели повтарящи се репродуктивни неуспехи.

Оптималните диагностични и потенциално терапевтични инструменти остават за определяне. Необходими са по-нататъшни изследвания за по-добра оценка на възпалителните пътища, включени в репродуктивния тракт, както и на хистероскопските и патологични модели на нормален и увреден ендометриум, за да се подобри превенцията, диагностиката и лечението на акушер-гинекологичните заболявания (Drizi et al., 2020).

5. ИЗВОДИ

1. Наличието на +405 C/C хаплотип в гена *VEGF-A* се асоциира с репродуктивни неуспехи дължащи се на липса на имплантация след извършен вътрематочен трансфер на ембриони или ранни повтарящи се спонтанни аборти.
2. Разпределението на *MTNR1B* полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 не се различава сигнификантно между пациенти с репродуктивни нарушения (спонтанни аборти или неуспех на имплантиране) и здрави жени с реализирана бременност. Наличието на хаплотип rs1562444 AA / rs10830962 GG е значително по-рядко при жени със спонтанни аборти или неуспех на имплантиране, отколкото при жени с поне едно раждане (2,9% срещу 22,2%, $p=0,028$). Наличието на хаплотип rs1562444 GG / rs10830962 CC не е значимо свързано с репродуктивни неуспехи ($p>0,05$).
3. Използваните и разработени от нас методи за генетичен анализ на полиморфизми във *VEGF-A* като RFLP анализ и директно секвениране на пациенти с RIF и RPL са валидирани и надеждни. Най-новото поколение платформи за PCR в реално време потвърждават резултатите от RFLP анализ с конвенционален PCR и се оказват компактни, удобни, бързи и надеждни. При подходящ дизайн на експеримента е възможно установяването на различни мутации чрез Real Time PCR, което би прецизирало диагностиката в ежедневната клинична практика.
4. Установи се връзка между повишените експресионни нива на някои от изследваните цитокини (IL1b, IL18, TNF α , TLR4, GATA3 и CD68) и репродуктивната патология при селектираните две групи пациенти (с RPL и RIF), като корелацията е най-изразена по отношение на CD68 и TNF α . Това показва, че цитокиновия анализ от ендометриални биопсични проби в средна лутеална фаза успешно допълва хистероскопската оценка на инфламаторния статус на маточната лигавица. Мелатонинът регулира клетъчния растеж и диференцировка при мезенхимен модел на клетъчно развитие. Физиологичната му роля най-вероятно е свързана с усилване на междуклетъчните контакти, узряване на адхезивни механизми и насочени клетъчни движения посредством ефект върху цитоскелетните актин и тубулин,

5. Рецепторите за мелатонин MT1 и MT2 се експресират в клетки на репродуктивната система при жената и мезенхимоподобни клетъчни типове. Вътреклетъчната локализация на протеините е специфична и най-вероятно отразява различни рецептор-зависими сигнални пътища. Експресията е маркер за чувствителност към авторегулаторни мелатонин – зависими механизми на ендокринна регулация на транскрипционни фактори свързани с клетъчния растеж като Klf-4, c-Myc и Nanog.

ПРИНОСИ

Разработени са ДНК тестове на базата на рестрикционен генетичен маркер за доказване на полиморфизми в гена VEGF-A за целите на асистираната репродукция при повтарящи се имплантационни неуспехи и спонтанни аборти. Тези тестове са валидирани и се приемат за достоверни. Определените с този метод генотипове се потвърждават на 100% чрез секвенционен анализ.

Публикации във връзка с дисертацията:

1. Georgi Nikolaev Georgiev, Elena Marinova, Rossitza Konakchieva & Plamen Todorov (2019) Melatonin selectively influences the transcription of pluripotency and differentiation markers in human non-cancer cells, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33:1, 286-293, DOI: [10.1080/13102818.2019.1571440](https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1571440)
2. Nikolov, G., Georgiev, G. N., Marinova, E., Mourdjeva, M., & Konakchieva, R. (2020). UP-REGULATION OF MT1 AND MT2 RECEPTORS BY IN VITRO MELATONIN AND MODULATION OF ALPHA-TUBULIN AND AROMATASE P450 EXPRESSION IN HUMAN GRANULOSA-LUTEIN CELLS. *COMPTE RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES*, 73(3), 348-354.
3. Маринова Е., Конакчиева Р., Николов Г. (2020) РЕПРОДУКТИВНА МЕДИЦИНА И АРТ В УСЛОВИЯТА НА SARS-COV-2 – ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА, ОЦЕНКА НА РИСКОВЕТЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ НА IVF ПРАКТИКИТЕ, *Списание Ембриология* 10(1), 2-13
4. Ralitsa N. Robeva, Elena Marinova, Georgi Nikolaev, Silvia I. Andonova, Alexey S. Savov, Dobromir I. Tanev, Gueorgui Nikolov, Rossitza Konakchieva (2021) MELATONIN RECEPTOR 1B POLYMORPHISMS AND REPRODUCTIVE FAILURE - A PILOT STUDY. *COMPTE RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES*, (приета за печат)

Участие с постери в международен конгрес:

1. Постер с тема „CORRELATION BETWEEN PROGNOSTIC CHROMOSOMAL SEGREGATION AND DETECTED REARRANGEMENTS IN THREE IVF-PGS CYCLES IN A BALANCED TRANSLOCATION CARRIER” в 5та международна конференция по Генетика и ембриология в Париж, Франция, 01-03 Ноември 2018г,;
2. Постер с тема „CORRELATION BETWEEN PROGNOSTIC CHROMOSOMAL SEGREGATION AND DETECTED REARRANGEMENTS IN PREIMPLANTATION EMBRYOS IN A BALANCED TRANSLOCATION CARRIER” в 17-та международна конференция по Преимплантационна Генетика в Бангкок, Тайланд, 03-06 Май 2018
3. Постер с тема „ THE ROLE OF DNA ANALYSIS IN THE EVALUATION OF FETAL TISSUE AFTER RECURRENT PREGNANCY LOSS AND SPONTANEOUS ABORTION” в симпозиум Настоящи подходи в областта на Репродуктивната генетика – ESHRE Campus в София, България, 26-28 Април 2018
4. Постер с тема “IMPLEMENTATION OF THE NEXT GENERATION SEQUENCING BASED PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING IN CLINICAL PRACTICE: CHALLENGES AND

BENEFITS” в 16та международна конференция по Преимплантационна Генетика във Валенсия, Испания, 26-29 Март 2017

5. Постер с тема „IMPORTANCE OF WHOLE KARYOTYPE PREIMPLANTATION SCREENING FOR INFERTILITY PATIENTS WITH BALANCED TRANSLOCATIONS” в 15та международна конференция по Преимплантационна Генетика в Болония, Италия, 8-11 Май 2016

Благодарности

Поднасям искрени благодарности и признателност на Проф. Росица Конакчиева за подтикването, помощта и насоките при изготвяне на настоящия дисертационен труд. Сърдечно благодаря за подкрепата за гласуваното ми доверие.

Благодаря на катедра „Цитология и хистология и ембриология“ за предоставената възможност да изготвя именно при тях настоящата дисертация. Благодаря за помощта и отзивчивостта на всички колеги от Катедрата.

Специално поднасям своите благодарности към Д-р Георги Николов и МЦ Репробиомед за безкрайната подкрепа, предоставените възможности, отделеното време и ценни съвети при изготвянето на дисертационния труд. Благодаря на всички колеги от МЦ Репробиомед за оказаното съдействие. Специално поднасям благодарност на Радко Сотиров за безусловната подкрепа и помощ.

Благодаря на Д-р Сигридов и всички колеги от МЦ „Д-р Сигридов“ за доверието. Благодаря ви, че така отзивчиво се включихте в настоящото изследване, без Вас тази дисертация нямаше да бъде възможна.

Сърдечно благодаря на Д-р Калчев и екипът му за доверието и подкрепата, като безкористно се включиха в настоящото проучване.

Огромни благодарности на Национална генетична лаборатория и по специално на Силвия Андонова за огромната помощ и съдействие в изготвянето на важна част от изследванията, включени в работата.

Благодаря на колегите от клинична лаборатория към УСБАЛЕ“Акад. Иван Пенчев“, за оказаното съдействие и подкрепа.

Благодаря на доц. Робева и екипа от ИБИР-БАН за доверието и помощта при изготвяне на настоящия дисертационен труд.

Огромна благодарност изказвам на Дмитрий Аврамов и семейството ми за безрезервната подкрепа, търпение и вяра в мен.