



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра «Биология на развитието»



Борислав Петров Матеев

**РАЗРАБОТВАНЕ НА СИСТЕМА ОТ БИОМАРКЕРИ ЗА
ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИМПЛАНТАЦИОННИЯ ПРОЗОРЕЦ
ПРИ АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен «доктор»

област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление: **4.3 Биологически науки**
научна специалност: **Клетъчна биология**

Научен ръководител:

проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2019 г.

Дисертационният труд съдържа 100 страници, 26 таблици, 38 фигури, 164 литературни източници и 3 приложения.

Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в научната лабораторията по Клетъчна биология на катедра «Биология на развитието» при Биологически факултет на Пловдивски университет «Паисий Хилендарски», като подготовката на анализиранияте проби е извършена в Медицински Център БОРА, гр.Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширен катедрен съвет на катедра «Биология на развитието» при Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски», проведен на 25. 03. 2019 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 05.06.2019 г. от 11 ч. в 15 аудитория на Биологическия факултет – гр. Пловдив, ул. «Тодор Самодумов» №2.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ПУ «Паисий Хилендарски».

Научно жури:

Проф. дбн Мима Иванова Николова
Проф. д-р Василий Щерев Ишев, дм
Доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дм
Проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов
Доц. д-р Еленка Стоилова Георгиева

Автор: Борислав Петров Матеев

Заглавие: Разработване на система от биомаркери за определяне на имплантационния прозорец при асистирана репродукция

Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2019 г.

СЪ Д Ъ Р Ж А Н И Е

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
1. ВЪВЕДЕНИЕ	5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
4.1 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДИЗАЙН И КОЛЕКЦИОНИРАНЕ НА ПРОБИ	7
4.2 АНАЛИЗ НА СЕРУМНИЯ ПРОГЕСТЕРОН.....	8
4.3 ОБРАБОТКА НА ТЪКАННИТЕ ПРОБИ,ВЗЕТИ ЧРЕЗ БИОПСИИ.....	8
4.4 АНАЛИЗ НА $\alpha\upsilon\beta$ 3-ИНТЕГРИН И LIF ЧРЕЗ ELISA.....	9
4.4.1 АНАЛИЗ НА $\alpha\upsilon\beta$ 3-ИНТЕГРИН.....	9
4.4.2 АНАЛИЗ НА LIF (ЛЕВКЕМИЯ ИНХИБИРАЩ ФАКТОР).....	9
4.5СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ И ОБРАБОТКА НА ДАННИТЕ.....	13
4. РЕЗУЛТАТИ	13
5. ОБСЪЖДАНЕ	28
6. ИЗВОДИ	33
7. ПРИНОСИ	34
ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР	34
ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР	34
НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ	34
ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	35

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на български език:

ЕТ - ембриотрансфер
ИАТ - Изпълнителна Агенция по Трансплантация
ИП - Имплантационен прозорец
МЦ - Месечен цикъл
СЗО - Световна Здравна Организация
ЦАР - Център за Асистирана Репродукция

Съкращения на английски език:

ART - Assisted Reproductive Technology
WHO - World Health Organization
ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology
LH - Luteinizing hormone
FSH - Follicle stimulating hormone
GnRH - Gonadotropin-releasing hormone
HB-EGF - Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like growth factor
LIF - Leukemia Inhibitory Factor
IL-1 - Interleukin 1
IL-11 - Interleukin 11
MUC-1 - Mucin 1
ECM - Extracellular matrix
kDa - Kilodalton(s)
Col - Collagen
LM -Laminin
FN - Fibronectin
vWF - von Willibrand factor
OP - Osteopontin
BSP - Bone sialoprotein 1
ICAM - Intercellular adhesion molecules
FX - Factor X
C3bi - Complement receptor type 3
 $\alpha 1\beta 1$ - alfa1beta1 integrin; $\alpha 4\beta 1$ - alfa4beta1 integrin; $\alpha v\beta 3$ - alfaNubeta3 integrin
CNTF - ciliary neurotrophic factor
CT-1 - cardiotrophin
TNF - Tumor necrosis factor
Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethane
CR - Cross rection
PBS - Phosphate-buffered saline
RCF - Relative centrifugal field
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assays
TMB - Tetramethylbenzidine
OD - Optical density
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
SD - Standart deviation
SEM - Standart Error of the Mean
IGFBP2 - Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2
PGE2 - Prostaglandin E2 /dinoprostone /
PGF2 - Prostaglandin alfa
 β -HCG - Human chorionic gonadotropin

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Ниската, като цяло, раждаемост в западните общества и отложеното във времето раждане на първо дете, е характерно явление, на фона на което необходимостта от лечение на безплодието и справянето с причините за инфертилитета са от първостепенна важност. По данни на различните статистически доклади за честотата на безплодието сред населението в България, в Европа, а и на световно ниво, над 10% от двойките в съответните популации са засегнати от това състояние.

Това явление, освен че представлява медицински проблем за съответната двойка, често има социални и психологически последствия за всички пряко или косвено засегнати. Безспорен знак за осъзнаване на важността на проблема говори и поведението на различните здравни фондове и държавни структури, осигуряващи финансиране за медицинските процедури в областта на асистираните репродуктивни технологии. България също не се отличава от световните тенденции и от 2006 година започна частично и поетапно нарастващо финансиране на ин витро процедури за здравноосигурени български граждани, като към настоящия момент, държавата (чрез Министерство на Здравеопазването) финансира почти на 100% около 4 000 ин витро процедури годишно. Отделно от това, в последните няколко години се наблюдава положителната практика в по-големите общини също да се създават т.нар. „общински фондове ин витро“, които да осигуряват ограничен, но все пак наличен финансов ресурс за подпомагане на такъв вид процедури за своите жители.

Въпреки тези позитивни тенденции и въпреки, че много от причините за безплодие са преодолені чрез развитието и прилагането на асистираните репродуктивни техники, като в 85% до 90% от случаите съвременните технологии и know-how позволяват получаването на ембриони в лабораторни условия, то процесът на имплантация и асоциираните с него биохимични и физиологични взаимодействия остават все още ограничаващ фактор по отношение успеха на лечението.

Обяснението защо това е така, се крие в обстоятелството, че за процеса на успешната имплантация предпоставките са две, а именно наличието на рецептивен ендометриум от една страна и от друга – генетично и физиологично пълноценен и нормално развиващ се ембрион. Успешната реципрочна комуникация на биохимично, физиологично и имунологично ниво между тези два фактора, обезпечава в крайна сметка заключителния етап на оплождането и първоначалните етапи на ембриогенезата, и началото на развиващата се бременност, които по същество обединяват в себе си успешната имплантация. Доколкото ембрионалният фактор под формата на дефицити по отношение на качеството на ембрионите, е причина за около една трета от имплантационните неуспехи, то липса или непълноценност в рецептивността на ендометриалната тъкан е причина за около две трети от неуспешните бременности. Изключително неприятно преживяване е както за пациентската двойка, така и за медицинския екип, когато трансферът на морфологично отличен (или отлични) ембрион(и) в предполагаемо подготвена ендометриална лигавица завърши с неуспешна имплантация.

Следователно, за да се повиши успеваемостта на методите в асистираната репродукция под формата не само на клинични бременности, но и на живо родени деца, е налице необходимостта от продължаваща работа за

изследване и разбиране на молекулярната база и принципи на предимплантационните и имплантационни процеси. За да се задълбочат и допълнят знанията относно тези механизми на взаимодействие, са проведени редица изследвания, като поради морално-етичната комплексност на материята и сферата на работа, досега предимно се е работило и работи с животински модели. За съжаление обаче, хетерогенността във физиологичните и патологични механизми на ембриоимплантацията при различните животински видове и човека, ограничава възможността за изготвяне на обобщен и достоверен изследователски модел. Извършените изследвания и проучвания върху клетки и тъкани с човешки произход са предоставили изключително полезна информация и познания, като въпреки това, все още е налице необходимостта от диагностична и терапевтична методика за установяване на евентуални имплантационни дефицити, както и достоверен маркер за конкретизиране на рецептивния статус на ендометриума.

Основната цел на настоящото изследване е да се добие повече яснота и познание в комплексните механизми на имплантация на човешкия ембрион, като се опита да идентифицираме различни фактори, имащи роля и ключово значение за ендометриалната и ембрионална подготовка за процеса на имплантиране и по-конкретно ативната му времева рамка - т.нар. имплантационен прозорец.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на дисертационния труд е да се проучи практическата възможност за приложение на определени биомаркери за разработка на методичен модел и алгоритъм на приложение в различните процедури за асистирана репродукция с оглед установяване времевата рамка на рецептивния период на ендометриума - т.нар. имплантационен прозорец.

Основни задачи на проучването са:

1. Да се проследи и установи наличие или липса на динамика в концентрацията на $\alpha v\beta 3$ -интегрин в ендометриалната тъкан през различните етапи на ендометриалния (физиологичен) цикъл и по-конкретно по време на рецептивната фаза, в т.нар. имплантационен прозорец, както и в нерепетивния ѝ период.

2. Да се проследи и установи наличие или липса на динамика в концентрацията на **левкемия инхибиращия фактор (LIF)** в ендометриалната тъкан през различните етапи на ендометриалния (физиологичен) цикъл и по-конкретно по време на рецептивната фаза, в т.нар. имплантационен прозорец, както и в нерепетивния ѝ период.

3. Да се проучи динамиката в стойностите на серумния прогестерон в различните фази (нерепетивна и рецептивна) и в рамките на предполагаемия имплантационен прозорец на ендометриума.

4. Да се установи дали има корелации в динамиката на концентрацията на серумния прогестерон и стойностите на $\alpha v\beta 3$ -интегрин и **LIF** в тъканните проби.

5. Да се изследва динамиката в експресията на $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -интегрин и LIF при развиващи се ин-витро ембриони в етапите на култивиране между момента на потвърдено оплождане до ден пети от развитието им чрез анализ на използваната среда за култивиране.

6. Да се съпоставят данните и установи дали има корелации в динамиката на концентрацията на серумния прогестерон, стойностите на $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -интегрин и LIF в тъканните проби и тези, получени от култивираните ембриони.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Експериментален дизайн и колекциониране на проби

Дизайнът на проучването е одобрен от Етичната комисия при Медицински Център БОРА с Протокол № 2 / 16.03.2015 г. (Приложение № 1) и чрез конкретно разработена Стандартна Оперативна Процедура (СОП), утвърдена от Изпълнителната Агенция по Трансплантация (ИАТ) (Приложение № 2). На участващите пациентки е предоставена подробна информация за естеството на планираните процедури и изследвания, след което всяка от тях е попълнила писмено информирано съгласие (Приложение № 3). Всички пациентки са участвали доброволно и безвъзмедно, без да са получили каквито и да било финансови стимули.

Подбрана е работна група от 20 жени, с доказана фертилност – с поне едно родено дете, в детородна възраст, клинично здрави и не приемащи медикаменти, повлияващи фертилитета и репродуктивните функции. Възрастовият диапазон е от 25 до 41 години. Ендометриалните биопсии са получени чрез щадящ аспирационен метод с Probet катетър/кюрета на фирма Gynetics, с кат.№4164 без да се налага прилагането на локални аналгезия или анестезия. Процедурите по взимане на първоначалните биопсични проби са извършени между осми и единадесети ден от месечния цикъл, след извършен предварителен ултразвуков преглед с 3D GE Logiq P5 видеозон и трансдюсер GE E8C (General Electric Company). Преди всяка биопсия е направен уринарен тест за бременност със SureChek Streamer (UniComs Switzerland GmbH), за да се потвърди/гарантира липсата на бременност. Всяка тъканна проба е взета при стерилни условия и техника, след извършена промивка и дезинфекция на влагалището от лекар със специалност „акушерство и гинекология“, след което веднага е предадена за допълнителната обработка.

При работна температура от 4°C е измерено теглото на пробата (чрез електронна везна MOCCO t3003), етикетирана в криовиалки (1.5 mL CRYO.STM, ф-ма Greiner Bio One) със съответните данни: пациентско ID, тегло и предполагаема фаза на пробата, след което е замразена в течен азот чрез snap freezing. Регистрирани са възраст, ден от месечния цикъл, приложена е снимка от ехографското изследване на малък таз и размерите на ендометриума и диаметър на доминантен фоликул (в случаите на наличие на такъв) (Фигура 9).

Непосредствено след биопсията, на пациентката е взета кръвна проба с обем от 5 mL чрез венозна пункция за изследване на серумното ниво на прогестерон към съответния момент. За колекцията и първоначалната обработка на кръвните проби са използвани моновети 5 mL на ф-ма Greiner Bio

One модел VacuetteR със Z Serum Sep Clot Activator, които са поставени във вертикална позиция за 30 минути при 4-6°C, след което са центрофугирани на центрофуга Hettich Universal 2S (RCF g=1350, 4°C, 10 min.). Така сепарираната серумна фракция е разпределена в равни обеми от по 500 µL и замразена в криовиалки (CRYO.STM ф-ма Greiner Bio One) в течен азот.

При всички пациентки, втората биопсия е направена между 6-ти и 9-ти ден постовулаторно – в предполагаемия имплантационен прозорец, след проследяване на цикъла и след доказана чрез ултразвуков преглед овулация. При 17 от пациентките това се осъществи още в последващия първата биопсия цикъл, при две след два месеца, а при една – три месеца по-късно. Идентично на алгоритъма при първоначалните биопсии, пробите бяха обработени и подготвени за анализ по аналогичен начин.

При всяка пациентка беше взета и кръвна проба за определяне на серумния прогестерон към момента, като тези проби бяха обработен по същия протокол, както пробите от предполагаемите нерецептивни фази – извън рамката на имплантационния прозорец на ендометриума.

4.2 Анализ на серумния прогестерон

Всички проби бяха анализирани за определяне стойностите на прогестерон в кръвния серум на анализатор Cobas e 411/Roche Hitachi, с китове Progesterone III Cobas за електрохемилюминисцентен имуноанализ.

Принцип на теста: конкурентен хемилуминисцентен имуноанализ;

1-ви етап: чрез първично инкубиране на пробата (20 µL) с прогестерон-специфично биотин-асоциирано анти тяло се сформират имунокомплекси, чието количество зависи от концентрацията на анализа в пробата.

2-ри етап: вторично инкубиране - след добавяне на микрочастици, покрити със стрептавидин и на прогестеронов дериват с рутениев комплекс (Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-complex), свободните страни на биотин-асоциираните антитела биват „запълнени“ и заети чрез образуването на анти тяло-хаптен комплекс.

Целият комплекс се свързва в твърда фаза чрез взаимодействието на биотин със стрептавидин.

Реакционната смес се аспирира в измервателната клетка, където микрочастиците се улавят магнитно върху повърхността на електрода, несвързаните компоненти биват премахнати, а чрез подаване на напрежение по електрода се предизвиква хемилуминисцентно лъчение, което се измерва. Резултатите се определят чрез калибровъчна крива, която е специфична за уреда, генерирана чрез двучовково калибриране и заложената към реактивите мастер-крива.

4.3 Обработка на тъканните проби, взети чрез биопсии

След размръзване, тъканните/биопсични проби са претеглени повторно за валидиране на теглото им, след което са обработени/хомогенизирани чрез боросиликатен хомогенизатор (с обем 3 mL) (Фиг. 11) в присъствието на 500 µL стерилен PBS буфер (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich D8537-500, Lot Nr. RNBG5582) в продължение на 5 минути над азотни пари. Получената суспензия е аспирирана и прехвърлена в мини епруветка тип Епендорф 1.5 mL, която беше центрофугирана на центрофуга Hettich Universal 2S (RCF g=700, 4°C, 10 min.). Отделената течна фаза (супернатанта) е

аспирирана и замразена повторно в течен азот за последващ анализ (Фиг. 12). Впоследствие, всички получени по този начин 34 проби са анализирани чрез ензимносвързан имunosорбентен анализ (ELISA).

4.4 Анализ на $\alpha\beta 3$ -интегрин и LIF чрез ELISA

Проследени бяха следните показатели, които за краткост в текста ще бъдат наричани специализирани.

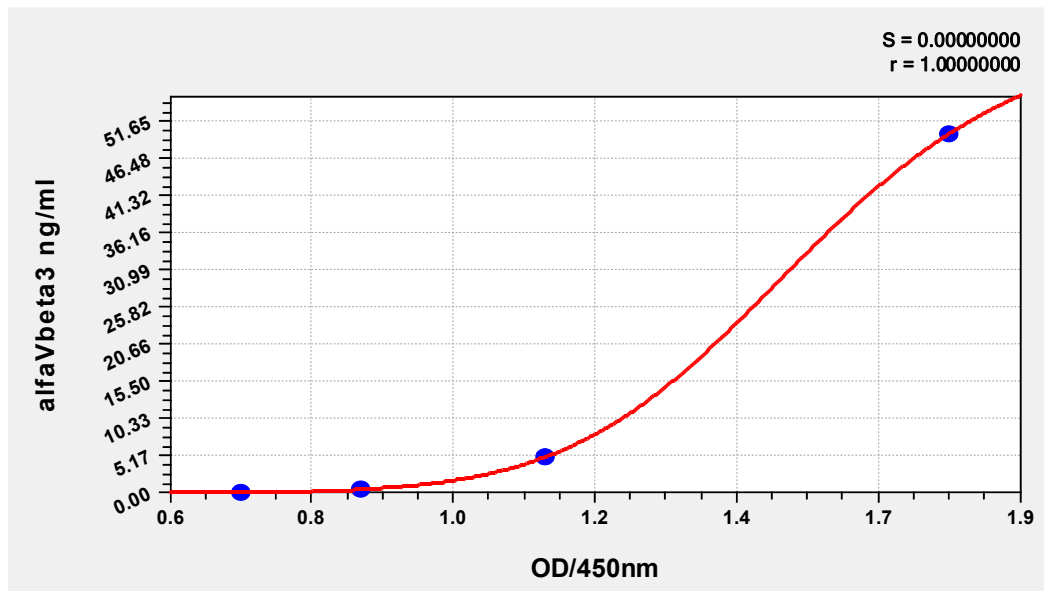
4.4.1 Анализа на $\alpha\beta 3$ -интегрин:

Реактиви: Biotin anti-human CD51/61 Monoclonal Antibody (Kat. Nr. 04412, BioLegend), стерилен PBS буфер (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich D8537-500, 3,3',5,5'-Tetramethy-benzidine Liquid Substrat Supersensitive for ELISA (Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich), m-IgGк BP-HRP - вторично антитяло, конюгирано с Horseradish Peroxidase (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology), Stop Solution – 0.16 M H₂SO₄ (QIAGEN Maryland, USA),

Анализатор: Спектрофотометър BioTek ELx800 (Thermo Fisher Scientific) при дължина на вълната 450 nm.

Принцип: Директен имуноензимен анализ. Ензимната реакция се визуализира посредством субстратен разтвор - TMB (Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich). Интензитетът на цветния продукт е правопрпорционален на количеството $\alpha\beta 3$ -интегрин в пробата. Анализирани са тройни проби.

Оптическите плътности, получени за съответните разреждания на стандартите, бяха използвани за изграждане на стандартна крива, от която бяха изчислени концентрациите за тъканните проби (Фиг. 13).



Фигура 13. Стандартна крива за $\alpha\beta 3$ -интегрин.

4.4.2 Анализа на LIF (левкемия инхибиращ фактор)

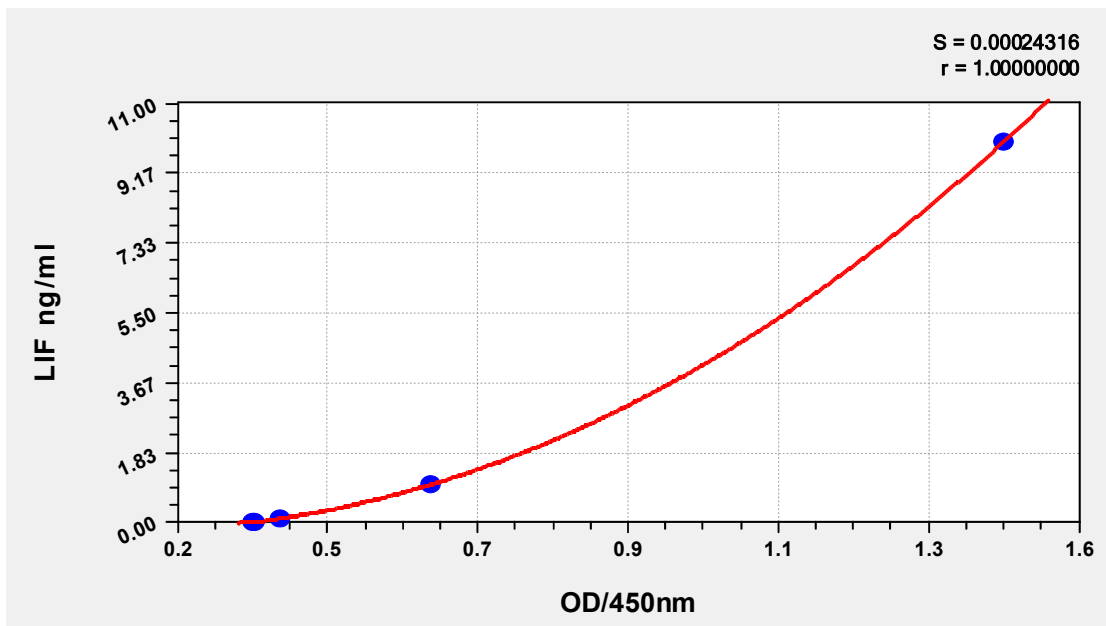
Реактиви: Биотин-конюгирано LIF Monoclonal Antibody (E-10) IgG3 (sc-515931, Santa Cruz Biotechnology), стерилен PBS буфер (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich D8537-500, 3,3',5,5'-Tetramethy-benzidine Liquid Substrat Supersensitive for ELISA (Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich), m-IgGк BP-HRP - вторично антитяло, конюгирано с Horseradish Peroxidase (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology), Stop Solution – 0.16 M H₂SO₄ (QIAGEN Maryland, USA).

Анализатор: Спектрофотометър BioTek ELx800 (Thermo Fisher Scientific) при дължина на вълната 450 nm.

Принцип: Директен имуноензимен анализ. Ензимната реакция се визуализира посредством субстратен разтвор - TMB (Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich). Интензитетът на цветния продукт е правопрпорционален на количеството LIF в пробата. Анализирани са тройни проби.

Оптическите плътности, получени за съответните разреждания на стандартите, бяха използвани за изграждане на стандартна крива, от която бяха изчислени концентрациите за тъканните проби (Фиг. 14).

Фигура 14. Стандартна крива за LIF.



Допълнително бяха подбрани и анализирани 16 проби от използвана култивираща среда за ембриони (SAGE 1-Step, ORIGIO Denmark, Product No: 6701 със следния състав: аминокиселини: Alanyl glutamine , Arg, Asn, Asp, Cystinum, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val; EDTA; Човешки серумен албумин; Вода; Гентамицин; Глюкоза; Хиалурон; KCl; KH_2PO_4 ; Лактат; MgSO_4 ; NaCl; NaHCO_3 ;Пируват; Лактат; Phenolsulfonphthalein).

Анализираните проби бяха подбрани съответно от тридневни ембриони на стадии 6-8-10 бластомера със сходни морфологични характеристики - с равномерно оформени бластомери и фрагментации под 5% .

Беше анализирана и култивираща среда от същите, вече петдневни ембриони в стадий бластоцист със сходни морфологични характеристики – на оформен бластоцист, с ясно визуализирана вътреклетъчна маса и трофобластни клетки, с хомогенна бластоцелна кухина .

Всичките осем ембриона са трансферирани при т.нар единичен ембриотрансфер и като резултат се е получила развиваща се клинична бременност, поради което и бяха подбрани за участие в изследваната група. Предварителното култивиране на ембрионите се извърши в 35 милиметрови петрита (CELLSTAR® greiner bio-one) (Фигура 17) в капки хранителна среда от по 60 до 80 микролитра, под три милилитров слой от минарално олио (FertiCult Mineral Oil с продуктов код: MINOIL500P на ф-ма FertiPro NV, Belgium), като всяко петри е подготвено дванадесет часа предварително и преинкубирано в

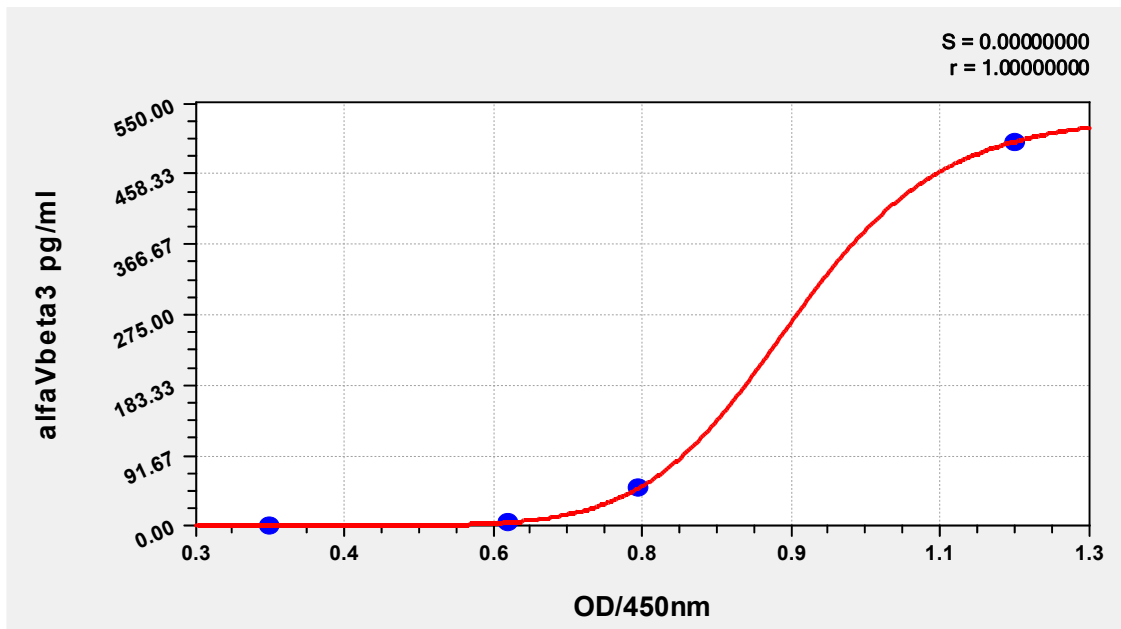
инкубатор (MicroGalaxy) при 37°C и 5.5% CO₂ с оглед постигане на желано рН на средата от 7.3±0.1, съгласно указанията и протокола на фирмата производител. Калибровката на CO₂ инкубатора е направена с еталонен рН-метър Microsyst MS2000 LabLine.

За всяка от подготвените за изследване проби бе замразена 50 µL от използваната среда в контейнер мини-епруветка тип Епендорф 1.5 mL, след като бяха описани количеството среда, ден от култивиране, както и ембрионалния стадий. Впоследствие бяха анализирани същите показатели – αvβ3-интегрин и LIF (левкемия инхибиращ фактор).

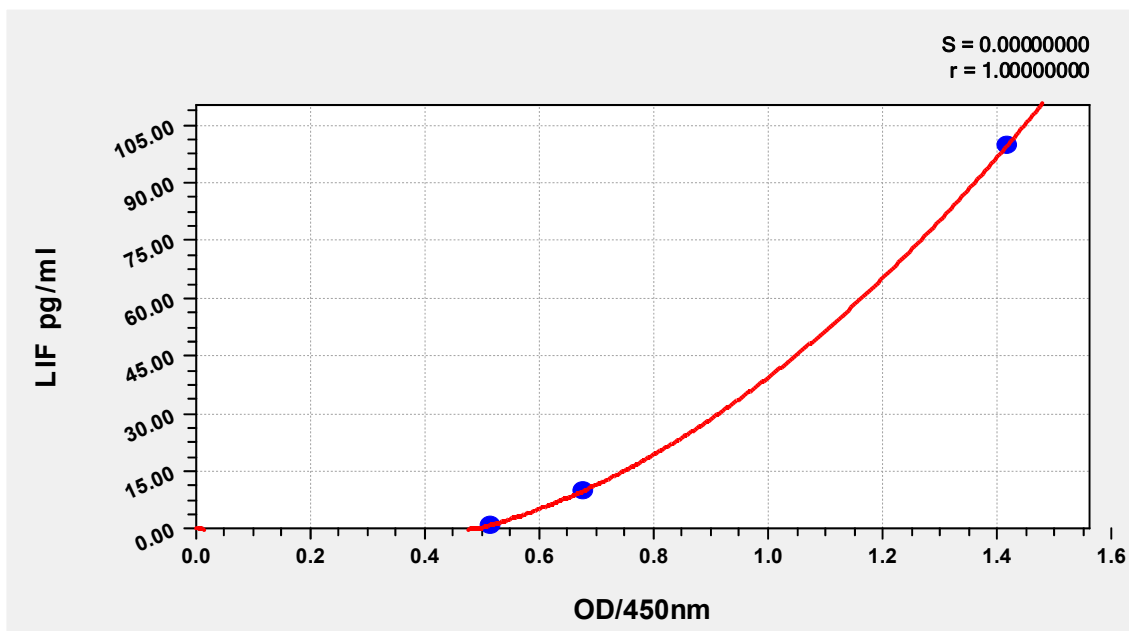
Последващият анализ на пробите от култивиращата среда и на супернатаната от хомогенизираните тъканни проби се извърши по идентичен начин – след размразяване епендорфките бяха центрофугирани с оглед елеминиране на клетъчни остатъци (RCF g=700, 10 min.). Бяха заложени триплети по 50 µL от всяка проба в 96-ямкови полистиренови плаки (TPP, Techno Plastic Products AG, Kat.Nr. 92096).

За позитивни контроли бяха заложени 50 микролитрови триплети със стандарти на Human integrin αvβ3 (Part Number 357, YO Proteins AB) и LIF (hBA) (sc-4988, Santa Cruze Technology), а за негативни контроли се отпипетираха съответните триплети с PBS буфер, както и с неизползвана култивираща среда SAGE 1 Step - при анализа на пробите от използваната култивираща среда. Като негативна контрола за специфичността на антителата бяха заложени триплети с колаген тип II, след което платките бяха инкубирани за 20 часа при 4°C. (Фиг. 18) След времето на инкубиране, реакцията беше блокирана за период от 1 час, с 5% стерилен говежди фетален серум (Sigma-Aldrich) – 100 µL във всяка ямка. Последва тройно промиване с 200 µL стерилен PBS буфер (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich D8537-500, Lot Nr. RNBG5582). На следващ етап бяха добавени по 50 µL от съответните антитела, с концентрации 5 µg/mL и плаките бяха инкубирани за време 1 час на стайна температура. След тройна промивка с 200 µL стерилен PBS буфер, бяха добавени 50µL от вторичното антитяло, конюгирано с Horseradish Peroxidase (m-IgGκ BP-HRP: sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) с концентрация 1 µL/ml и време на инкубация 45 минути на стайна температура. След тройна промивка със стерилен PBS буфер се добавиха 50 µL субстрат (Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich) за цветна визуализация на реакцията за време 15 минути на стайна температура (Фиг. 19) след което бяха добавени 50 µL стоп разтвор (0.16 M H₂SO₄ Stop Solution, QIAGEN Maryland, USA) за блокиране и обезцветяване на реакцията (Фиг. 20) и подготовката за разчитане в ELISA-анализатора (BioTek ELx800) при дължина на вълната 450 nm. Процедурата по разчитането се извърши в рамките на 10-12 минути от първоначалното блокиране на пробите.

Оптическите плътности, получени за съответните разреждания на стандартите, бяха използвани за изграждане на стандартна крива, от която бяха изчислени концентрациите (Фиг. 21 и Фиг. 22) за пробите от средата за култивиране.



Фигура 21. Стандартна крива за $\alpha v\beta 3$ -интегрин за средата за култивиране.



Фигура 22. Стандартна крива за LIF за средата за култивиране.

Анализът на концентрациите на общия белтък в различните проби (тъканните супернатанти и от култивиращата среда) се извърши чрез

отпипетирване и замерване на 2 μ L от всяка проба на NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

4.5 Статистически методи и обработка на данните

Статистическите анализи са проведени със Statview vers. V софтуерен продукт. Таблиците и фигурите са построени чрез програмния пакет OpenOffice 3.4.1., а за графичната обработка и анализ на ELISA данните е използван Curve Expert 1.4.

За всеки от показателите е изчислена средната стойност (Mean), стандартната грешка (SEM) и стандартното отклонение (SD). За определяне на статистическата значимост на резултатите е прилаган **Student's t-test** за зависими (свързани) извадки по отношение анализа на тъканните проби и независими (несвързани) пробите от използвана култивираща среда.

При всички анализи, разликите с $p < 0.05$ се определят като статистически значими. Обработката на всички снимки е направена чрез „Canva Design online tool”- www.canva.com

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от проследените и изследвани показатели са представени от таблица 3 до таблица 25 и от фигура 23 до фигура 35.

Таблица 3. Възрастово разпределение на пациентската група.

Пациент №	Възраст	Пациент №	Възраст	Пациент №	възраст	Пациент №	възраст
1	31	6	41	11	41	16	25
2	25	7	36	12	41	17	41
3	30	8	29	13	25	18	30
4	33	9	36	14	36	19	30
5	41	10	32	15	38	20	41

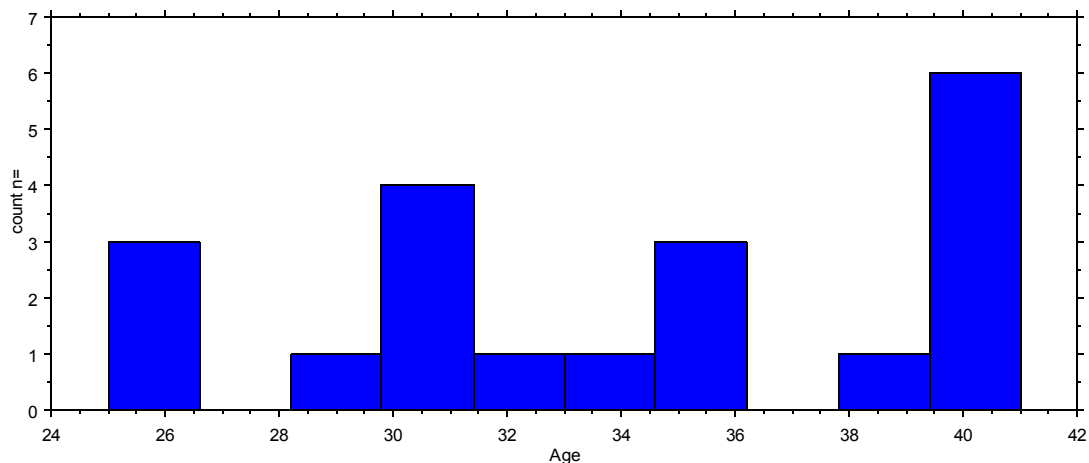
Age	
Mean	34,100
Std. Dev.	5,857
Std. Error	1,310
Count	20
Minimum	25,000
Maximum	41,000
# Missing	0

Най-младата участничка в изследването е на 25 години, а най-възрастните пациентки на 41. Средна възраст (MEAN) на групата: 34.1 г. \pm 5.857

(SD). Разпределението им като брой и представителна честота е показано на Фиг. 23.

Най-ранният ден на който бяха взети биопсични проби от нерецептивната ендометриална фаза е ден 9-ти от МЦ, а най-късният ден 17-ти. В предполагаемата рецептивна (In) фаза с активен имплантационен прозорец най-ранна проба е взета на 16-ти ден от МЦ, а най-късната на ден 24-ти.

Честотата на разпределение на вземане на пробите от съответните дни в нерецептивната out-фаза са показани в Таблица 5 и Фиг. 24



Фигура 23. Брой пациентки от съответната възрастова група.

Таблица 4. Обобщени данни за дните, в които са взети биопсичните проби съответно за рецептивна IN-фаза и нерецептивна Out-фаза

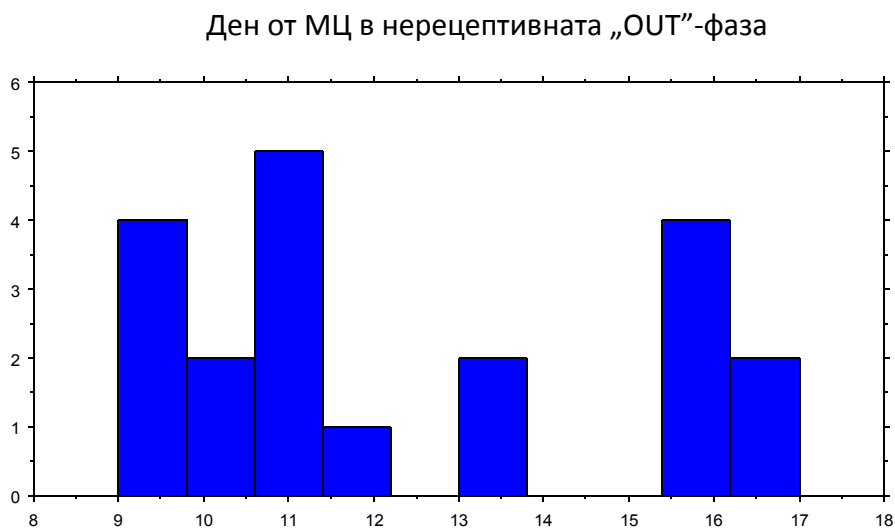
	MEAN	Std.Dev.	Std.Error	брой	най-ранен ден	най-късен ден
Ден от МЦ в Out-фаза	12,3	2,93	0,65	20	9	17
Ден от МЦ In-фаза	20,9	2,55	0,57	20	16	24

Прави впечатление, че макар и условно обобщен, средният за работната група ден на предполагаем имплантационен прозорец е 21-ви ден от месечния цикъл.

Таблица 5. Брой на биопсични проби в съответните дни от нерецептивната фаза на ендометриалния цикъл.

От	До	Брой
9	10	4
10	11	2
11	11	5
11	12	1
12	13	0
13	14	2
14	15	0
15	15	0
15	16	4
16	17	2
	Общо:	20

брой
биопсии



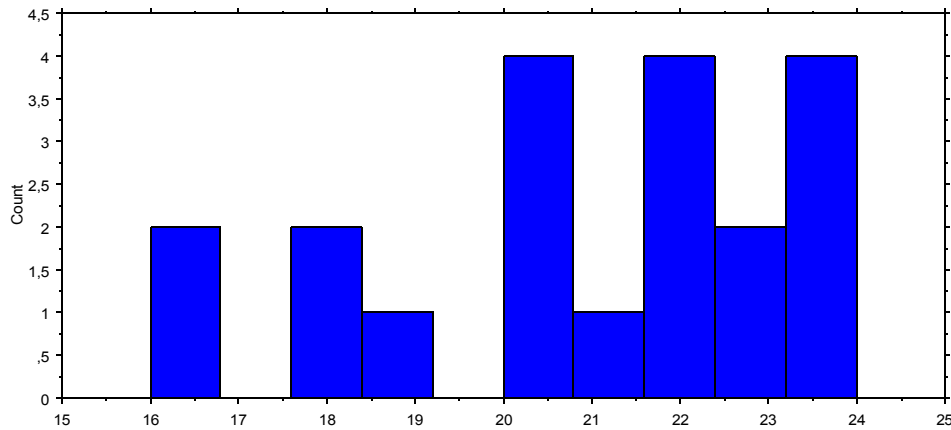
Фигура 24. Брой на пробите в зависимост от деня на вземане на биопсията в нерцептивна фаза.

По отношение на взетите проби в предполагаемата рецептивна ендометриална фаза, т.нар. IN-фаза, разпределението по дни е представено на Фиг. 25 , както и в Таблица 6.

Таблица 6. Брой на биопсични проби в съответните дни от рецептивната фаза на ендометриалния цикъл.

От	До	Брой
16.0	16.8	2
16.8	17.6	0
17.6	18.4	2
18.4	19.2	1
19.2	20.0	0
20.0	20.8	4
20.8	21.6	1
21.6	22.4	4
22.4	23.2	2
3.2	24	4
Общо:		20

брой
биопсии



Ден от МЦ в рецептивната „IN”-фаза

Фигура 25. Честота на пробите в зависимост от деня на вземане на биопсията в рецептивна фаза.

Преобладаващите дни на пробовземане са между 20-ти и 24-ти, само при 5 пациентки дните на предполагаемата рецептивна фаза са между 16-ти и 19-ти ден от МЦ.

Измерените стойности на прогестерона в серума на пациентките са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Стойности на прогестерона в серума през рзличните ендометриални фази.

пациент №	P4 ng/ml	пациент №	P4 ng/m	пациент №	P4 ng/m	пациент №	P4 ng/m
1	31,00	6	8,02	11	14,41	16	16,01
2	15,02	7	15,34	12	31	17	10,55
3	14,7	8	17,75	13	8,02	18	10,56
4	13,9	9	18,7	14	9,87	19	23,5
5	14,42	10	12,11	15	16,01	20	23,51

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
ProgesteronOUT, ProgesteronIN	-16,031	19	-10,566	<,0001

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Count	Minimum	Maximum	# Missing
ProgesteronOUT	,342	,385	,086	20	,050	1,200	0
ProgesteronIN	16,372	6,615	1,479	20	8,020	31,000	0

Констатирант се осезаеми разлики в стойностите на хормона в двете фази – нерецептивната и рецептивната фаза, по време на предполагаемия имплантационен прозорец.

В допълнение беше направен сравнителен анализ на дебелината на ендометриалната лигавица между пациентките, представители на двете групи (Таблица 8 и Таблица 9).

Таблица 8. Съпоставяне дебелината на ендометриалната лигавица на пациентките в групата в нерецептивната Out-фаза.

пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm
1	10,02	6	8,50	11	9,70	16	11,50
2	10,10	7	8,30	12	8,60	17	10,55
3	10,02	8	8,90	13	8,30	18	10,56
4	8,50	9	10,30	14	10,20	19	10,60
5	10,3	10	12,4	15	8,9	20	10,6

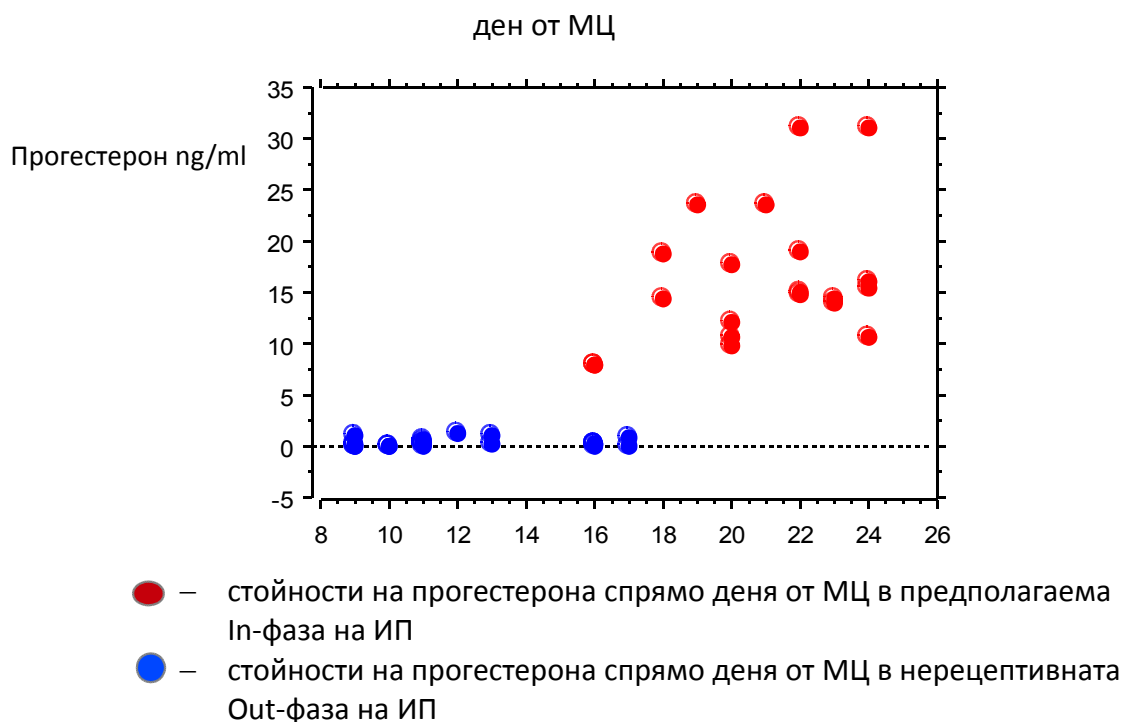
Констатирант се осезаеми и статистически значими разлики в дебелината (mm) на ендометриалната лигавица в нерецептивната и предполагаема рецептивна фаза от МЦ.

Таблица 9. Съпоставяне дебелината на ендометриалната лигавица на пациентките в групата в предполагаемата рецептивна In-фаза.

пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm	пациент №	лигавица mm
1	11,00	6	10,30	11	8,80	16	18,30
2	12,90	7	11,10	12	10,30	17	19,89
3	10,30	8	10,70	13	12,90	18	19,90
4	10,80	9	13,60	14	11,10	19	11,50
5	10,30	10	10,5	15	10,2	20	11,50

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
mm_IN, mm_OUT	2,463	19	3,998	,0008

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Count	Minimum	Maximum	# Missing
mm_IN	12,295	3,247	,726	20	8,800	19,900	3
mm_OUT	9,832	1,119	,250	20	8,300	12,400	3



Фигура 26. Разпределение на стойностите на серумен прогестерон спрямо деня и фазата от МЦ.

Отчетените стойности на **LIF** са представени в Таблица 10 и Таблица 11, а статистическата обработка на резултатите в Таблица 12.

Данните сочат, че е налице значителна разлика в концентрациите на LIF в двете фази на ендометриалния цикъл, като положителната динамика е в полза на предполагаемата рецептивна фаза (периода на активния имплантационен прозорец).

Таблица 10. OD стойности на LIF от биопсичните проби в нерцептивната ендометриална фаза на имплантационния прозорец.

пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD
1	0,815	6	1,036	11	1,287	16	0,684
2	1,724	7	0,897	12	1,037	17	0,459
3	0,384	8	0,759	13	1,728	18	0,443
4	0,443	9	0,82	14	1,861	19	0,383
5	1,52	10	1,06	15	1,52	20	0,65

Таблица 11. OD стойности на LIF от биопсичните проби в предполагаемата рецептивна ендометриална фаза (In-фаза на имплантационния прозорец)

пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD
1	1,16	6	1,751	11	1,231	16	0,754
2	1,706	7	1,301	12	1,751	17	0,667

3	0,754	8	1,249	13	1,703	18	0,712
4	0,757	9	1,158	14	1,737	19	0,755
5	2,13	10	1,29	15	2,12	20	1,03

Таблица 12. Статистически данни за OD стойностите на LIF в биопсичните проби за IN и OUT-фазите на имплантационния прозорец.

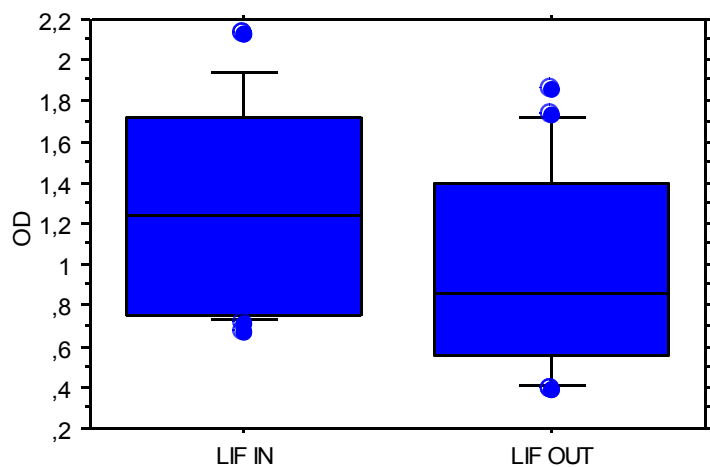
	MEAN	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
LIF In-фаза	1,29	0,48	0,11	20	0,67	2,13
LIF Out-фаза	0,98	0,48	0,11	20	0,38	1,86

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
LIF IN, LIF OUT	,311	19	5,597	<,0001

Изчислена стойност за $t = 5,597$, $p < 0,0001$, резултатите са статистически значими.



Фигура 27. Съпоставка на динамиката в стойностите на LIF за IN и OUT-фазите на имплантационния прозорец.

Отчетените стойности на $\alpha v \beta 3$ са представени в Таблица 13 и Таблица 14, а статистическата обработка на резултатите в Таблица 15.

Таблица 13. OD стойности на $\alpha\upsilon\beta 3$ от биопсичните проби в предполагаемата рецептивната ендометриална фаза (In-фаза на имплантационния прозорец)

пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD
1	1,889	6	2,089	11	2,049	16	1,618
2	2,003	7	1,745	12	2,008	17	1,114
3	1,445	8	2,155	13	2,008	18	1,318
4	1,470	9	1,935	14	2,112	19	1,439
5	2,43	10	1,82	15	2,4	20	1,73

Таблица 14. OD стойности на $\alpha\upsilon\beta 3$ от биопсичните проби в предполагаемата нерецептивна ендометриална фаза (Out-фаза на имплантационния прозорец)

пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD	пациент №	OD
1	1,276	6	1,506	11	2,09	16	1,457
2	1,916	7	1,953	12	1,508	17	0,846
3	1,244	8	1,549	13	1,917	18	1,081
4	1,254	9	1,203	14	2,391	19	1,243
5	2,1	10	1,356	15	2,1	20	1,901

Таблица 15. Статистически данни за OD стойностите на $\alpha\upsilon\beta 3$ за IN и OUT-фазите на имплантационния прозорец.

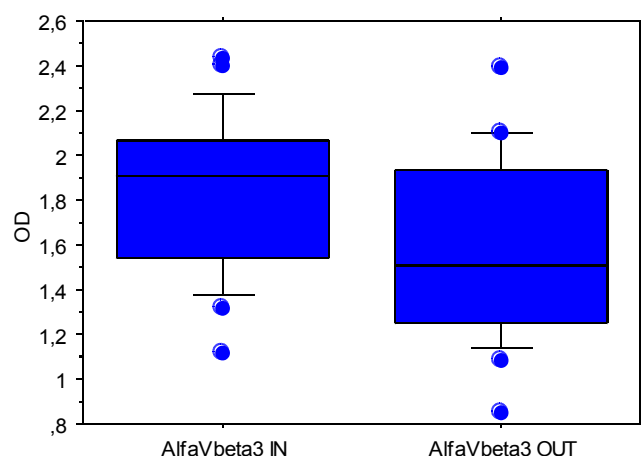
	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
$\alpha\upsilon\beta 3$ In-фаза	1,839	0,353	0,079	20	1,11	2,431
$\alpha\upsilon\beta 3$ Out-фаза	1,6	0,420	0,094	20	0,85	2,39

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
AlfaVbeta3 IN, AlfaVbeta3 OUT	,244	19	3,832	,0011

Изчислена стойност за $t=3,832$, $p<0,0011$, резултатите са статистически значими



Фигура 28. Съпоставка на динамиката в стойностите на $\alpha\beta 3$ интегрин за IN и OUT-фазите на имплантационния прозорец.

Обобщените данни от проведените сравнителни анализи са представени в следващите таблици и фигури. Получените резултати сочат, че е налице значителна разлика в концентрациите на $\alpha\beta 3$ интегрин в двете фази на ендометриалния цикъл, като положителната динамика и за този потенциален маркер е в полза на предполагаемата рецептивна фаза (периода на активния имплантационен прозорец).

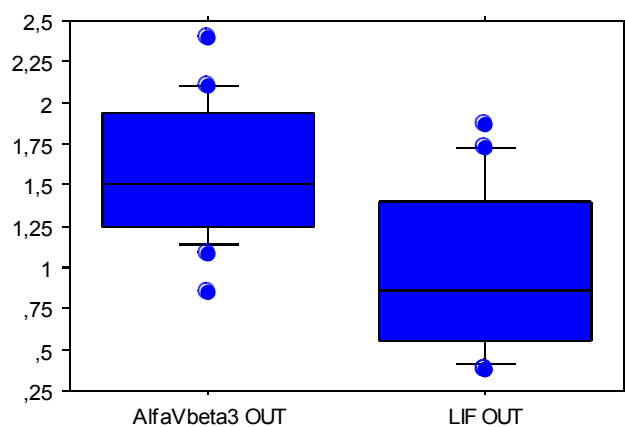
Таблица 16. Обобщена съпоставка между данните за концентрациите на $\alpha\beta 3$ интегрин и LIF в биопсичните проби в предполагаемата нерепетивна ендометриална фаза (Out-фаза на имплантационния прозорец)

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
$\alpha\beta 3$ Out-фаза	1,595	0,420	0,094	20	0,85	2,391
LIF Out-фаза	0,98	0,484	0,108	20	0,3	1,86

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
AlfaVbeta3 OUT, LIF OUT	,620	19	9,872	<,0001



Фигура 29. Графична обобщена съпоставка на концентрациите на $\alpha\beta 3$ -интегрин и LIF в биопсичните проби от т.нар. Out-фаза на имплантационния прозорец.

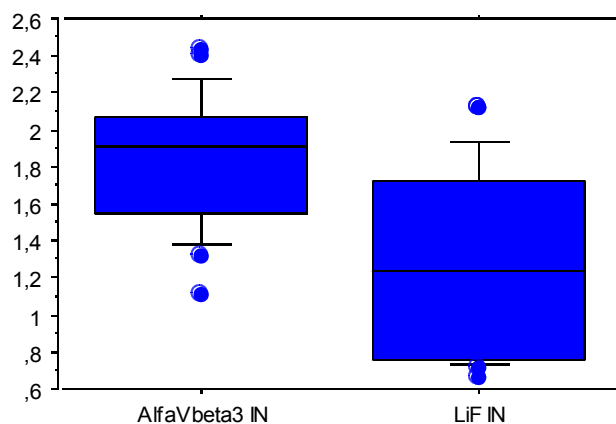
Таблица 17. Обобщена съпоставка между данните за концентрациите на $\alpha\beta 3$ интегрин и LIF в биопсичните проби в предполагаемата рецептивната ендометриална фаза (IN-фаза на имплантационния прозорец)

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
$\alpha\beta 3$ IN- фаза	1,839	0,352	0,079	20	1,12	2,431
LIF IN-фаза	1,29	0,478	0,107	20	0,6	2,13

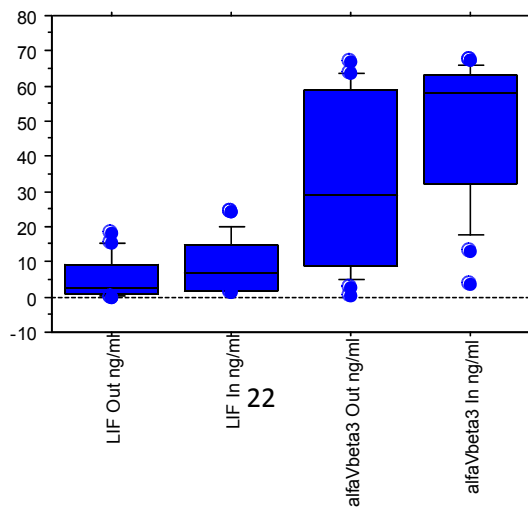
Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
AlfaVbeta3 IN, LiF IN	,553	19	11,289	<,0001



Фигура 30. Графична обобщена съпоставка на концентрациите на $\alpha\beta 3$ -интегрин и LIF в биопсичните проби от т.нар. IN-фаза на имплантационния прозорец.



Фигура 31. Обобщена съпоставка на абсолютните концентрации на $\alpha\beta 3$ -интегрин и LIF в биопсичните проби от т.нар. IN-фаза и Out-фаза на имплантационния прозорец.

Таблица 18. OD стойности на LIF от използваната култивираща среда на 3-дневните ембриони.

<i>Ембрион №</i>	<i>OD</i>	<i>Ембрион №</i>	<i>OD</i>
1	1,442	5	0,872
2	1,807	6	1,164
3	0,844	7	1,423
4	0,962	8	0,429

Таблица 19. OD стойности на LIF от използваната култивираща среда на 5-дневните ембриони

<i>Ембрион №</i>	<i>OD</i>	<i>Ембрион №</i>	<i>OD</i>
1	0,71	5	1,091
2	2,082	6	1,052
3	1,758	7	1,483
4	1,613	8	1,065

Таблица 20. Статистически данни и анализ за OD стойностите на LIF за среда от 3- и 5-дневни ембриони.

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стоност	Макс.стойност
LIF 5-ти ден	1,356	0,453	0,160	8	0,71	2,082

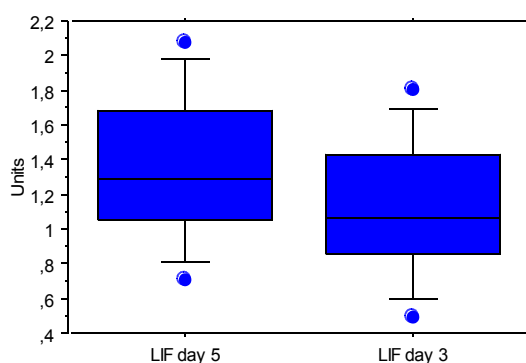
LIF 3-ти ден	1,125	0,419	0,148	8	0,49	1,81
--------------	-------	-------	-------	---	------	------

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
LIF day 5, LIF day 3	,231	7	1,275	,2431

Изчислена стойност за $t=1,275$, $p=0,2431$, разликите в резултатите не са статистически значими.



Фигура 32. Съпоставка на динамиката в стойностите на LIF между ден 5-ти и ден 3-ти.

Таблица 21. OD стойности на $\alpha\beta3$ от използваната култивираща среда на 3-дневните ембриони.

Ембрион №	OD	Ембрион №	OD
1	1,883	5	1,257
2	2,363	6	1,882
3	1,187	7	2,222
4	1,238	8	0,794

Таблица 22. OD стойности на $\alpha\beta3$ интегрин от използваната култивираща среда на 5-дневните ембриони.

Ембрион №	OD	Ембрион №	OD
1	1,36	5	1,746
2	2,329	6	2,482
3	2,222	7	2,630
4	2,603	8	2,643

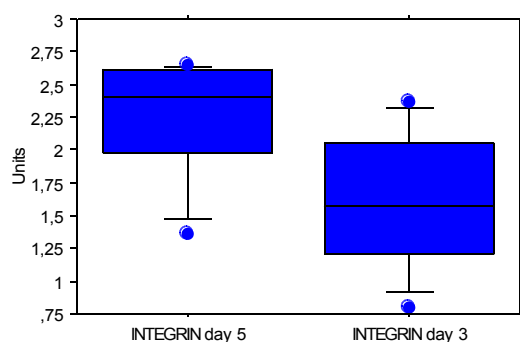
Таблица 23. Статистически данни и анализ за OD стойностите на $\alpha\beta 3$ интегрин за среда от 3- и 5-дневни ембриони.

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
$\alpha\beta 3$ 5-ти ден	2,25	0,467	0,165	8	1,36	2,643
$\alpha\beta 3$ 3-ти ден	1,603	0,560	0,198	8	0,79	2,36

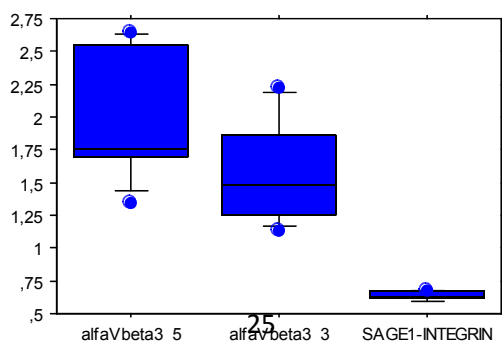
Paired t-test
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
INTEGRIN day 5, INTEGRIN day 3	,649	7	2,423	,0459

Изчислена стойност за $t=2,423$, $p=0,0459$, разликите в резултатите са статистически значими.



Фигура 33. Съпоставка на динамиката в стойностите на $\alpha\beta 3$ интегрин между ден 5-ти и ден 3-ти.



Фигура 34 Графична съпоставка на стойностите за $\alpha\beta 3$ (OD) спрямо тези на базовите за култивиращата среда.

По отношение на експресията на $\alpha\beta 3$ в ембрионалната култивираща среда на 3-дневни и 5-дневни ембриони, прави впечатление, че се установява експресия на интегрин от страна на всеки един от изследваните ембриони. Резултатите са статически значими ($p=0,0004$ за $\alpha\beta 3$ от ден 3-ти спрямо негативната контрола и $p=0,0001$ за $\alpha\beta 3$ от ден 5-ти спрямо негативната контрола), съпоставяйки ги спрямо негативната контрола на неизползвана SAGE One Step култивираща среда

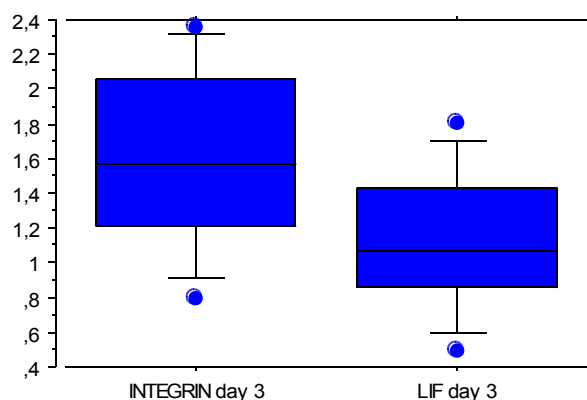
Таблица 24. Обобщена съпоставка на статистическите данни и анализ за OD стойностите на LIF и $\alpha\beta 3$ интегрин в среда от 3-дневни ембриони.

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стойност	Макс.стойност
$\alpha\beta 3$ 3-ти ден	1,603	0,560	0,198	8	0,794	2,363
LIF 3-ти ден	1,13	0,419	0,148	8	0,492	1,807

Paired t-test

Hypothesized Difference = 0

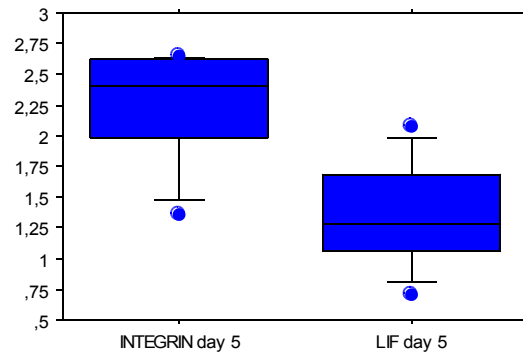
	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
INTEGRIN day 3, LIF day 3	,478	7	6,925	,0002



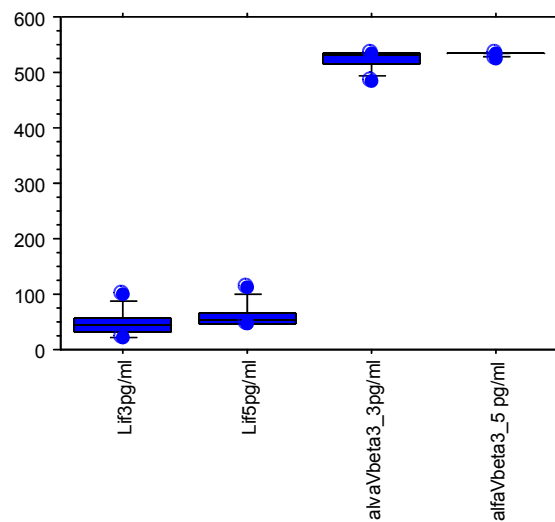
Фигура 35. Графична съпоставка на стойностите на $\alpha\beta 3$ интегрин и LIF в среда на 3 дневни ембриони.

Таблица 25. Обобщена съпоставка на статистическите данни и анализ за OD стойностите на LIF и $\alpha\beta 3$ интегрин в среда от 5-дневни ембриони.

	MEAN OD	Std.Dev.	Std.Error	брой	Мин.стоност	Макс.стойност
$\alpha\beta 3$ 5-ти ден	2,25	0,467	0,165	8	1,36	2,643
LIF 5-ти ден	1,356	0,453	0,160	8	0,71	2,08



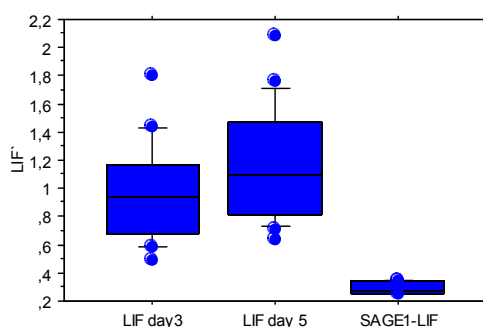
Фигура 36. Графична съпоставка на стойностите на $\alpha\beta 3$ интегрин и LIF в среда на 5 дневни ембриони.



Фигура 37. Обобщена съпоставка на абсолютните концентрации на $\alpha\beta 3$ -интегрин и LIF в пробите от използвана среда за култивиране.

Таблица 26. Групиране на вариабилните стойности за LIF от ден 3-ти и ден 5-ти от култивиране спрямо стойностите на неизползваната среда, в независими (несвързани) извадки. Резултатите са статистически значими и потвърждават наличието на LIF в средата, след култивиране на ембрионите.

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
LIF day3, LIF day 5	-,190	38	-1,653	,1066
LIF day3, SAGE1-LIF	,681	38	8,488	<,0001
LIF day 5, SAGE1-LIF	,871	34	9,431	<,0001



Фигура 38. Графична съпоставка на стойностите за LIF (OD) спрямо тези на базовите за култивиращата среда.

По отношение на експресията на LIF в ембрионалната култивираща среда на 3-дневни и 5-дневни ембриони, прави впечатление, че се установява експресия на LIF от страна на всеки един от изследваните ембриони. Резултатите са статически значими (<0,001), съпоставяйки ги спрямо негативната контрола на неизползвана SAGE One Step култивираща среда

5. ОБСЪЖДАНЕ

Предпоставка за успешна имплантация е подходящото и пълноценно развитие на ембриона към момента на развитие на стадий бластоцист и едновременно с това, развитие на ендометриума до етап, в който е рецептивен за ембриона. Имплантацията е сложен, но и много елегантен и прецизен в своята комплексност процес, който се регулира и зависи от редица хормони, интерлевкини, растежни фактори и интегрални протеини, и кръстосаните взаимодействия между тях (Tabibzadeh & Babaknia, 1995; Cha et al., 2012). В настоящия дисертационен труд се опитахме да опишем и обобщим, а в последствие подберем потенциално подходящи фактори, явяващи се както маточни, така и ембрионални такива, с ключова роля в комуникацията между ембриона и ендометриума и маркиращи есенциалния за успешната ембрионална имплантация времеви диапазон. Разбирането и охарактеризирането на специфичните във времето и динамиката си експресия на тези молекули – прогестерон, LIF и $\alpha\beta 3$ -интегрин, ще позволи

разработването и приложението им като определящи фактори в един прогностичен, с потенциал за развитие до диагностичен модел за имплементиране в клиничната практика в сферата на асистираната репродукция.

Овариалните стероидни хормони прогестерон и естрадиол играят ключова роля в мобилизирането и активирането на различни молекулярни модулатори и медиатори в пространствено-времената форма на механизмите, осигуряващи и поддържащи имплантационния процес (Carson et al., 2000; Lim et al., 2002; Sharma & Majumdar, 2016). Под влиянието на овариалните хормони и в частност на прогестерона във времената рамка, маркираща периода на имплантация, ендометриумът претърпява редица промени и навлиза в подходящото морфологично и функционално състояние, позволяващо прикрепването на бластоциста към маточната стена. Прогестеронът поема доминираща роля за развитието на ендометриума и подготовката му за имплантацията и развитието на бременността.

Установените от нас данни за значителното повишение на серумния прогестерон в периода на предполагаемия имплантационен прозорец (средна стойност /Mean/ 16.372 ng/ml) спрямо периода на нерцептивната фаза (средна стойност /Mean/ 0.342 ng/ml) потвърждава ролята и важността му за имплантацията, имайки предвид есенциалното му значение, включително и за секрецията на прогестерон-зависими протеини: PEP-протеини (PP12, PP14), IGFBP2-протеин, протеин 14, интегрини, гликопротеини, както и Mucin 1 протеини (Bergeron, 2000). Стойностите са напълно логични с влиянието на прогестерона върху секрецията на простагландини (PGE2, PGF2), повлияващи морфологичните промени в ендометриалната строма след 20 ден от МЦ, подготвящи предстоящата (евентуална) имплантация. Данните за корелацията между високите серумни стойности на прогестерона и появата на пиноподите (Stavreus-Evers et al. 2002) – морфологичния маркер на имплантационния прозорец, за съжаление трудно приложим в рутинната клинична практика, благоприятстват в допълнителна степен включването му в комплексен предиктивен модел за установяването на имлантационения прозорец (Martel et al., 1991; Usadi et al., 2003).

Невъзможни за идентифициране без подходяща обработка на биопсихните проби и последваща електронна микроскопия, пиноподите са единствения потвърден морфологичен маркер за наличието на „отворен“ имплантационен прозорец, тоест максимално рецептивен ендометриум (Nikas, 1999; Stavreus-Evers, 2005; Develioglu et al., 1999). Те представляват цитоплазмени протрузии в апикалната страна на ендометриалните епителни клетки (Фиг. 7.), като броят им е различен при различните пациентки, но данните сочат за наличие на връзка между бройката им и успешната имплантация (Nikas, 1999). Функционалната им задача е да предотвратяват „измиването“ на ембриона от маточните флуиди и цилиарните движения на ендометриалния епител и да подпомогнат близък контакт на бластоциста с ендометриалната повърхност.

Сравнително лесният, неинвазивен и бърз начин за анализ на кръвните проби, предоставя подходяща възможност за работа с прогестерона и приложението му като рецептивен маркер. Наличните данни за изследвания и проучвания върху ефекта на прогестероновите стойности върху резултатите от процедури по асистирана репродукция в зависимост от конкретните стойности на серумните концентрации (Castillo et al., 2015; Dai et al., 2015; Ejubović et al., 2016; Li et al., 2015; Venetis et al., 2016), в допълнителна степен предразполагат

към възприемане на многостранното му приложение и информативния му потенциал. Значението му като един от най-важните (а вероятно и най-важният) хормон на бременността се предопределя и от това, че създава адекватна имунологична среда за бластоциста и по този начин е есенциално необходим освен за реализирането на имплантация, така също и за запазване на развиващата се бременност (Piccinni et al., 1995; Stites & Siiteri, 1983; Stites et al., 1983;). В периимплантационния период и началото на бременността, след успешна имплантация, прогестеронът бива секретирани от корпус лутеум а трофобластните клетки произвеждащи човешки бета хорионгонадотропин (β -HCG) поддържат прогестероновата секреция интактна (Spencer et al., 2004), до момента, в който плацентата поеме функцията за секрецията му. Ефектът който представлява интерес за нас в контекста на настоящата работа и установените прогестероновы стойности в различните фази, е обусловен от влиянието на прогестерона върху ендометриалните стромални клетки. В хода на децидуализационния процес стромалните ендометриални клетки се диференцират, като отговор на прогестероновото влияние, в децидуални клетки (Dunn et al., 2003). При липса на адекватна прогестеронова секреция, а в случай на необходимост суплементираща терапия, последствията са прекъсване на ембрионалното развитие и загуба на бременността (Porstmann & Arck, 2005).

Друга характеристика на прогестерона, която интерпретираме като важна в контекста на концепцията ни, е обстоятелството, че той има свойството на естествен имуносупресор за майчиния организъм (Stites & Siiteri, 1983; Stites et al., 1983b), в допълнение на което са и установените данни, че редуцира имунологичната реакция на майчините лимфоцити в ин витро условия (Salomon et al., 2005) . Имуномодулацията чрез прогестероновия ефект е един от механизмите за развитието на нормална бременност (Szekeres-Bartho et al., 1997).

Установените данни за различните стойности на LIF в ендометриалните проби от периода на нерцептивната фаза и тези от периода на предполагаемия имплантационен прозорец са в унисон с очакванията ни при разработката на модела. Получените изменения на количествата LIF са в прогресиращ порядък от OUT-фаза към IN-фаза. Потвърждават се изводите за участието на цитокините и в частност LIF в регулацията на ендометриума в посока рецептивна фаза и статус. Действието на левкемия инхибиращия фактор се осъществява чрез свързването му с неговия рецептор LIFR, формирайки хетеродимер със специфична субединица, гликопротеин 130 (gp130), характерна не само за LIF, но и за всички членове на интерлевекин-6 фамилията (CT1, IL-11, CNTF, OStatM). Това води до активиране на механизмите на различни ензимни активности JAK-STAT (Janus киназията сигнален трансмитер и активатор на транскрипцията), MAPK (митоген активирана протеин-киназа) или P13/AKT (фосфатидилинозитол-3-киназа/Акт) (Carino et al., 2008; Cheng et al., 2001; Heinrich et al., 2003). Сигналната трансдукция на LIF в ендометриума се осъществява основно чрез JAK-STAT механизма, предизвиквайки фосфорилиране на транскрипционни фактори от STAT-фамилията (сигнална трансдукция и активация на транскрипцията) (Schindler & Darnell, 1995).

Бластоцистите експресират LIF и двата му рецептора LIFR и gp130 (Wånggren et al., 2007), а gp130 е присъстващ в луминалния и жлезистия епител през целия месечен цикъл (Cullinan et al., 1996), предполагайки необходимостта от сигналната верига на LIF за осъществяване на комуникацията с готовия за

имплантация бластоцист, посредничейки за паракринни сигнали към ембрионалната тъкан и автокринни/паракринни сигнали в ендометриума (Aghajanova, 2010). Действително LIF има роля в имплантацията на бластоциста и конкретно в адхезивната и инвазивната фаза, чрез регулационния си ефект върху трофобластната диференциация, а преди това чрез адхезионния и прикрепващ ефект (Dimitriadis et al., 2010; Tapia et al., 2008).

Установените от нас стойности на LIF и разликите в тях през различните фази (рецептивна-в имплантационния прозорец и нерцептивна) на ендометриума са в потвърждаващ синхрон с гореописаните данни и резултати от цитираните автори, включително и спрямо експерименталния ин витро модел на Laird et al., 1997 (Borthwick et al., 2003), което прави изборът ни за разглеждането на LIF и включването му като участник в предиктивен модел за установяване на имплантационния прозорец като резонно и логично, а след извършените изследвания и получените резултати, като напълно обосновано.

По отношение на експресията на LIF в ембрионалната култивираща среда на 3-дневни и 5-дневни ембриони, действително установихме експресия на LIF от страна на всеки един от изследваните ембриони. Резултатите са статистически значими, както е видно от Таблица 26 и Фигура 37, съпоставяйки ги спрямо негативната контрола на неизползвана SAGE One Step култивираща среда.

Нашите данни обаче не потвърждават информацията от предходни изследвания и анализи на други екипи (Zollner et al., 2012), които докладват данни за значителни разлики в концентрациите на LIF в средата от три и пет дневни ембриони, и чиито резултати биват интерпретирани в контекста на имплантационния потенциал и качеството на изследваните ембриони. С изключение на доказаната значителна експресия на LIF в средата от страна на ембрионите, разликите в концентрациите между средата от 3-ти и средата от 5-ти ден не е статистически значима, както се онагледява от Таблица 17. и Фигура 24. ($p=0.2$). Към момента целта ни не е да интерпретираме това обстоятелство в един или друг аспект (потвърждаващ или отхвърлящ) на концепцията ни за предиктивен модел. Като цяло обаче, значителната концентрация на LIF в използваната култивираща среда е категорично потвърждение на ролята му за механизма на имплантация и е безспорен аргумент за правилният избор за включването му като потенциален маркер за имплантационен прозорец в изпробвания от нас модел.

Преминавайки към данните за третия кандидат-участник в концептуалния ни предиктивен модел – с интегрин $\alpha\beta 3$, правят впечатление няколко неща. На първо място резултатите ни установиха значително завишена експресия на $\alpha\beta 3$ в преиода на предполагаемия имплантационен прозорец спрямо стойностите на интегрин в тъканните проби от нерцептивната ендометриална фаза. Стойностите за $t=3.83$ и $p=0.001$ са статистически значими и ни позволяват да ги интерпретираме като достоверен показател за качествата на този димер като биомаркер за установяване рамката на имплантационния прозорец. Детекцията на $\alpha\beta 3$ -интегрин през различните етапи на менструалния цикъл не е необичайна, предвид публикуваните данни от предходни поручвания (Apparao et al., 2001; Borthwick et al., 2003;), както и данните за максималната му експресия по време на предполагаемия имплантационен прозорец.

Различни изследвания докладват данни за предполагаема връзка между различни патологични състояния на женския репродуктивен тракт, като

ендометриоза, синдром на поликистозните яйчници, наличие на хидросалпингс, както и неизяснен стерилитет с отклонения в експресията на $\alpha\beta3$ в ендометриума на такива пациентки (Ceydeli et al., 2006; Ricardo et al., 2006). Тази посока на интерпретация не представлява интерес за нас (поне към настоящия момент), поради което и приложихме възможността за съпоставка различните стойности на експресията на $\alpha\beta3$ само спрямо контролна група от фертилни и клинично здрави жени. В този смисъл, обвързването на завишената експресия на $\alpha\beta3$ с формирането и локализацията на пиноподните формации към момента на предполагаемия имплантационен прозорец (Hoozemans et al., 2004;) е в по-голяма степен ключов и приоритетен момент, отколкото асоциацията на определени патологични състояния към нетипичната динамика в количеството на $\alpha\beta3$, поне тясно погледнато спрямо темата на настоящото изследване.

Тенденцията в динамиката на $\alpha\beta3$ експресията, която установихме е в унисон с публикуваните данни от проучванията ни за динамиката и поведение на интегрините в хода на ендометриалния цикъл (Farrell et al., 2003; Lindhard et al., 2002).

Това валидира удачността на избора на $\alpha\beta3$ като потенциален маркер и прилагането му в бъдеща експериментална работа както по отношение на анализи от тъканни проби, така и при работата с култивираща ембрионална среда.

Както вече беше отбелязано, данните ни потвърждават значително завишена експресия на $\alpha\beta3$ в периода на предполагаемия имплантационен прозорец спрямо стойностите на интегрин в тъканните проби от нерецептивната ендометриална фаза.

Значителна и статистически значима е и разликата в експресията на $\alpha\beta3$ -интегрин в използваната ембрионална култивираща среда от ден 3-ти спрямо ден 5-ти. При $t=2.423$ и $p=0.045$, MEAN OD стойности за ден 3-ти =1.603 и MEAN OD стойности за ден 5-ти =2.252, налице е статистически значима разлика, която корелира с данните от предходни публикации за свойствата на трофобластните клетки на бластоцистите да експресират $\alpha\beta3$ (Anyfantaki et al., 2018).

6. ИЗВОДИ

Получените в настоящото изследване резултати, обсъждането им и направените анализи и обобщения дават основание за формулирането на следните изводи:

1. Установена е статистически значима, положителна динамика в експресията на LIF и $\alpha\upsilon\beta 3$ в ендометриалните проби, която корелира положително и с концентрацията на серумния прогестерон в съответните фази. Това обстоятелство удовлетворява критерия за приложението на тези молекули като маркер за идентификация на времевата рамка на имплантационния прозорец.
2. Акумулираните данни дават възможност за използването на LIF и $\alpha\upsilon\beta 3$ като биомаркери за рецептивната фаза и маркиране на имплантационния прозорец в процедури за асистирана репродукция и конкретно при определяне времето на ембриотрансферите в случаите на трансфер на криоконсервирани ембриони.
3. Предложеният алгоритъм е подходящ за приложение преди стартиране на процедура за ин витро оплождане при т.нар „спонатнен цикъл“, когато не се прилага контролирана овариална хиперстимулация и етапите, с изключение на екстракорпоралното оплождане, в най-голяма степен са подложени на естествените физиологични контролни механизми при съответната пациентка.
4. Използването на модела ни като инструмент за скрининг е удачен и подходящ при наличието на многократно неуспешни (≥ 4) процедури на вътрематочни инсеминации, където ще даде възможност да се потвърди или отхвърли евентуален дефект или изместване на времевата рамката на предполагаемия имплантационен прозорец.
5. Извън случаите на потвърждаване на очакваните резултати, получените данни могат да бъдат интерпретирани в контекста на наличие на други проблемни фактори: наличие на хидросалпингс, промени в морфологичните характеристики на ендометриума, хормонален дисбаланс и пр., което е достатъчна предпоставка и мотив за корекция или дори промяна в диагностично-терапевтичната схема
6. В научноизследователски аспект, данните ни потвърждават ролята на $\alpha\upsilon\beta 3$ и LIF в динамичния проц на ендометриална диференциация, както и като фактор/медиатор, присъстващ и от страна на ембриона в биохимичния и физиологичен диалог между майчиния организъм и ембрионалната тъкан.
7. Корелациите между серумните нива на прогестерон и динамиката в експресията на $\alpha\upsilon\beta 3$ и LIF предоставят възможност за елегантно и сравнително лесно и нескъпо оптимизиране на работата в хода на описаните процедури, като моделът позволява постоянно усъвършенстване в процеса на натрупване на нови данни и добавянето на други показатели, чиито функционален завършек би предоставил завишен процент на успешно реализираните бременности.
8. Установено е, че възрастта на жената не трябва да се разглежда като предпоставка за изместване или нарушаване на времевата рамка на имплантационния прозорец: 35% от участничките в контролната група са на възраст ≥ 38 години, а 30% от участничките са на възраст ≥ 40 години.

9. Демонстрирано е, че дебелината на ендометриалната лигавица в хода на месечния цикъл показва динамични промени, но не следва да се приема като достоверен и надежден маркер за имплантационния прозорец, а да се интерпретира само като ориентир, съпоставяем спрямо основните параметри, заложи в модела ни: $\alpha\beta 3$, LIF и серумен прогестерон.

7. ПРИНОСИ

В резултат на нашето проучване могат да се посочат следните приноси със специфичен и комплексен характер, групирани както следва:

7.1. Приноси с оригинален характер:

1. Проведеното изследване дава възможност за първи път у нас да се моделира обобщен методологичен алгоритъм за определяне на имплантационния прозорец, съпоставящ/корелиращ данните за серумен прогестерон и динамиката на LIF - и $\alpha\beta 3$ експресията в ендометриални биопсии.
2. За първи път се прилага ELISA метод за анализ на LIF и $\alpha\beta 3$ в тъканни проби от ендометриални биопсии (според публикуваните данни, досегашните техники за анализ използват имунохистохимични методи и анализ на информационни РНК-и)
3. За първи път се установи наличието на $\alpha\beta 3$ в използвана култивираща среда и се съпоставиха наличните количества на интегрин в различните етапи от развитие на ембриона, потвърждавайки прогресиращата експресия на $\alpha\beta 3$ спрямо 3-ти и 5-ти ден от развитие на ембрионите.

7.2. Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърден е динамичния характер на експресия на LIF и $\alpha\beta 3$ в хода на ендометриалния цикъл и в този смисъл потенциала им като биомаркери за идентифициране времевата рамка на имплантационния прозорец
2. Потвърдена е динамичната експресия на LIF и $\alpha\beta 3$ от страна на делящите се ембриони, с ясно изразена динамика в експресията на $\alpha\beta 3$.

7.3. Научно-приложни приноси:

Създаденият модел и анализът на получените резултати извежда няколко фактора с потенциал да бъдат използвани в клиничната практика самостоятелно или в комбинация, с цел потвърждаване или отхвърляне на времевата рамка на предполагаемия имплантационен прозорец.

Изследваните показатели и връзките между тях, дават възможност да се обвържат хормоналния статус, биохимичните и морфологични показатели на ендометриалната тъкан в един прецизен метод за оценка, чието приложение да има два директни резултата с безспорен положителен ефект.

1. Това би рефлектирало директно в повишен процент успешни ембриоимплантации след извършен трансфер при процедури по асистирана репродукция.
2. В случаите, когато резултатите от тестовете не корелират с очакваните стойности, е налице диагностично-скрийнинг ефект, анонсиращ за наличие на проблем и би следвало да се интерпретира като индикация за необходимост от прецизиране и/или коригиране на диагностично-терапевтичния процес.
3. Оптимизиране на съотношението между разходи и успеваемост при прилагането на процедури по асистирана репродукция. Прилагането на модела в клиничната практика ще предотврати извършването на комплексни процедури или само ембриотрансфери, в случаите с идентифициран или суспектен проблем при имлантационния прозорец, което ще има директен положителен ефект при изразходването на финансов, емоционален и технологичен ресурс, чиито ефект и резултат иначе биха били нулеви.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Матеев Б., Бацалова Ц., Джамбазов Б. 2018. *Корелация между динамиката на серумния прогестерон и експресията на $\alpha V\beta 3$ -интегрин и LIF в ендометриалната тъкан. Потенциален предиктивен модел за рецептивност на ендометриума и маркиране на имплантационен прозорец.* Репродуктивно Здраве, 28:20-24. ISSN-1312-6180
2. Матеев Б., Бацалова Ц., Джамбазов Б. 2018. *Оценка на биомаркерите за приложение при определяне времето на имплантация.* Научни трудове на СУБ-Пловдив, серия Г, Медицина, фармация и дентална медицина, том XXIII, Пловдив 2019 ISSN 1311-9427(Print). ISSN-2534-9392 (Online)
3. Матеев Б., Бацалова Ц., Джамбазов Б. 2019. *Comparisson of the LIF a $\alpha V\beta 3$ -integrin levels in culture media from embryos with successful implantation and culture media from 3PN-embryos.* Ембриология, 9(1): in press, ISSN 1312-7349

Участия в конгреси и научни форуми:

4. Mateev B. 2018. Correlation between the serum progesterone dynamics and the expression of $\alpha V\beta 3$ -integrin and LIF in the endometrial tissue. A potential predictive model for endometrial receptivity and determination of the window of implantation. Fifth International Congress of Immunology, 25-28 October 2018, Plovdiv, Bulgaria.

Благодарности

Изказвам огромна благодарност на научния ми ръководител проф.д-р Балик Джамбазов за съдействието, дългогодишната помощ и осигурените възможности за осъществяване на настоящата работа и разбира се за търпението , спокойствието и толерантността с които ме приведе през тези четири години!

Благодаря и на сестра ми д-р Мария Матеева, без чиято помощ и съдействие не бих могъл да реализирам изледванията по дисертацията!