



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“



БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ“

---



## АВТОРЕФЕРАТ

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

**„Оценка на ендометриалната възприемчивост чрез  
профилиране на генетични и хормонални маркери“**

ОТ

МАРИЯ НИКОЛОВА НИКОЛОВА-МИЛОВА

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика  
Професионално направление: 4.3 Биологически науки  
Докторска програма: Молекулярна биология

Научни ръководители:  
проф. д-р Галина Тенева Яхубян  
гл.ас. д-р Младен Маринов Найденов

Пловдив, 2024

Дисертационният труд съдържа 133 страници, 9 таблици, 24 фигури, 5 схеми и 333 литературни източника.

Докторантът има публикувани общо 3 статии по темата на дисертационния труд, две от които са публикувани в списания с импакт фактор и една в списание без импакт фактор.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, проведен на 08.02.2024 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 28.05.2024 от ..... часа в Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

**Автор:** Мария Николова Николова-Милова

**Заглавие:** Оценка на ендометриалната възприемчивост чрез профилиране на генетични и хормонални маркери

*Пловдив, 2024 г.*

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Една от ключовите функции на ендометриума е да имплантира и изхранва ембриона, за да осигури бременност. Парадоксално е, че ендометриумът не може да възприеме (имплантира) ембриона през по-голямата част от менструалния цикъл, с изключение на тесен времеви прозорец, наречен „Имплантационен прозорец“ (Window of Implantation, WOI). Успешното имплантиране на ембриона зависи от синхронизирането на жизнеспособен ембрион и **рецептивен (възприемчив) ендометриум**.

Всъщност, недостатъчната възприемчивост на матката е оценена като причина за две трети от неуспешните имплантации, докато самият ембрион носи отговорност за една трета от тях (Macklon et al., 2006; Cha et al., 2013). При пациентите с повтаряща се неуспешна имплантация (recurrent implantation failure, RIF) е описано времево изместване на имплантационен прозорец при една от четири пациентки (Ruiz-Alonso et al., 2013). Понякога RIF се дължи не само на асинхронен (изместен) имплантационен прозорец, но също така и на патологичен (нарушен) имплантационен прозорец (Sebastian-Leon et al., 2018). Също така, нарушената децидуализация на ендометриалните стромални клетки, които влияят на имплантацията, може да попречи на ендометриалния контрол на качеството на ембриона и да причини ранно прекъсване на бременността (Teklenburg et al., 2010).

Поради това е оправдано по-доброто разбиране на възприемчивостта на ендометриума и значението на механизмите, участващи във функциите на средно-секреторния ендометриум.

Широко-мащабните проучвания върху експресионните профили на протеин-кодиращите гени са довели до идентифицирането на гени, чиято експресия се променя при прехода на човешкия ендометриум от предрецептивно към рецептивно състояние (Ruiz-Alonso et al., 2012; Enciso et al., 2018). Тези изследвания са дават по-задълбоченото познаване на молекулните процеси, в основата на фазовите транзиции в маточната лигавица, както и до създаването на генетични тестове за оценка на рецептивността на ендометриума като ERA теста (Endometrial Receptivity Array), ER Map теста и др.

Наред с протеин-кодиращите транскрипти, микроРНК са важен компонент на транскриптома., като регулират експресията на редица гени. До момента са открити над 2000 микроРНК при хората и се смята, че те колективно регулират една трета от гените в генома. Въпреки, че координираната генна експресия в рецептивния ендометриум е от

съществено значение за успешното имплантиране, промените в експресионните профили на микроРНК и техните изоформи (изомиР), съпровождащи фазовите преходи на маточната лигавица, все още не са проучени в детайли. Експресионните профили на микроРНК в ендометриални биопсии са сравнявани между ранно-секреторна фаза (лутеинизиращ хормон, LH + 2) и средно-секреторна фаза (LH + 7/8) (*Sha et al., 2011; Altmae et al., 2013; Altmae et al., 2017*); както и между пролиферативна фаза (CD 6-12) и секреторна фаза (CD 19-24 или LH + 7/8) (*Kresowik et al., 2014; Kuokkanen et al., 2010; Sigurgeirsson et al., 2017*). Доколкото ни е известно, до момента няма изследвания върху експресията на микроРНК и техните изоформи през основните фази на ендометриалния цикъл – пролиферативна, ранно-секреторна, средно-секреторна и късно-секреторна в рамките на един и същ ендометриален цикъл.

## **II. ЦЕЛ и ЗАДАЧИ**

*Целта* на настоящия дисертационен труд е да се проучи ролята на микроРНК молекулите и техните изоформи в установяването на ендометриалната рецептивност при здрави, фертилни жени чрез сравнителен анализ на динамиката на експресионните им профили в хода на цикъла и интегрирането им с транскриптомни данни, хистологични и биохимични показатели.

За постигане на целта бяха поставени следните *задачи*:

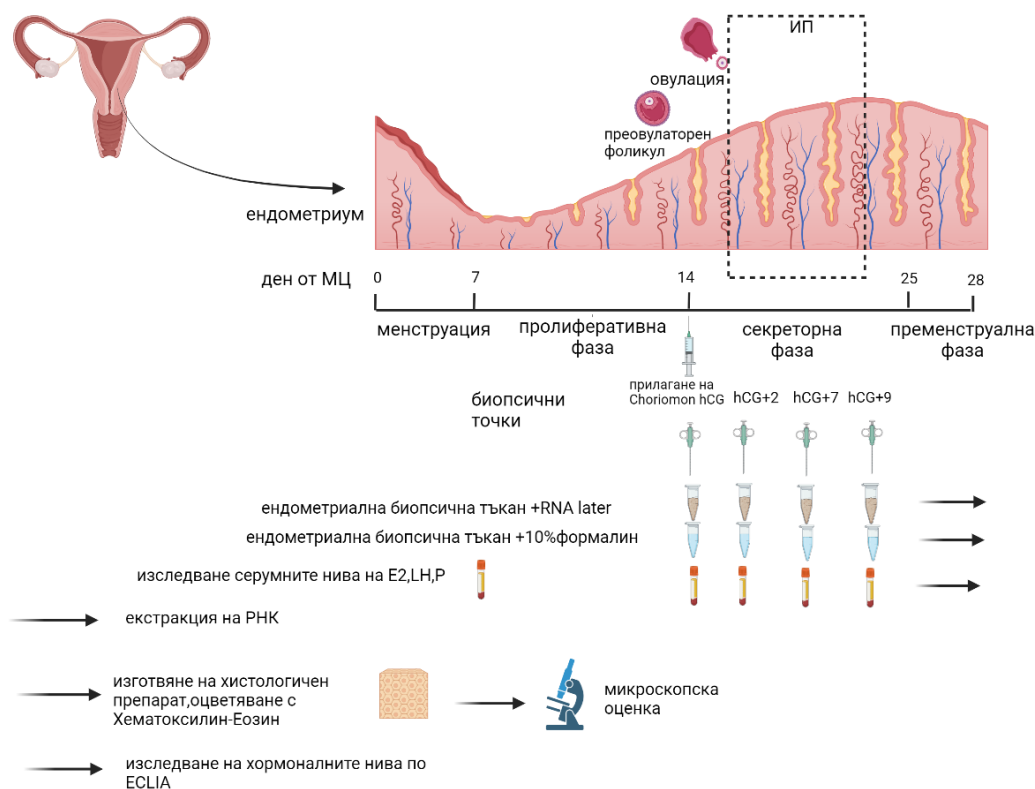
1. Набиране на доброволци и проби за целите на изследването:
  - 1.1. Набиране на доброволни участници в изследването – здрави, фертилни жени.  
Попълване на Пациентска карта и Декларация за информирано съгласие;
  - 1.2. Датиране на фазите на ендометриалния цикъл – пролиферативна фаза (ПФ), ранно-секреторна фаза (РСФ), средно-секреторна фаза с две времеви точки (ССФ1 и ССФ2) чрез прилагане на човешки Хорион гонадотропин (hCG) и събиране на ендометриални биопсични и кръвни проби;
  - 1.3. Хистологичен и биохимичен анализ.
2. Изолиране на РНК от ендометриалните биопсични проби, събрани през фазите на ендометриалния цикъл, качествена и количествена оценка;
3. Широко-машабно секвениране на малки РНК и биоинформатичен анализ на данните за идентифициране на диференциално експресирани микроРНК и изоформи през четирите фази на ендометриалния цикъл:
  - 3.1. Секвениране на малки РНК (small RNA-seq)
  - 3.2. Биоинформатичен анализ

- идентифициране на микроРНК и изоформи, експресирани в анализирани ендометриални проби;
  - сравнителен експресионен анализ на микроРНК и изоформите в РСФ, ССФ1 и ССФ2 спрямо ПФ.
4. Широко-машабно секвениране на РНК и биоинформатичен анализ на данните за идентифициране на диференциално експресирани транскрипти през четирите фази на ендометриалния цикъл:
- 4.1. Секвениране на РНК (RNA-seq)
- 4.2. Биоинформатичен анализ
- идентифициране на протеин-кодиращи транскрипти, експресирани в анализирани ендометриални проби;
  - сравнителен експресионен анализ на транскриптите в РСФ, ССФ1 и ССФ2 спрямо ПФ.
5. Интегриран анализ (регулаторни мрежи) на диференциално-експресирани транскрипти, микроРНК и изоформи в хода на ендометриалния цикъл за:
- Прогнозиране на прицелни гени за диференциално-експресирани микроРНК и изоформи;
  - Прогнозиране на транскрипционни фактори за диференциално-експресирани микроРНК и изоформи.
6. Валидиране на микроРНК и изоформи с помощта на RT-qPCR в изследваните фази на ендометриалния цикъл.

## III. МАТЕРИАЛИ и МЕТОДИ

Материалите и методите, използвани в изследването, могат условно да бъдат групирани като клинични и молекулярно-биологични.

### 1. Клинична част



#### 1.1. Гинекологична оценка, проследяване и пробовзимане

##### 1.1.1. Пациенти – подбор и набиране

Протоколът на изследването е одобрен с Удостоверение за одобрение №3/02.09.2019 г. на Комисията по етика на научните изследвания на Биологически факултет, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, Пловдив, България. За всяка жена е оформена Карта История на изследването. Всеки участник подписва информирано съгласие.

Първоначалната група включва 20 здрави фертилни жени. Изработени са критерии за включване в проучването, а именно: възраст 20-40 години, редовна менструация с диапазон от 21-28 дни между циклите и индекс на телесна маса (ИТМ) между 19-29 kg/m<sup>2</sup>. Нито една от тях няма диагностицирани преди старта на проучването придружаващи заболявания, не е пушач, не пие алкохол, не приема лекарства и всички са на здравословен хранителен режим, не е била фебрилна през целия период, докато трае взимането на пробите и в последващия пробовземащия месец. Не са отчетени усложнения от процедурата при нито една от тях. На всички са проведени

два контролни прегледа 14 и 30 дни след последното пробовземане. Всички те имат анамнеза за нормална бременност и поне едно родено здраво дете.

### **1.1. 2. Сонографската фоликулометрия и проверката на дебелината на ендометриума**

Ехографската оценка (Fukuda Denshi Full Digital Ultrasound System UF-870AG, Токио, Япония) на стартовия гинекологичен статус, с измерване на водещ фоликул и ендометриум бе направена на 7-ия ден, броено от първия ден на менструалното кървене, с паралелно изследване на хормоните-прогестерон, естрадиол и LH (ECLIA) (*Burrows 1945*). За всяка пациентка бе изготвен индивидуален план на проследяване в следващите дни. Нивата на серумния естрадиол (E2) и лутеинизиращ хормон (LH) се измерват, при фоликул с размери 17 mm и след това ежедневно се проследява сонографски фоликула и нивата на естрадиол и LH. Choriomon 5000 UI (IBSA Farmaceutical Italia S.r.l, Italia) се прилага за индукция на овулацията, за да се направи овулацията предсказуема и датирането на рецептивната фаза по-точно (очаквана овулация - 36-48 часа след s.c. апликация). Прилаган е подкожно при следните условия: фоликул, с размери от поне 18 mm, ендометриум най-малко 6,5 mm, E2 не по-малко от 130 pmol/l и LH под 13 IU/l. Десет от жените са изключени от проучването поради непокриване на критериите.

### **1.1. 3. Ендометриална биопсия**

Ендометриалните биопсии на всяка отделна жена е проведена амбулаторно и без анестезия с Probeta (*Will et al., 2023*). Биопсиите са взети от едни и същи жени в рамките на един менструален цикъл в четири времеви точки, съответстващи на пролиферативната фаза и на 2, 7 и 9 дни след прилагане на hCG. Четиридесет проби, събрани от десет пациенти от всяка времева точка, бяха класифицирани в четири групи:

- група ПФ (Пролиферативна фаза),
- група hCG+2 (Пре-рецептивна фаза или ранна секреторна фаза),
- група hCG+7 (Рецептивна фаза или средна секреторна фаза),
- група hCG+9 (Рецептивна фаза или средна секреторна фаза).

Непосредствено след взимане на биопсиите към биопсичния материал бе добавян RNA later (Thermo Fisher Scientific) и бяха съхранявани при - 80°C до употреба. Едновременно част от биопсичният материал бе поставян в 10% разтвор на формалин за по-нататъшно хистологично изследване.

### **1.2. Хистологично изследване**

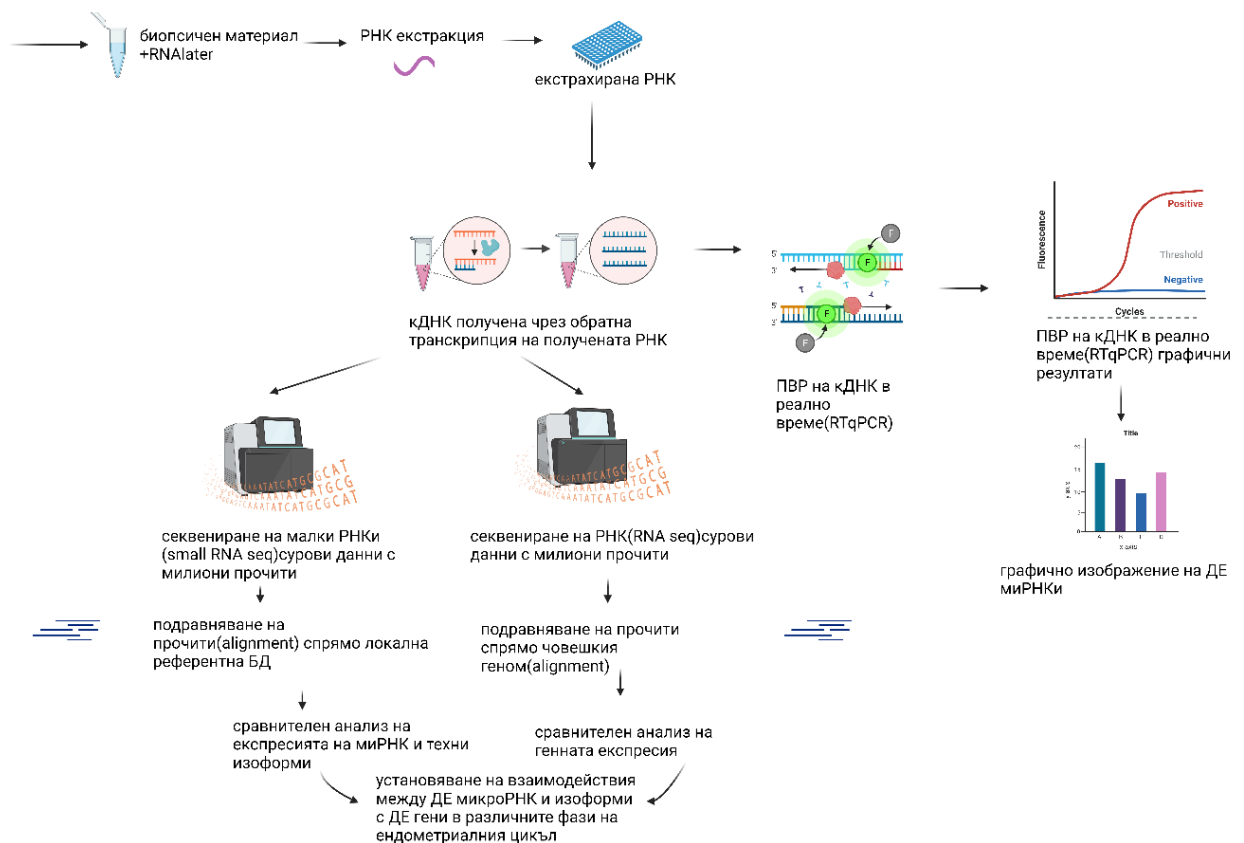
Биопсичният материал за хистологично изследване бе обработен по стандартен протокол с парафинови блокчета и последващо оцветяване с Хематоксилин – Еозин.

Морфологичната оценка на хистологичните препарати е изготвена по критериите на Нойес (Noyes 1950).

### 1.3. Биохимичен анализ - определяне на нивата на репродуктивните хормони в различните фази на ендометриалния цикъл

Репродуктивните хормони бяха определяни чрез имунохимичен анализ с електрохемилюминисценция (electrochemiluminescent immunoassay, ECLIA, Roche Diagnostics) (Gruber et al., 2007). Изследване нивата на репродуктивните хормони по метода ECLIA бяха извършени от външна лаборатория.

## 2. Молекулярно-биологична част



### 2.1. Изолиране на РНК, качествена и количествена оценка

Изолирането на тотална РНК е осъществено с кит NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel), в комбинация с фенолен реагент Qiazol (QIAGEN).



Концентрацията и качеството (IQ – integrity and quality) на РНК е определяно флуорометрично с флуорометър Qubit 4. Качествена оценка на РНК е направена и с помощта на електрофоретично разделяне в 1% агарозен гел.

## 2.2. Секвениране на малки РНК (small RNA-seq)

Секвенирането на малки РНК с дълбочина 3М прочити на 24 проби РНК (ПФ, hCG+2, hCG+7 и hCG+9) е извършено в National Genomics Infrastructure, SciLifeLab, Швеция, с любезното съдействие на партниращия в проекта колега – проф. Андрес Салумец, Университет на Тарту, Естония, съгласно публикувания протокол (*Faridani et al., 2016*).

## 2.3. Секвениране на РНК (RNA-seq)

Извършено е в лабораторията на проф. Андрес Салумец, Университет на Тарту, Естония, съгласно TAC-seq протокола (*Teder et al., 2018*).

## 2.4. Биоинформатичен анализ на данните от секвениране

Биоинформатичният анализ на данните от масовото паралелно секвениране (секвениране на малки РНК и секвениране на РНК) са извършени под ръководството на проф. Веселин Баев с инструменти на платформата за биоинформатичен анализ Galaxy (<https://galaxyproject.org>), която е инсталирана на специализиран сървър на ПУ “Паисий Хилендарски”, Биологически факултет, катедра “Физиология на растенията и молекулярна биология”. Проверката на качеството на прочитите и изрязването на адапторните секвенции (FASTQ файлове) са извършени с помощта на софтуерите FastQC и TrimGalore на платформата Galaxy (*Afgan et al., 2018*). За идентифициране и класифициране на микроРНК и техните изоформи е използван разработения от биоинформатична група на катедра “Молекулярна биология” софтуер miRGalaxy, който е базиран в Galaxy (*Glogovitis et al., 2021*)

За анализ на диференциалната експресия, матриците за преброяване на микроРНК и изоформите във всяка проба бяха подавани към пакета DESeq2 (v2.11.40.6), включен в работния поток miRGalaxy (*Guo et al., 2016*). Диференциално експресираниите микроРНК и изоформи с  $p < 0.05$  и  $|\log_2FC| \geq 1$  бяха използвани за по-нататъшен анализ.

За идентифициране на гени, чистите прочити от секвенирането на РНК бяха приведени в съответствие с GRCh38/hg38 човешки референтен геном от HISAT2 (*Kim et al., 2019*). Матриците за преброяване бяха създадени от инструмента featureCounts в съответствие с анотацията на генома и предоставени на пакета DESeq2, а диференциално експресирани гени (DEGs) с  $p < 0.05$  и  $|\log_2FC| \geq 1$  бяха използвани за нататъшен анализ.

## 2.5. Експресионен анализ на микроРНК – Обратна транскрипция и Полимеразна верижна реакция (ПВР) в реално време

Експресионният анализ на микроРНК (и изоформите им) е извършен с метода – Stem-loop (SL) RT-qPCR, при който се използва обратен праймер с вторична структура стъбло-бримка (*Chen et al., 2005*). Обратната транскрипция (RT) е извършена с кит на RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). RT-qPCR е извършена с TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems).

За целите на SL RT-qPCR и е направен дизайн на праймери (конвенционални праймери и SL) и сонди (с багрило: FAM-MGBNFQ), специфични за изследваните микроРНК и изоформи (miR-449a, miR-449a-5p, miR-449c.1), и за ендегенната контрола RNU48 (Таблица 2).

Експресионните нива на транскриптите са нормализирани спрямо нивата на експресия на конститутивно експедиращата се вътрешна контрола (U48 РНК). Относителното ниво на транскриптите (RQ) е изчислявано спрямо контролна проба (Пролиферативна фаза), прилагайки уравнението:

$$\text{Относително количество} = \frac{2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{микроРНК в секреторна фаза}} - \Delta\text{Ct}_{\text{микроРНК в пролиферативна фаза}})}{2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{U48 в секреторна фаза}} - \Delta\text{Ct}_{\text{U48 в пролиферативна фаза}})}}$$

$\Delta\text{Ct}$  – Средно аритметичната стойност на Ct стойностите от трите технически повторения за всеки ген и за всяка проба. За всяка RT-qPCR реакция бяха извършени три технически повторения.

## 2.6. Прогнозиране на взаимодействията на микроРНК (и изоформите им) с прицелни транскрипти и транскрипционни фактори

Прицелните гени на микроРНК и изоформите бяха предсказани с помощта на базата данни miRDB (<http://mirdb.org>) (*Wong et al., 2015*). В нашия анализ са взети под внимание прицелни транскрипти с прогнозен резултат  $\geq 80$ . Регулаторните връзки между микроРНК (и изоформите им) с транскрипционни фактори (ТФ) бяха идентифицирани от базата данни TransmiR v2.0 (<http://www.cuilab.cn/transmir>).

## 2.7. Генна онтология

Анализът на обогатяване на генната онтология (GO) беше извършен с помощта на g:Profiler (версия e104\_eg51\_p15\_3922dba).

## **IV. РЕЗУЛТАТИ**

### **1. Набиране на доброволците и проби за целите на изследването**

#### **1.1 Набиране на доброволни участници**

Набирането на доброволците за проучването се оказа нелека задача, поради необходимостта освен изразено желание за участие в изследването, те да отговарят на редица, предварително зададени критерии и да проявят постоянство и да останат в проучването до края. Задължително условие за включване в проучването бе да имат поне едно здраво, живородено дете, постигнато при условията на нормално-протекла бременност и да нямат придружаващи заболявания. Всеки участник подписа информирано съгласие, преди старта на процедурите. По редица различни причини част от пациентките, първоначално включени в проучването, не продължиха участие. След провеждане на хистологичното изследване, което предхождаше екстракцията на РНК, бе установено, че в част от биопсичният материал липсва ендометриум, а е представен по-скоро от съединително тъканни елементи, фибрин и кръв. Това наложи изключването на тези пациенти също. Така се оформи кохорта от 6 жени, които отговарят на всички критерии. Една жена, която не отговаря на критерия – възраст, но отговаря на всички други, бе включена в част от проучването, с цел възрастова съпоставка. Проведени бяха ехографски измервания на доминантен фоликул и ендометриум

#### **1.2. Датиране на фазите на ендометриалния цикъл**

Ендометриалните биопсии бяха взети от едни и същи жени в рамките на един менструален цикъл в четири времеви точки, съответстващи на пролиферативната фаза и на 2, 7 и 9 дни след прилагане на hCG. Двадесет и четири проби, събрани от шест пациенти бяха класифицирани в четири групи : ПФ (Пролиферативна фаза), hCG+2 (Пре-рецептивна фаза или ранно-секреторна фаза, РСФ), hCG+7 (Рецептивна фаза или средно-секреторна фаза ССФ1), hCG+9 (Рецептивна фаза или средно-секреторна фаза ССФ2). Непосредствено след взимане на биопсиите към биопсичния материал бе добавян RNA later (Thermo Fisher Scientific), бяха съхранявани при – 80°C до употреба. Едновременно част от биопсичният материал бе поставян в 10% разтвор на формалин за по-нататъшно хистологично изследване.

#### **1.3. Хистологично изследване**

Биопсичният материал от всички шест пациентки имаше подобни хистологични характеристики в съответните фази на ендометриалния цикъл, като отговаряваше на

предварително зададените критерии, изготвени по критериите на Нойес (Noyes et al., 1950). Направен бе паралел между жена в репродуктивна възраст и перименопаузална жена, като се отчетоха промени в ендометриума тип късна секреторна фаза в точка hCG+9 при 49-годишната.

#### **1.4. Изследване на репродуктивните хормони**

Репродуктивните хормони бяха определяни чрез имунохимичен анализ с електрохемилюминисценция (ECLIA). За всяка ендометриална биопсична проба бяха проверявани нивата на LH, E2 и Прогестерон. Анализът на данните показва, че преовулаторни фоликули с приблизително еднакви размери, оценени ехографски и при LH под 13 UI/L, се асоциират с различни стойности на E2. Приетите нива за E2 не бяха постигнати при една от пациентите (П3), поради възрастови особености. За всички случаи след LH-пика се наблюдава тенденция за понижаване на E2 и покачване на прогестерона в hCG+7 и hCG+9 на ендометриалния цикъл, съответстващи на имплантационния прозорец. Не бяха отчетени други неизвестни досега зависимости между хормоналните нива и другите компоненти (проведени изследвания) по темата на този научен труд.

#### **2.Изолиране на РНК от ендометриалните биопсични проби, събрани през фазите на ендометриалния цикъл, качествена и количествена оценка**

Тотална РНК бе изолирана от 24 ендометриални биопсии съгласно протокола на NucleoSpin miRNA. Приблизително 50 mg тъкан бе използвана за екстракция на РНК. За всяка ендометриална биопсична проба бе извършено изолиране и пречистване на РНК и бе направена качествена и количествена оценка на РНК с помощта на флуорометър Qubit4. При 24 от пробите измерените RNA IQ стойности на РНК пробите бяха в диапазона 7.8 - 9.8, което показва високо качество на РНК, без деградация, и отговаря на изискванията на протоколите за секвениране на РНК от ново поколение (*таблица 1*). Те бяха използвани за последващите анализи.

Пациент	ПФ		hCG+2		hCG+7		hCG+9	
	Conc ng/uL	IQ	Conc ng/uL	IQ	Conc ng/uL	IQ	Conc ng/uL	IQ
1	490.9	9.7	302.6	8.8	158.3	8.8	87.4	9.5
2	220.3	9.4	197.1	8.2	305.2	8.5	577.2	9.6
3	560.1	9.2	423.9	9.1	189.5	9.1	657.3	9.2
4	146.8	8.5	329.6	9.3	265.8	8.7	764.9	9.8
5	163.2	8.6	256.7	8.5	346.2	8.2	153.8	8.1
6	120.2	7.8	276,2	7.9	198,4	7.9	123.0	8.3

Таблица 1. Качествена и количествена оценка на РНК, изолирана от участниците в изследването през четирите фази на ендометриалния цикъл (флуорометър Qubit4).

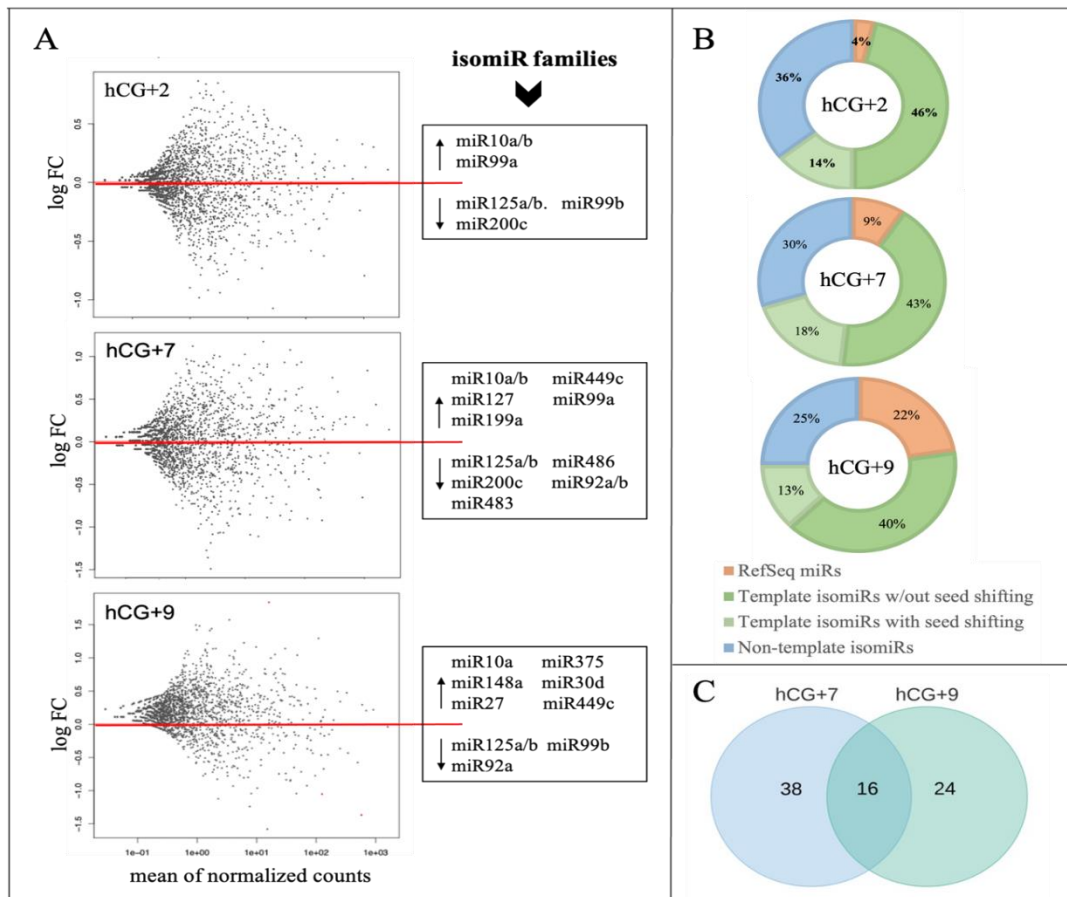
Пробите бяха подложени и на електрофоретичен анализ.

### 3. Идентифициране на диференциално експресирани микроРНК и изоформи през четирите фази на ендометриалния цикъл (широко-машабно секвениране на малки РНК и биоинформатичен анализ на данните)

Секвенирането на малките РНК молекули (small RNA-seq) продуцира сурови данни във формат FASTQ. Първоначално при биоинформатичния анализ бяха отстранени адапторните секвенции. Бяха филтрирани прочитите с ниско качество както и тези с дължина под 15 нт или над 35 нт. Прочити с високо качество бяха подложени на по-нататъшен анализ (вж."Материали и методи"). Разпределението на малките РНК молекули в пробите според тяхната дължина показва връх при дължина от 22 нт, който съответства на очакваната дължина на микроРНК молекулите, както и на техните изоформи.

Гените, кодиращи микроРНК (MIR гени) могат да генерират освен референтната микроРНК, множество изоформи (изомиР) с подобни секвенции (Nielsen et al 2012). Изоформите биват - шаблонни, изместени спрямо каноничната микроРНК в единия или/и в двата края, съобразно данни от RefSeq miR (5-изоформи, 3- изоформи, и 5'3'-изоформи), и нешаблонни ,с добавени в 3' нешаблонни нуклеотиди.С цел ДЕ анализ, матриците за броене на секвенциите за всяка микроРНК или изоформа във всяка библиотека (съотв. проба) са подавани към пакета DESeq2 (Burroughs et al., 2010), част от работния поток на miRGalaxy. Броят прочити за всяка секвенция е нормализиран спрямо общия брой прочити на съответната библиотека. Промяната в генната експресия се оценява като се сравняват нормализирания брой прочити на всяка секвенция в групите hCG+2, hCG+7 и hCG+9 с тези на пролиферативна фаза. Промяната в нивата на генната експресия е изразена с log2FC (фигура 1А) Диференциално експресирани

микроРНК и изоформи с ниво на статистическа значимост  $p \leq 0,05$  са използвани за последващ анализ. Установени бяха 15 микроРНК и 71 изоформи (фигура 1B) От 78 ДЕ микроРНК и шаблонни изоформи, само 16 се припокриват между hCG+7 и hCG+9 (фигура 1C).



Фигура 1. Динамика на микроРНК и техните изоформи по време на фазовите преходи на ендометриалния цикъл. А) Относителна експресия на микроРНК и техните изоформи - трите времеви точки на hCG+2, hCG+7 и hCG+9 се сравняват с пролиферативната фаза; В) процентно разпределение на микроРНК и техните изоформи; С) ДЕ микроРНК и шаблонни изоформи - специфичен за hCG+7 или hCG+9 или припокриващи се между hCG+7 и hCG+9.

По-значими промени в абсолютните стойности на  $\log_2FC$  се откриват при hCG+9 в сравнение с hCG+7 (таблица 2)

Таблица 2. Промени в експресията на микроРНК и изоформи във времеви точки hCG+7 и hCG+9 (при сравнения с ПФ). Представени са само тези с  $|\log_2(FC)| \geq 1$ .

микроРНК/изоформа	log <sub>2</sub> (FC)	P-value
<b>hCG+7</b>		
hsa-miR-449c-5p_chr5(-)_+1_0	1,17	0,0209
hsa-miR-877-5p_chr6(+)_0_+2	1,12	0,0216
hsa-miR-10b-5p_chr2(+)_0_+1	1,08	0,0009
hsa-miR-574-3p_chr4(+)	1,03	0,0222
hsa-miR-10b-3p_chr2(+)	1,02	0,0446
hsa-miR-127-3p_0_+2_AT	1,00	0,0417
hsa-miR-483-3p_chr11(-)_0_+1	-1,02	0,0389
hsa-miR-27a-3p_MI0000085_chr19(-)_0_-1_0_+3_AAA	-1,06	0,0335
hsa-miR-221-5p_chrX(-)_0_+4	-1,07	0,0265
hsa-miR-200c-3p_chr12(+)_0_-3	-1,07	0,0363
hsa-miR-99a-5p_MI0000101_chr21(+)_0_-2_0_+1_A	-1,09	0,0316
hsa-miR-125a-5p_MI0000469_chr19(+)_0_-2_0_+1_A	-1,09	0,0107
hsa-miR-125b-5p_0_+2_AA	-1,11	0,0011
hsa-miR-92a-3p_MI0000094_chrX(-)_0_-1_0_+3_AAA	-1,19	0,0200
hsa-miR-92a-3p_MI0000094_chrX(-)_0_-1_0_+3_AAT	-1,27	0,0126
hsa-miR-486-5p_MI0002470_chr8(-)_0_-1_0_+1_A	-1,36	0,0078
hsa-miR-483-3p_chr11(-)_+1_+2	-1,49	0,0034
<b>hCG+9</b>		
hsa-miR-449c-5p_chr5(-)_+1_0	1,50	0,0034
hsa-miR-375-3p_0_+1_A	1,44	0,0197
hsa-miR-449c-5p_chr5(-)_0_-2	1,42	0,0175
hsa-miR-23a-3p_chr19(-)_0_-1	1,41	0,0236
hsa-miR-30d-5p_chr8(-)_0_+2	1,29	0,0006
hsa-miR-200b-3p_MI0000342_chr1(+)_+1_+1_0_+1_T	1,23	0,0165
hsa-miR-125a-5p_MI0000469_chr19(+)_0_-3_0_+1_A	-1,04	0,0304
hsa-miR-125b-5p_chr11(-)_chr21(+)_0_-2	-1,04	0,0021
hsa-miR-125b-5p_0_+1_A	-1,05	0,0000
hsa-miR-125a-5p_MI0000469_chr19(+)_0_-2_0_+1_A	-1,24	0,0172
hsa-miR-125a-5p_chr19(+)_0_-2	-1,37	0,0000
hsa-miR-125a-5p_chr19(+)_+1_-2	-1,58	0,0002

Множество ДЕ изоформи са от типа 5'- или 5'3'-изоформи, при които е налице изместване на 5'-края спрямо референтната микроРНК. При тези изоформи регионът от 2-ри до 7-ми нт, който контактува с прицелната иРНК, е променен спрямо референтната микроРНК. Предполагаме, че вероятните прицелни гени, контролирани от 5'- и 5'3'-изоформите, се различават от тези на референтната микроРНК и нейните 3'-изоформи

На *схема 1* са представени 5'-изоформите на miR-449c, които са сред най-силно променените във фазовия преход от пререцептивна към рецептивна фаза на ендометриалния цикъл.

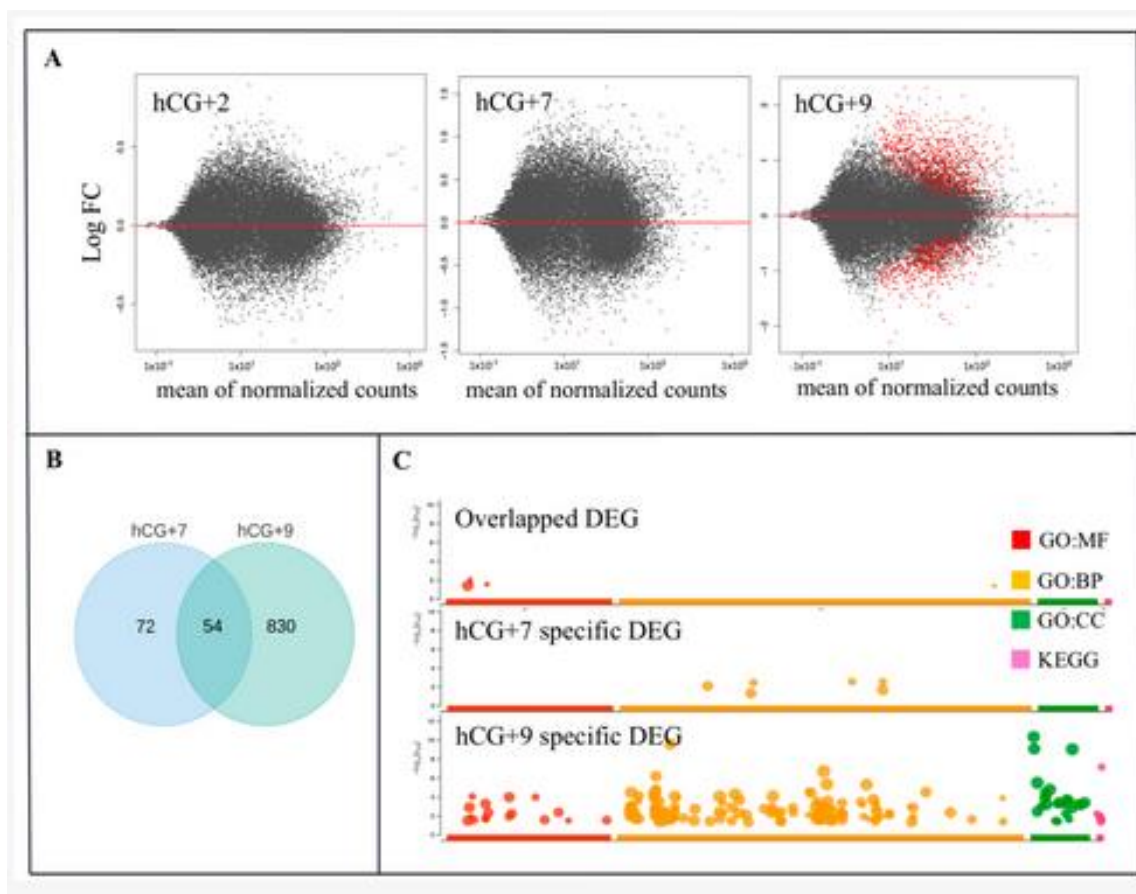
<b>miR-449c-5p</b>	UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGU-
miR-449c-5p_t_0_+1	UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGUU
miR-449c-5p_t_0_-1	UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUG--
miR-449c-5p_nont_0_+1_A	UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGUA
miR-449c-5p_t_+1_+1	-AGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGUU
miR-449c-5p_t_+1_-1	-AGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUG--
miR-449c-5p_t_+1_0	-AGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGU-
miR-449c-5p_t_+1_0_nont_0_+1_A	-AGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGUA
miR-449c-5p_t_+1_0_nont_0_+1_C	-AGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGUC

*Схема 1.* Секвенции на най-променените 5'-изоформи на miR-449c при прехода от пре-рецептивна към рецептивна фаза на ендометриалния цикъл. В син цвят са отбелязани контактните региони (seed region) на референтната микроРНК и нейните изоформи.

#### 4. Идентифициране на диференциално експресирани гени през четирите фази на ендометриалния цикъл (широко-мощно секвениране на РНК и биоинформатичен анализ на данните) и генно-онтологичен анализ.

Секвенирането на РНК молекули (RNA-seq) продуцира сурови данни във формат FASTQ. В началото бяха отстранени адапторните секвенции от всеки прочит, след което тези с ниско качество бяха филтрирани, а прочитите с високо качество бяха подложени на по-нататъшен анализ, както е описано в раздела "Материали и методи". ДЕ гени с  $p < 0.05$  и  $|\log_2FC| \geq 1$  бяха използвани за по-нататъшен анализ. Нивата на ДЕ гени на всяка група бяха сравнени с тези от пролиферативна фаза. Най-значими промени бяха установени в hCG+9 съпоставени с тези в hCG+2 и hCG+7 (*фиура 2A*) Идентифицирахме 127 и 883 ДЕ гени в hCG+7 и hCG+9. От всички ДЕ гени, които открихме в точка hCG+9, 614 бяха с повишена експресия и 269 бяха с понижена експресия. Установихме 54 припокриващи се ДЕ гени между двете времеви точки (*фигура 2B*)





Фигура 2. Динамика на ДЕ гени по време на фазовите преходи на ендометриалния цикъл. (А) Сравнение между генната експресия за трите точки hCG+2, hCG+7 и hCG+9 и тази в пролиферативна фаза; (В) ДЕГ, специфични за съответно hCG+7 и hCG+9 както и общите за двете – в прекриващата се зона на графиката; (С) GO генно-онтологичен обогатителен анализ на специфичните и припокриващите се ДЕГ. GO - gene ontology, BP- biological process, MF- molecular function, CC-cellular component. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Идентифицирахме 127 и 883 ДЕ гени в hCG+7 и hCG+9, от които 10-те най-силно променени гени с повишена експресия и 10 най-силно променени гени с понижена експресия са представени на *таблица 3*.

Таблица 3. Промени в генната експресията във времеви точки hCG+7 и hCG+9 (при сравнения с ПФ). ДЕ гени с  $p < 0.05$ .

<b>hCG+7</b>		
<b>GeneID</b>	<b>log2(FC)</b>	<b>P-value</b>
<i>ДЕ гени с повишена експресия</i>		
AL139393.3	1,43	0,000119
PROK1	1,42	0,000113
SLC28A3	1,42	7,53E-05
MYLK3	1,39	0,000157
ALDH1A3	1,37	0,000143
FP671120.8	1,35	1,66E-05
IRS2	1,33	0,000326
GSK3A	1,33	0,00018
SDCBP2	1,29	0,000589
AC134043.3	1,27	0,000232
<i>ДЕ гени с понижена експресия</i>		
ALAS2	-1,17	0,00169
UBASH3A	-1,24	0,000709
B3GALT1	-1,25	0,000241
MMP7	-1,25	0,000338
CCN4	-1,27	2,35E-05
LINC01411	-1,28	0,000638
LINC01016	-1,29	0,000583
PRRG3	-1,29	3,72E-05
AC124798.2	-1,36	0,000288
IFI44L	-1,41	3,32E-06

<b>hCG+9</b>		
<b>GeneID</b>	<b>log2(FC)</b>	<b>P-value</b>
<i>ДЕ гени с повишена експресия</i>		
GALNT15	2,31	4,04E-07
SDCBP2	2,30	1,42E-07
SLC28A3	2,17	2,28E-07
DEPP1	2,16	1,69E-06
MUC15	2,12	6,85E-08
IRS2	2,12	7,72E-07
PROK1	2,11	4,38E-06
THBD	2,01	5,42E-06
LINC02669	1,97	1,83E-05
AL078590.2	1,97	1,63E-05
<i>ДЕ гени с понижена експресия</i>		
GAPDHP71	-1,69	0,000178
<b>MYCN</b>	-1,71	0,000153
ETV1	-1,78	1,25E-07
AC117529.2	-1,79	9,06E-05
IGKC	-1,80	7,47E-07
SEMA3E	-1,87	4,19E-05
LRRTM4	-1,89	3,48E-05
CNTN1	-1,95	1,08E-06
BCHE	-2,10	8,27E-07
LINC01411	-2,29	5,21E-07

Анализът на функционално обогатяване на ДЕ гени при двете точки на рецептивната фаза даде информация за тяхната роля в ендометриалната рецептивност. Най-много обогатени GO термини са открити в ДЕ гени при hCG+9, като GO категорията Молекулярна функция (GO:MF) беше обогатена с: хемокинова активност, трансмембранна транспортна активност и др., а GO категорията Биологични процеси (GO:BP) бе обогатена с: отговор на външен стимул, отбранителен отговор, локализация и др. Анализът на функционалното обогатяване на ДЕ гени за hCG+7 идентифицира молекулярни функции и биологични пътища, свързани с сигнализирането на цитокини и интерферон тип I (фигура 2С).

## 5. Интегриран анализ (регулаторни мрежи) на диференциално-експресираните гени, микроРНК и изоформи в хода на ендометриалния цикъл

Прогнозирането на прицелните гени на ДЕ микроРНК и изоформи с помощта на базата данни miRDB е от значение за разбирането на техните функции в клетката. 3'-изоформите, които имат един същ зародишев регион с иРНК като съответните канонична микроРНК, имат същите прицелни гени с тях. За разлика от тях, 5'-изоформите, които са с променена контактна област спрямо референтната микроРНК, са свързани с различни генни мишени.

ДЕ фамилия микроРНК	RefSeq микроРНК (канонична) и ДЕ изоформи с променен зародишев регион (5'-isomiRs)		10 прицелни гени с най-висока прогнозна целева стойност
	Name	Sequence	
miR10a/b	miR-10a-5p miR-10b-5p	<u>TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG</u> <u>TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG</u>	(99) CADM2; (98) TFAP2C, CNOT6; (97) GALNT1, E2F7, RORA; (96) SOBP, KCNA6, CRLF3; (95) ELOVL2
	miR-10a-5p_t_+1_-1 miR-10a-5p_t_+1_+1 miR-10b-5p_t_+1_-1 miR-10b-5p_t_+1_+1	<u>ACCCTGTAGATCCGAATTTGT</u> <u>ACCCTGTAGATCCGAATTTGTGT</u> <u>ACCCTGTAGAACCGAATTTGT</u> <u>ACCCTGTAGAACCGAATTTGTGT</u>	(98) CHD1; (96) DIPK2A, CPED1; (95) PCDH17, CNOT6, CADM2; (94) DDX3X, NCK2; (93) RORA, FAM160B1
miR125a/b	miR-125a-5p miR-125b-5p	<u>TCCCTGAGACCCCTTTAACCTGTGA</u> <u>TCCCTGAGACCCCTAACCTGTGA</u>	(99) STARD13, FREM1, PPP4R3A, BMF, GCNT1, SH3TC2, ZNF704, ARID3B; (98) IER3IP1, ACHE
	miR-125a-5p_t_+1_-2 miR-125b-5p_t_+1_0	<u>CCCTGAGACCCCTTTAACCTGT</u> <u>CCCTGAGACCCCTAACCTGTGA</u>	(99) IGDCC3, RBM41, RPS6KL1, CEP170B, FREM1; (98) LAD1, HNF4G, LOXL4, IMPA2, FEN1
miR199a	miR-199a-5p	<u>CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC</u>	(100) DDR1; (99) SLC25A23, NAA40, ZNF763, MYRF; (98) CLCN3, SLC24A3, CELSR1, LIN7C, HAPLN1
	miR-199a-5p_t_+1_0	<u>CCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC</u>	(98) PALLD; (97) YWHAB, ROR1, STAM, NAV3, ELOVL5, QTRT2, SIX4; (96) DCX, ZNF367I
miR27b	miR-27b-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	(100) AFF4, GXYLT1, ARFGEF1, GCC2, DCUN1D4, PLK4, TNPO1, TRPV3, GAB1; (99) BEX3
	miR-27b-3p_t_+1_0	TCACAGTGGCTAAGTTCTGC	(100) SZRD1, AFF4, KDM7A; (99) RPS6KA5,

			DCUN1D4, GPAM, SMAP1, SEC22A, IGLON5, FRMPD3
<b>miR30d</b>	miR-30d-5p	<u>TGTAACATCCCCGACTGGAAG</u>	(100) TWF1, B3GNT5, WDR7, SCN2A, BRWD3, PTGFRN, DCUN1D3, NFAT5, KLHL20, PPARGC1B
	miR-30d-5p_t_+1_+2	<u>GTAAACATCCCCGACTGGAAGCT</u>	(100) FAM13C, RTKN2, SLC4A7, CREBBP, CAPRIN1, MAP4K4, CREB5, KHLH28, BRWD3, PDS5B
<b>miR449c</b>	miR-449c-5p	<u>TAGGCAGTGTATTGCTAGCGGCTGT</u>	(100) TENM1; (98) ELMOD1, RFX3; (97) DLL1, ZC4H2, RAB3C; (96) STK38L, THRB, CAMSAP2, PLEKHA1
	miR-449c-5p_t_+1_0 miR-449c-5p_t_+1_-2	<u>AGGCAGTGTATTGCTAGCGGCTGT</u> <u>AGGCAGTGTATTGCTAGCGGCT</u>	(100) HCN3, MDM4; (99) FAM76A, DLL1, RAPIGDS1, SDK2, E3F5, FAM167A, FKBP1B, PPP1R11; (98) MYCN
<b>miR483</b>	miR-483-3p	<u>TCACTCCTCTCCTCCCGTCTT</u>	(98) GAN; (96) PGAM1, RBAK; (95) AMZ2, AFF1, ZBTB26; (94) OGT, IGF1, PGAM4; (93) SLC22A23
	miR-483-3p_p_+1_+2	<u>CACTCCTCTCCTCCCGTCTTCT</u>	(96) TSPAN3, ABCB5; (95) DPP10; (94) CHSY3, TOPORS; (93) INPP1; (92) GAP43, PAM; (91) DDX5; (90) ITGAV
<b>miR99a</b>	miR-99a-5p	<u>AACCCGTAGATCCGATCTTGTG</u>	(96) TRIB2; (94) KBTBD8, SMARCA5; (93) MTOR; (91) HS3ST2, RAVER2; (90) ZZEF1, BAZ2A; (89) NOX4, HS3ST3B1
	miR-99a-5p_t_-1_-1	<u>AAACCCGTAGATCCGATCTTGT</u>	(94) VLDLR; (93) ZZEF1; (92) MTOR, FZD8; (85) RRAGD; (84) PPM1H; (82) RAVER2, TRIM71; (77) TRIB2; (75) PPP3CA

Таблица 4. Негативна връзка между ДЕ микроРНК/изоформи и генни таргети в рецептивен ендометриум. За всяка група е даден представителят, чиято експресия е най-изразена. Подчертан е зародишевия регион.

Сравняването по двойки (Paired comparison) между прогнозираните цели на ДЕ микроРНК и изоформи с ДЕ гени установи множество двойки „микроРНК и изоформи/генна мишена“ в рецептивния ендометриум. Прогнозирани бяха 280 отрицателни връзки и 281 положително свързани двойки „микроРНК и изоформи/генна мишена“ в рецептивния ендометриум. Тъй като микроРНК изпълняват основно функция на отрицателни транскрипционни регулатори за прицелните транскрипти, в *таблица 4*

представяме негативно свързаните микроРНК/изоформи и прицелни гени в рецептивен ендометриум. 18 прицелни транскрипта, от тези негативно свързани с микроРНК/изоформи в рецептивен ендометриум, са генни мишени на повече от една микроРНК или изоформа. MYCN, FGF7 и CNTN1 са най-променените мишени в рецептивния ендометриум в сравнение с пре-рецептивния, от които MYCN има най-висок целеви резултат (за 5'3'-изоформите на miR-449c). На 5'- и 5'3'-изоформите на miR-449c-5p бяха предвидени 268 генни мишени със среден таргетен резултат, по-висок от този на референтната микроРНК.

## **6. Експресионен анализ на miR-449 и нейните изоформи с помощта на RT-qPCR в изследваните фази на ендометриалния цикъл.**

Анализът на данните от секвенирането на малки РНК, показва че статистически значимите изменения в ДЕ се установяват при изоформите на miR-449c - miR-449c\_+1\_0, miR-449c\_0\_+1 и miR-449c\_+1+1, както и при miR-375 и нейната изоформа miR-375\_0\_+1, и miR-1298.

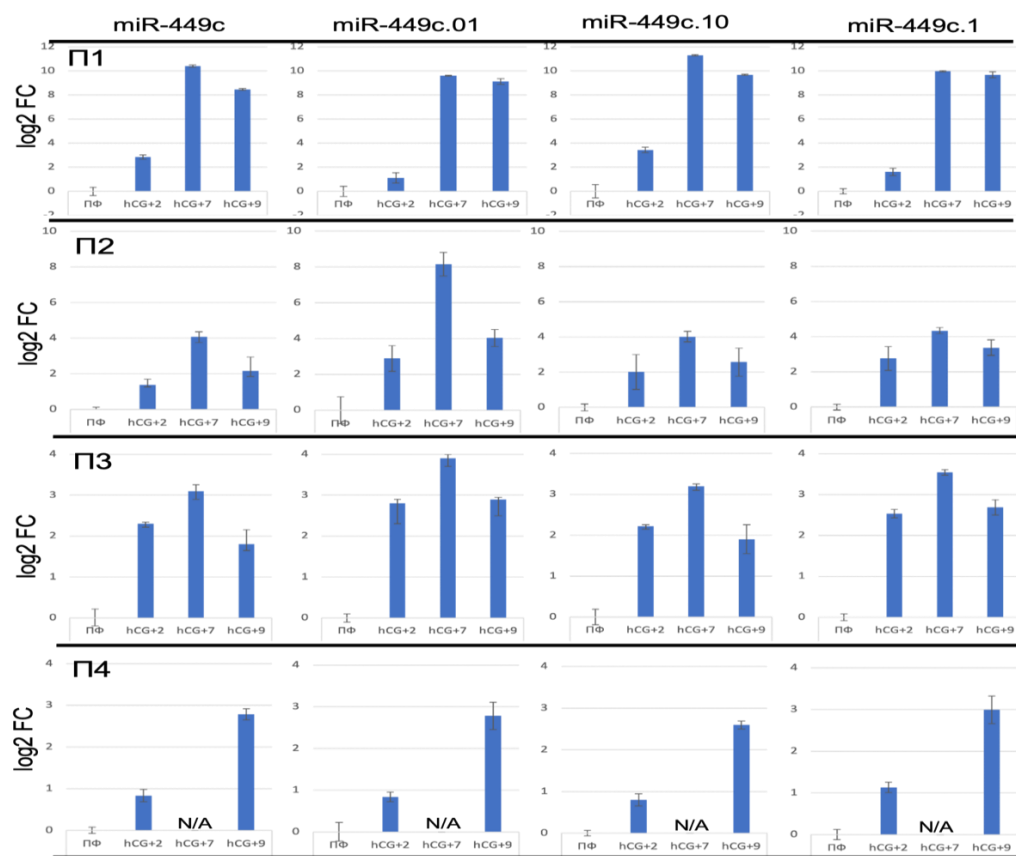
За целите на проведения qPCR се направи дизайн на специфични праймери за всяка микроРНК и изоформа ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). С тях се синтезира кДНК върху матрица зрели молекули микроРНК, с последваща амплификация на съответната кДНК. Проектираните специфични праймери са от типа "стъбло-бримка" (~ 49 нт). Създадените сонди TaqMan са с дължина около 20 до 30 нт. Като флуорофор прикрепен към 5' края бе използван -FAM, а като негов гасител - TAMRA (6-карбокситетраметилпродамин). Диапазонът на Tm е между 60°C до 70°C. Като ендогенна контрола беше използвана RNU48, за която има данни, че остава с непроменена експресия преди и след овулацията, което я прави надеждна референция.

За амплификация на miR-449c и нейните изоформи са използвани следните комбинации праймерни двойки и проби:

miR- 449c (miR-449c-5p)	- SL 449c-5p,449c-FW, 449c -R- (UR), Taq 449c
miR- 449c.01 (miR-449c-5p_0_+1)	- SL 449c.1-5p, 449c-FW, 449c -R- (UR), Taq 449c
miR- 449c.10 (miR-449c-5p_+1_0)	- SL 449c-5p, 449c.1-FW, 449c -R- (UR), Taq 449c.1
miR- 449c.1 (miR-449c-5p_+1_+1)	- SL 449c.1-5p, 449c.1-FW, 449c -R- (UR), Taq 449c.1

Експресионните нива на miR-449c и miR-449c.1 бяха определени чрез RT-qPCR с TaqMan™ в четирите времеви точки - P, hCG+2, hCG+7 и hCG+9, последните две от които са във фазата на Имплантационния прозорец.

На *фигура 3* са представени резултатите за експресионната динамика на miR-449c и нейните изоформи, получени чрез SL RT-qPCR. Относителните промени в експресионните нива през анализираните фази на ендометриалния цикъл (hCG+2, hCG+7 и hCG+9) са определяни спрямо ПФ (референтна проба). Получените експресионни профили на изследваната микроРНК и нейните изоформи показват тенденция към повишена експресия през двете времеви точки на рецептивната фаза, подобна на тази, установената чрез секвениране на малки РНК. Тук се наблюдава и тенденция за спадане в нивата miR449c на и нейните изоформи при времева точка hCG+9 при сравнение с hCG+7.



*Фигура 3.* Експресионен профил на miR-449c и нейните изоформи по време на фазовите преходи на ендометриалния цикъл. Относителната експресия микроРНК и изоформите е изразена със стойността log2FC; трите времеви точки на hCG+2, hCG+7 и hCG+9 се сравняват с пролиферативната фаза; miR-449c\_+1\_0 (miR-449c.10), miR-449c\_0\_+1 (miR-449c.01) и miR-449c\_+1+1 (miR-449c.1), всяка проба има 3 технични повторения.

Налице е повишена експресия през двете точки на рецептивната фаза, подобно на резултатите от секвениране на малки РНК както и тенденция за спадане в нивата miR449c и на нейните изоформи в hCG+9 при сравнение с hCN+7.

Експресионният анализ на най-силно експресираната изоформа - miR-449c\_+1\_0 (miR-449c\_10, или за по-кратко miR-449c.1) беше разширен с частен случай (case study).- съпоставка между две жени, представителки на различна възраст. Сравнението между хистологичните находки при двете жени показва скъсяване на секреторна фаза при ПЗ, с промени тип късна секреторна фаза в точка hCG+9 при перименопаузалната жена (ПЗ). Сравнихме също така динамиката на ендометриалната експресия на miR-449c.1 във фазовия преход, като проведохме RT-qPCR с праймери стъбло-примка и сонди, изготвени за miR-449c.1 Установените експресионни нива миРНКа 449c. през средна секреторна фаза показваха повишаване за пациент П1 и понижаване при ПЗ. Проверихме експресионните нива на предшественика на miR-449 (който е предшественик и на нейните изоформи) в ендометриалните проби от двете пациентки. Експресионният профил на предшественика бе повишен при П1 и понижен при ПЗ в средна секреторна фаза, което е в позитивна корелация с експресионните профили на miR-449c.1 и другите членове на същото семейство миРНК. Това подсказва, че вероятно експресията на фамилия miR-449 се контролира на транскрипционно ниво, а детерминантите за това предстои да бъдат идентифицирани в последващи изследвания.

## V. ДИСКУСИЯ

През репродуктивния живот на жената, ендиметриумът подлежи на периодични промени в рамките на всеки цикъл. В резултат на сложните взаимодействия между мозъчна кора, ХТ, ХФ, яйчник и ендометриум – маточната лигавица се подготвя да приеме за имплантация продуктът на зачатие – ембрионът (*Gupta et al., 2015*). Комплексните взаимовръзки на молекулярно ниво определят възможността матката да приеме или отхвърли ембриото (*Bulun and Adashi, 2008*).

Резултатите от секвенирането от ново поколение показват, че MIR гените могат да произведат множество изоформи на микроРНК, като техният репертоар излиза извън таргетите на влияние на каноничните микроРНКи, с което се разширява регулаторната мрежа на MIR гените (*Tomasello et al., 2021*). Често референтната микроРНК може да бъде по-малко представена от своите изоформи(*Kim et al., 2017, Ivey et al., 2010*),..В литературата са докладвани проучвания, които предоставят качествена и количествена оценка на динамиката на микроРНК по време на цикличните промени на здравия

ендометриум, както и при ендометриални дисфункции (*Altmae et al., 2013; Altmae et al., 2017, Sigurgeirsson et al., 2017; Rekker et al., 2018*).

Доколкото ни е известно, това е първи опит да се профилират промените в микроРНКите и техните изоформи във фазовия преход при здрав ендометриум. Анализът на sRNA-seq показва динамиката в експресията на множество семейства микроРНКи и техните изоформи: miR125a/b, miR10a/b, miR449c, miR92a/b, and miR99a. Изоформите на miR-125a, miR-125b, miR-92a, и miR-92b показаха намалена експресията в пререцептивна и рецептивна фаза сравнени с пролиферативна. ИзомиР семействата miR-125a, miR-125b, miR-92a и miR-92b предполагаме, че допринасят за ангиогенезата в ендометриалната тъкан, която израства и се ремоделира с всеки цикъл (*Reynolds et al., 2002*). Идентифицирахме множество изоформи на миРНКите от семейство miR-10a and miR-10b, завишени в прехода от пререцептивна към рецептивна фаза. Докладвани са като финни модулатори на пролиферацията и апоптозата в женския репродуктивен тракт (*Jiajie et al., 2017*). В нашето изследване експресията на изоформите на семейство miR-449c, както и на самата канонична микроРНК, е най-изразено повишена при транзицията от пререцептивна към рецептивна фаза. За първи път се проследява експресията на тази миРНК през различните фази на един ендометриален цикъл с RT-qPCR, и се доказва максимална експресия в рецептивен ендометриум, с последващо намаляване на експресията. miR-449c е част от miR-34/449 суперфамилия, която включва шест хомоложни miRs (miR-34a, miR-34b/c и miR-449a/b/c). Изоформите свързани с рецептивен ендометриум, които са 5'-изоформи, са изоформите на miR-449c, miR-34a/c и miR-449a/b.

Сред диференциално експресираниите гени в рецептивния ендометриум нашето внимание беше привлечено от MYCN, предсказан като ген-мишена на 5'-изоформите на miR-449c и let7g-5p, с висок таргет скор. Регулаторната му мрежа включва : let7g-5p, miR-345, семействата isomiR на miR10a/b, miR-92a и miR-449c и MYCN и TWIST1, в рецептивния ендометриум. Забелязахме отрицателна връзка между експресионните нива на MYCN (намалена) и изоформите на тези микроРНК (увеличени) в рецептивна фаза, вероятно изоформно семейство miR-449c е негативен регулатор на MYCN (*Schwab 2004*). Регулаторната мрежа описана тук е само малка част от общата, далеч по-голяма регулаторна картина на молекулярните механизми участващи в ендометриалната рецептивност.

В контекста на ендометриалното ремоделиране, има кумулирани данни за противоположните роли на сигналните пътища NOTCH and WNT (*Garcia-Alonso et al.,*



2021. WNT доминира през ранна секреторна фаза, с което поддържа линията на цилиарния епител, докато NOTCH доминира в средна и късна секреторни фази, за да даде тласък на диференциацията на секреторните епителни клетки. Наблюдавахме динамични промени в експресията на членовете от семейство miR-449a/c през секреторната фаза, с пик в hCG + 7, последван от намалена експресия в hCG + 9. Изказваме хипотезата, че семейство miR-449 може би влияе на баланса между двата сигнални пътя, като първоначално упражнява негативен контрол върху NOTCH сигналния път и така поддържа цилиарната квота, след което намалената експресия на нивата на тези миРНК в ендометриума води до активиране на NOTCH сигналния път и стимулиране на диференциацията в посока на секреторен епител. В проучванията от последните години, функционална дисрегулация на цилиарията е свързвана със стареенето на ендометриума (*Devesa-Peiro et al., 2022; Pathare et al., 2023*). Сравнителен анализ на резултати от проведено изследването на ендометриални проби на двете жени, представители на различна възраст, подсказват връзка между miR-449 семейството и генетичната регулация на ендометриалното стареене, което може би се реализира чрез цилиарните ендометриални епителни клетки (*Garcia-Alonso et al., 2021*) или чрез промени в цилиогенезата на дицидуалните стромални клетки (*Hassan et al., 2022*).

Това проучване има някои ограничения. Броят на пациентите не е голям, но това е типично за проучвания, при които пробонабирането е свързано с инвазивна, макар и микроинвазивна, процедура (*Bao et al., 2012; Lizé et al., 2011; Kuokkanen et al., 2010*). За да се минимализира интер и интра пациентската вариабилност, ендометриалните проби са взимани в рамките на един менструален цикъл в четири времеви точки. Генната експресия в ендометриалните биопсии взети във всяка следваща точка, малко или повече са повлияни от биопсирането в предходната, поради локалната травма, която търпи ендометриума. Важно е да се осъществи валидиране *in silico* на предсказаните микроРНК и изоформи и техните таргетни транскрипти чрез RT-qPCR при голям брой жени както при нормален така и при менструален цикъл с отклонения.

## VI. ИЗВОДИ

1. Ендометриумът е динамична тъкан, която се влияе от променливите нива на репродуктивните хормони. Стойностите на Лутеинизиращия хормон (LH), Естрадиола (E2) и Прогестерона (P) в здравия ендометриум със стартирана овулация чрез Хорион гонадотропин (hCG), потвърдиха установената динамика във фазовите преходи на ендометриалния цикъл и най-вече в имплантационния прозорец.
2. Хистологичното изследване на ендометриална тъкан потвърди известните зависимости с промените в ендометриалната тъкан, както и характерни възрастови изменения.
3. Чрез секвениране от ново поколение на малки РНК молекули (small RNA-seq) за първи път е установена експресионната динамика на микроРНК и техните изоформи в четири времеви точки на hCG-стартиран ендометриум - пролиферативна фаза, пре-рецептивна и рецептивна фаза с две времеви точки в рамките на имплантационния прозорец.
4. Установени са 15 микроРНК и 71 изоформи (5'-изоформи, 3'-изоформи, и 5'3'-изоформи), които се експресират в ендометриална тъкан, и показват динамика в експресията си през изследваните фази на ендометриалния цикъл. Броят на диференциално експресирани микроРНК и изоформи се увеличават значително при прехода от пре-рецептивна (hCG+2) към рецептивна (hCG+7 и hCG+9) фаза - наблюдава се повишаване на експресионните нива сред членовете на семействата на miR-10a/b, miR-30d, miR-375, miR-449c и miR-99a, вкл. на зрели форми, шаблонни и нешаблонни изоформи.
5. Анализът на данните, получени при секвенирането на малки РНК, показва че сред статистически значимите диференциално експресирани микроРНК и изоформи, в рецептивния ендометриум най-силно е повлияна фамилията на miR-449c - най-силно се повишава експресията на 5'-изоформите miR-449c.1 и miR-449c.2, както и на каноничната форма miR-449c, макар и в по-малка степен.
6. Експресионната динамика на фамилията на miR-449c в хода на ендометриалния цикъл, установена чрез RT-qPCR показват тенденция за увеличаване на транскрипционните нива през двете времеви точки на рецептивната фаза и потвърждава резултатите, получени чрез секвениране на малки РНК.

7. Сравнителният анализ на експресионните профили на miR-449c.1 (изоформата с най-високи нива на експресия в рецептивния ендометриум), проведен в частен случай (case study) на жена в репродуктивна възраст и жена в перименопауза, не установи повишаване на нивата на miR-449c.1 при перименопаузалната жена. Това загатва за вероятното участие на семейството на miR-449c в стареенето на ендометриума и свързаното с това потискане на ендометриалната рецептивност.
8. Чрез секвениране от ново поколение на РНК молекули (RNA-seq) за първи път е установена генната експресионна динамика в четири времеви точки на hCG-стартуван ендометриум - пролиферативна фаза, пре-рецептивна и рецептивна фаза с две времеви точки в рамките на имплантационния прозорец.
9. Най-значими промени в генната експресия са установени във времева точка hCG+9 на имплантационния прозорец - 614 гена имат повишена експресия и 269 имат понижена експресия спрямо пролиферативната фаза.
10. Генно-онтологичният анализ (GO) на диференциално експресираните гени установи най-голям брой обогатени термини при времева точка hCG+9 - GO категорията Молекулярна функция (GO:MF) е обогатена най-вече с хемокинова активност, трансмембранна транспортна активност, активност на свързване на хемокин рецептор; категорията Биологични процеси (GO:BP) включва термини като отговор на външен стимул, защитен отговор, локализация, регулиране на биологичното качество и други; KEGG анализа показва DE гени, свързани с пътища като минерална абсорбция, комплемент и коагулационни каскади и други.
11. Анализът за прогнозиране на прицелни гени (генните мишени) на микроРНК и изоформи установи множество DE двойки „микроРНК и изоформи/генна мишена“ в рецептивния ендометриум, от които 280 отрицателно свързани двойки и 281 положително свързани двойки. 18 DE транскрипта са генни мишени на повече от една DE микроРНК или изоформа. MYCN, FGF7 и CNTN1 са най-променените мишени в рецептивния ендометриум в сравнение с пререцептивния. От тях MYCN се отличава с най-висок прогнозиран целеви резултат, който корелира с 5'3'-изоформите на miR-449c.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ** Настоящото проучване разкрива сложността и динамиката на ендометриалните изоформи на микроРНК, които биха могли да действат сами или съвместно с каноничните микроРНК в контрола на функционално свързани гени,

отговорни за установяване на ендометриалната рецептивност. Сред тях, семейството на miR-449c се откроява с голям потенциал за медиране на специфични за ендометриална рецептивност сигнални пътища като NOTCH и Wnt. Проучването може да бъде продължено в посока за установяване на семейството на miR-449c като биомаркер за ендометриална рецептивност.

По-нататъшни изследвания на експресионните профили на ендометриалните микроРНК и изоформи, както и на техните прицелни гени, може да даде по-задълбочена картина на ендометриалните нарушения при жени с репродуктивни проблеми и повтарящи се имплантационни неудачи.

## **VII. Научни приноси на дисертацията**

### *1. научно-теоретични*

1.1. За първи път са направени широкомащабни експресионни анализи на малки РНК и иРНК в четири времеви точки, съответстващи на пролиферативна фаза, пре-рецептивна фаза и рецептивна фаза, на hCG-стартан ендометриум на здрави фертилни жени.

1.2. За първи път са идентифицирани диференциално експресирани микроРНК и техни изоформи във фазовите преходи на ендометриалния цикъл при праймирана овулация.

1.3. За първи път е установено участие на фамилия miR-449, представена от канонични форми и множество изоформи в установяване на ендометриална рецептивност в hCG-стартан ендометриум. Сред изоформите има такива с изместен зародишев регион, с което броят от прогнозираните прицелни гени за фамилията се разширява. Всичко това е предпоставка за синергичен регулаторен ефект на фамилия miR-449 върху молекулните механизми, обуславящи установяването на ендометриалната рецептивност.

### *2. методични*

2.1. Направен е дизайн на праймери от типа „събло-бримка“ и на TaqMAN сонди за RT-qPCR амплификация на miR-449 и нейните изоформи. Праймерите и сондите се характеризират със специфичност и ефективност на амплификация и могат да бъдат използвани за оценка на относителните експресионни нива на фамилия miR-449 в биопсии при човек.

### *3. научно-приложни*

3.1. Проведеното изследване създава основа за по-задълбочено проучване и развитие на клинично-приложим тест за ендометриална рецептивност, базиран на експресионни нива на микроРНК и техните изоформи

#### *4. приноси с потвърдителен характер*

4.1. Проведените паралелни серологични хормонални изследвания и хистологични оценки на ендометриалните биопсични проби потвърждават известните промени, които настъпват в различните фази на менструалния цикъл в ендометриума и в репродуктивните хормони.

### **VIII. Списък на публикациите по дисертацията**

1. Nikolova, M., Naydenov, M., Glogovitis, I., Apostolov, A., Saare, M., Boggavarapu, N., Salumets, A., Baev, V., Yahubyan, G. Coupling miR/isomiR and mRNA Expression Signatures Unveils New Molecular Layers of Endometrial Receptivity. *Life* **2021**, *11*, 1391. <https://doi.org/10.3390/life11121391>, Q2, IF 3.2.

2. Naydenov, M., Nikolova, M., Apostolov, A., Glogovitis, I., Salumets, A., Baev, V., Yahubyan, G. The Dynamics of miR-449a/c Expression during Uterine Cycles Are Associated with Endometrial Development. *Biology* **2023**, *12*, 55. <https://doi.org/10.3390/biology12010055>, Q2, IF 4.2.

3. Найденов М., Яхубян Г., Николова М. (2018) Микро РНК молекулите Мир-30Б, Мир-30Д и Мир-31 – обещаващ диагностичен биомаркер за оценка на ендометриалната рецептивност, Репродуктивно здраве, БАСРЗ, бр 27/2018 стр. 12-15.

### **IX Участие в научни форуми**

1. Nikolova, M., Milova, N., Milov, A., Naydenov, M., Yahubyan, G, Age-dependent dynamics of ovarian hormones in hCG-primed endometrial cycle of healthy women Third National Young Conference on Biology, 01 November 2022, Plovdiv.

2. Nikolova, M., Naydenov, M., Apostolov, A., Glogovitis, I., Saare, M., Salumets, A; Baev, V.; and Yahubyan, G. Time-course analysis of endometrial miR/isomiR expression dynamics during hCG-primed menstrual-cycle phase transitions ESHRE Virtual 37<sup>th</sup> Annual Meeting 27-30 June 2021

3. Nikolova, M., Tashkova, D., Milov, A., Naydenov, M., Dimitrakova E., Yahubyan, G., Histological evaluation of human endometrium at different phases of hCG-primed menstrual cycle BalkanBio Conference, 15-16 April 2021

4. Nikolova, M., Yahubyan, G., Apostolov, A., Tashkova, D., Milova, N., Naydenov, M. Correlation of histological and hormonal data with the expression profiles of endometrial specific microRNAs in proliferative, early-secretory and mid-secretory phase in one cycle of a healthy fertile woman Национален конгрес по стерилитет, 05-08 март 2020 Боровец
5. Nikolova, M., Naydenov, M., Yahubyan G. Expression profile of miR31 in proliferative, early-secretory, mid-secretory and late-secretory phase in one cycle of a healthy fertile woman XX Национален конгрес по стерилитет, 07-10 март 2019, Боровец.
6. Nikolova, M., Naydenov, M., Yahubyan G. Expression profile of the microRNAs- miR30b, miR30d, miR335 and miR548 in proliferative, early-secretory and mid-secretory phases of one menstrual cycle of a healthy fertile woman Юбилейната научна сесия „Дни на науката – 2019“ 31 октомври – 1 ноември 2019 г. Съюз на учените в България – Пловдив.

## X. Цитирания

1. Guo, J., Zhou, W., Sacco, M., Downing, P., Dimitriadis, E., & Zhao, F. (2023). Using organoids to investigate human endometrial receptivity. *Frontiers in Endocrinology*, *14*.
2. Guo, L., Jia, L., Luo, L., Xu, X., Xiang, Y., Ren, Y., & Liang, T. (2022). Critical roles of circular RNA in tumor metastasis via acting as a sponge of miRNA/isomiR. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), 7024.
3. Juárez-Barber, E., Segura-Benítez, M., Carbajo-García, M. C., Bas-Rivas, A., Faus, A., Vidal, C., & Ferrero, H. (2023). Extracellular vesicles secreted by adenomyosis endometrial organoids contain miRNAs involved in embryo implantation and pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*, *46*(3), 470-481.
4. Segura-Benítez, M., Bas-Rivas, A., Juárez-Barber, E., Carbajo-García, M. C., Faus, A., De Los Santos, M. J., & Ferrero, H. (2023). Human blastocysts uptake extracellular vesicles secreted by endometrial cells containing miRNAs related to implantation. *Human Reproduction*, *38*(8), 1547-1559.
5. Li, Q., Chen, Y., Adeniran, S. O., Qiu, Z., Zhao, Q., & Zheng, P. (2023). LIF regulates the expression of miR-27a-3p and HOXA10 in bovine endometrial epithelial cells via STAT3 pathway. *Theriogenology*, *210*, 101-109.
6. Guo, L., Ren, D., Zhang, Y., Wang, Q., Yu, S., Xu, X., ... & Liang, T. (2023). A comprehensive pan-cancer analysis reveals cancer-associated robust isomiR expression landscapes in miRNA arm switching. *Molecular Genetics and Genomics*, *298*(3), 521-535.

7. Li, C., Zhu, X., Lv, X., Han, X., Xu, Y., Huang, J., ... & Yu, Z. (2022). Recent Updates on the Role of the MicroRNA-10 Family in Gynecological Malignancies. *Journal of Oncology*, 2022.
8. Orbán, T. I. (2023). One locus, several functional RNAs—emerging roles of the mechanisms responsible for the sequence variability of microRNAs. *Biologia Futura*, 1-12.
9. Pathare, A. D., Loid, M., Saare, M., Gidlöf, S. B., Zamani Esteki, M., Acharya, G., ... & Salumets, A. (2023). Endometrial receptivity in women of advanced age: an underrated factor in infertility. *Human reproduction update*, 29(6), 773-793.
10. Thakur, L., & Thakur, S. (2023). The interplay of sex steroid hormones and microRNAs in endometrial cancer: current understanding and future directions. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1166948.
11. Jacek Z. Kubiak, J.Z., Kloc M., How the Timing of Biological Processes Is Controlled and Modified at the Molecular and Cellular Level? *Biology* 13(3):170 DOI:10.3390/biology13030170 March 2024
12. Gál, L., Fóthi, Á., Orosz, G., Nagy, S., Than, N. G., & Orbán, T. I. (2024). Exosomal small RNA profiling in first-trimester maternal blood explores early molecular pathways of preterm preeclampsia. *Frontiers in Immunology*, 15, 1321191.

**XI Библиография** – справка може да бъде направена в дисертационния труд

## **XII Благодарности**

С благодарност към научните ми ръководители проф. Галина Яхубян и гл. ас. Младен Найденов за подкрепата, насоките, отделеното време и търпение, както и към всички други членове на екипа, които направиха възможна реализацията на този научен труд.

Благодаря на доц. Емилия Дамянова, която оцени смисъла на това проучване в неговия зародиш и направи така, че смелостта и постоянството никога да не ме напускат.

С благодарност към трима велики професори, чиито имена ще запазя за себе си, за да не разваля магията от тяхното присъствие и роля в моя професионален и научен път.

Благодаря на висшия мениджмънт на клиниката, в която работя, за проявеното разбиране и подкрепа. Благодаря на прекрасното си семейство, което ме подкрепяше и търпеше през всичките години.