

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.703>

<https://orcid.org/0000-0002-5608-7358>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Deimantė Žukauskaitė

Epigenetinių ir kitų molekulinų veiksnių reikšmė endometriumo stromos ląstelių funkcijoms

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete Gyvybės mokslų centre Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriuje.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas (-ė) – prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

prof. dr. Dalia Baršytė-Lovejoy (Toronto universitetas, Kanada, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

dr. Augustas Pivoriūnas (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

dr. Egidijus Šimoliūnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. gruodžio mėn. 6 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva).

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.703>

<https://orcid.org/0000-0002-5608-7358>

VILNIUS UNIVERSITY

Deimantė Žukauskaitė

Impact of Epigenetic and Other Molecular Factors on the Function of Endometrial Stromal Cells

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University Life Science Center, Institute of Biochemistry, Department of Molecular Cell Biology.

Academic supervisor – Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Dalia Baršytė-Lovejoy (University of Toronto, Canada, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Augustas Pivoriūnas (Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Assoc. Prof. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Egidijus Šimoliūnas (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 p.m. on 6th December 2024 in auditorium R401 of the Life Science Centre of Vilnius University. Address: Saulėtekis Ave. 7, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

5hmc – 5-hidroksimetilcitozinas;
AGT – angl. *angiotensinogen*;
AT – atvirkštinė transkripcija;
Aud. – audinys;
BAK1 – angl. *BCL2 Antagonist/Killer 1*;
BAX – angl. *BCL2 Associated X*;
BCL2 – angl. *B-cell lymphoma 2*;
BMI1 – pirmojo polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *polycomb protein BMI1*);
C/EBP β – CCAT/stipriklį surišantis baltymas β (angl. *CCAAT/Enhancer-Binding Protein β*);
cAMP – ciklinis adenzino monofosfatas (angl. *cyclic Adenosine Monophosphate*);
CBP – CREB surišantis baltymas (angl. *CREB-Binding Protein*);
ChIP – chromatino imunoprecipitavimas (angl. *Chromatin Immunoprecipitation*);
CREB – cAMP atsako elementą surišantis baltymas (angl. *cAMP Response Element-Binding protein*);
CREM – cAMP atsako elemento reguliatorius (angl. *cAMP Responsive Element Modulator*);
CXCL12 – angl. *C-X-C motif chemokine 12*;
db-cAMP – dibutiril ciklinis adenzino monofosfatas (angl. *dibutyril cyclic Adenosine Monophosphate*);
DMSO – dimetilsulfoksidas (angl. *Dimethyl Sulfoxide*);
DNMT – DNR metiltransferazė (angl. *DNR Methyltransferase*);
E2 – estradiolis;
EAL – endometriumo audinio ląstelės;
EED – antrojo polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *polycomb protein Embryonic Ectoderm Development*);
EEL – endometriumo epitelinės ląstelės;
EKL – embrioninės kamieninės ląstelės;
eMKL – endometriumo mezenchiminės kamieninės ląstelės;
Epac – cAMP aktyvuojamas pernešos baltymas (angl. *Exchange protein activated by cAMP*);
EPL – epitelinės pirmtakinės ląstelės;
Erk1/2 – užląstelinio signalo reguliuojama kinazė 1/2 (angl. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*);
ESL – endometriumo stromos ląstelės;
EV – užląstelinės pūslelės (angl. *Extracellular Vesicles*);
EZH2 – antrojo polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*);
FBLN1 – angl. *fibulin-1*;
FBS – fetalinis veršiuko serumas (angl. *Fetal Bovine Serum*);

FOXO1 – angl. *Forkhead Box O1*;
GLUT1 – gliukozės pernašos baltymas 1 (angl. *Glucose Transporter 1*);
GPX1 – angl. *Glutathione Peroxidase 1*;
GO – genų ontologija (angl. *gene ontology*);
H3 – trečias histonas;
H4 – ketvirtas histonas;
HAND2 – angl. *Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2*;
HAT – histonų acetiltransferazė (angl. *Histone Acetyltransferase*);
hCG – žmogaus choriono gonadotropinas (angl. *human chorionic gonadotropin*);
HDAC1/2/3 – histonų deacetilazė 1/2/3 (angl. *histone deacetylase 1/2/3*);
HMX3 – angl. *H6 Family Homeobox 3*;
HLA-ABC – I klasės žmogaus leukocitų antigenai (angl. *Human Leukocyte Antigen ABC*);
HLA-DR – II klasės (DR izotipo) žmogaus leukocitų antigenai (angl. *Human Leukocyte Antigen DR*);
HP1α – angl. *Heterochromatin Protein 1 homolog alfa*;
HRP – krienų peroksidaze (angl. *Horseradish peroxidase*)
HOXA10 – angl. *Homeobox A10*;
IBMX – (angl. *3-isobutyl-1-methylxanthine*);
ICSI – intracitoplazminė spermos injekcija;
IFN-γ – interferonas γ (angl. *Interferon γ*);
IGF – į insuliną panašus augimo veiksnys (angl. *Insulin-like growth factor*);
IGFBP1/7 – angl. *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1/7*;
IL – interleukinas (angl. *Interleukin*);
iPKL – indukuotos pliuripotentinės kamieninės ląstelės;
iRNR – informacinė RNR;
ISCT – Tarptautinės ląstelių ir genų terapijos asociacija (angl. *International Society for Cell & Gene Therapy*);
IVF – apvaisinimas mėgintuvėlyje (angl. *in vitro Fertilization*);
ITS – Insulino, transferino ir seleno rūgšties tirpalas;
KEGG – Kioto genų ir genomų enciklopedija (angl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*);
kPGR – kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija;
KT – kambario temperatūra;
LE – liaukinis epitelis;
LHCGR – liuteinizuojančio hormono/chorioninio gonadotropino receptorius (angl. *Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor*);
LIF – leukemijos slopinimo veiksnys (angl. *Leukemia Inhibitory Factor*);
MeDIP – metilintos DNR imunoišsodinimas (angl. *Methylated DNA Immunoprecipitation*);
miRNR – mikro RNR;
MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės;
MMP2/9 – angl. *Matrix Metalloproteinase-2/9*;
MPA – medroksiprogesterono acetatas;

MSL – mezenchiminės stromos ląstelės;
MSX1/2 – angl. *Msh Homeobox 1/2*;
NK ląstelė – natūralioji žudikė (angl. *Natural Killer*);
nRNR – nekoduojanti RNR;
P4 – progesteronas;
PAM – angl. *Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase*;
PAPPA – angl. *pregnancy-associated plasma protein A*;
PE – paviršinis epitelis;
PKA – proteinkinazė A;
PPARGC1A – angl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha*;
PR – progesterono receptorius;
PRC1/2 – polikombo slopinantis kompleksas 1/2 (angl. *Polycomb Repressive Complex 1/2*);
pre-miRNR – pirmtakinė miRNR (angl. *precursor miRNA*);
pri-miRNR – pirminė miRNR (angl. *primary miRNA*);
PRL – prolaktinas;
PRTN3 – angl. *Proteinase 3*;
PS – penicilinas ir streptomicinas;
PVDF – polivinilideno fluorido membrana;
RISC – RNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas (angl. *RNA-Induced Silencing Complex*);
RNAzė – ribonukleazė;
SDS – natrio dodecilsulfatas (angl. *sodium dodecyl sulfat*);
SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato denatūruojančio poliakrilamido gelio elektroforezė (angl. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*);
SN – standartinis nuokrypis;
SSEA4 – angl. *Stage-Specific Embryonic Antigen 4*;
STAT – angl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*;
STC1/2 – angl. *Stanniocalcin-1/2*;
SUSD2 – angl. *Sushi Domain Containing 2*;
SUZ12 – antrojo polikombo slopinančio komplekso subvienetas (angl. *SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*);
TET1/2/3 – Tet metilcitozino dioksigenazė 1/2/3 (angl. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 1/2/3*);
TIMP1 – audinių metalopeptidazės inhibitorius 1 (angl. *Tissue Inhibitor matrix Metallopeptidase 1*);
TNF – naviko nekrozės veiksnys (angl. *Tumor Necrosis Factor*);
TMT – angl. *Tandem mass tag*;
TXN – angl. *Thioredoxin*;
PSO – Pasaulinė sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization*);
VEGF – angl. *Vascular endothelial growth factor*;
WNT4 – Wnt šeimos baltymas 4 (angl. *Wnt family member 4*).

TURINYS

ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	16
1.1. Endometriumas.....	16
1.2. Endometriumo stromos ląstelės.....	19
1.3. Decidualizacija.....	21
1.4. Žmogaus chorioninis gonadotropinas.....	24
1.5. Epigenetiniai pokyčiai endometriumo ciklo metu.....	27
1.6.1. DNR metilinimas.....	27
1.6.2. Histonų modifikacijos.....	28
1.6.3. miRNR.....	31
1.7. Užląstelinės pūslelės.....	32
1.8. Audinių ir ląstelių gilus šaldymas.....	35
2. METODAI.....	38
2.1. Audinių surinkimas ir gilus šaldymas.....	38
2.2. Stromos ląstelių išskyrimas, kultivavimas, bei proliferacijos ir metabolinio aktyvumo įvertinimas.....	38
2.3. Diferenciacijos indukcija ir efektyvumo įvertinimas.....	39
2.4. ESL decidualizacija ir hCG poveikis.....	40
2.5. Tėkmės citometrija.....	41
2.6. DNR ir RNR išskyrimas.....	41
2.7. Atvirkštinė transkripcija (AT) ir kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (kPGR).....	42
2.8. Imunofermentinė analizė (<i>ELISA</i>).....	42
2.9. Chromatino imunoišsodinimas (ChIP) ir kPGR analizė.....	42
2.10. Metilintos DNR imunoišsodinimas (MeDIP) ir kPGR analizė.....	43
2.11. <i>Western Blot</i> analizė.....	44
2.12. miRNR analizė.....	45
2.13. EV surinkimas, charakterizavimas ir baltymų ir RNR skyrimas.....	45

2.14. EV baltymų nustatymas naudojant masių spektrometriją	46
2.15. EV trumpų RNR sekoskaita ir RT-kPGR.....	47
2.16. Statistinė analizė.....	47
3. REZULTATAI.....	48
3.1. Endometriumo ląstelių charakterizavimas	48
3.2. Endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtakos įvertinimas.....	49
3.3. ESL decidualizacijos įvertinimas	55
3.4. Epigenetinių reguliatorių ir jų katalizuojamų modifikacijų pokyčiai ESL diferenciacijos metu.....	57
3.5. H4hyperAc ir DNR metilinimo pokyčiai su decidualizacija susijusių genų srityse	60
3.6. miRNR pokyčiai ESL decidualizacijos metu	62
3.7. hCG poveikis ESL savybėms	64
3.8. Decidualizacijos ir hCG poveikio įtaka ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR profiliams	76
4. REZULTATŲ APTARIMAS	93
4.1. Endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaka išskirtoms stomos ląstelėms.....	93
4.2. Epigenetinių veiksnių pokyčiai ESL <i>in vitro</i> decidualizacijos metu.....	97
4.3. hCG įtaka ESL savybėms.....	100
4.4. Decidualizacijos ir hCG poveikio įtaka EV baltymų ir miRNR profilams.....	106
IŠVADOS.....	112
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	113
SUMMARY	136
Publikacijos disertacijos tema	156
Pranešimai konferencijose disertacijos tema.....	156
CURRICULUM VITAE	157
PADĖKA.....	158
Priedai.....	159

ĮVADAS

Pagal Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO, angl. *World Health Organization*) duomenis, net 1 iš 6 žmonių (apie 17,5 %) per savo gyvenimą yra susidūręs su nevaisingumo diagnoze (PSO, 2023). Taip pat nustatyta, kad nevaisingumas paveikia apie 10 – 15 % vaisingo amžiaus porų visame pasaulyje (Gerrits *et al.*, 2017). Nevaisingumas yra vyro arba moters reprodukcinės sistemos sutrikimas, patvirtinamas, jeigu per daugiau nei 12 mėnesių nepavyksta užmegzti nėštumo esant reguliariems lytiniais santykiams (Szamatowicz ir Szamatowicz, 2020). Nevaisingumas gali būti skirstomas į pirminį ir antrinį. Pirminis nevaisingumas diagnozuojamas tuomet, kai pacientams sunku susilaukti pirmojo vaiko, o antrinis nevaisingumas diagnozuojamas tada, kuomet pacientai/poros turi vaikų, tačiau kyla sunkumų pastoti dar kartą. Antrinis nevaisingumas yra dažniausiai pasitaikanti moterų nevaisingumo forma, kurią įprastai sukelia reprodukcinio trakto infekcijos (Vander Borghet ir Wyns, 2018). Reikšmingų nevaisingumo dažnio paplitimo skirtumų tarp geografinių regionų ar tarp šalių ekonominio lygio nebuvo nustatyta, tad tai yra visus pasaulio gyventojus paliečianti problema (PSO, 2023). Moteriškų ir vyriškų reprodukcinės sistemos nevaisingumą nulemiančių sutrikimų dažniai yra pasiskirstę maždaug per pusę (Vander Borghet ir Wyns, 2018). Tačiau net apie 14 – 30 % nevaisingumo atvejų tikslios priežastys nėra nustatomos (Sadeghi, 2015; Tamrakar ir Bastakoti, 2019). Moterų reprodukcinėje sistemoje nevaisingumas gali būti susijęs su kiaušidžių, gimdos, kiaušintakių ir endokrininės sistemos funkcijų sutrikimais (Vander Borghet ir Wyns, 2018). Nevaisingumo diagnozė, be to kad sukelia psichologinius, emocinius, socialinius ir net finansinius sunkumus, prieštarauja kiekvieno žmogaus esminei teisei į fizinę ir psichinę sveikatą, įskaitant ir teisę susilaukti vaikų (Zegers-Hochschild *et al.*, 2013). Dažniausiai neaiškios kilmės nevaisingumo gydymui taikomi metodai yra intrauterininė inseminacija ir apvaisinimas mėgintuvėlyje (*in vitro* apvaisinimas) (Mol *et al.*, 2018). Nors šie gydymo metodai padidina tikimybę su nevaisingumu susidūrusioms poroms susilaukti palikuonių, tačiau tai nėra specifiniai neaiškios kilmės nevaisingumo gydymo būdai, todėl pastojimo efektyvumas po tokių intervencijų išlieka gana žemas (Ombelet *et al.*, 2016; Wyns *et al.*, 2022).

Sėkminga embriono implantacija priklauso ne tik nuo embriono kokybės, bet ir nuo gimdos vidinės gleivinės endometriumo pasirengimo būsenos (Yang *et al.*, 2023). Kiekvieno menstruacinio ciklo metu, endometriumo audinyje vyksta drastiški struktūriniai ir funkciniai pokyčiai, kuriuos kontroliuoja moteriški lytiniai hormonai, šie pokyčiai reikalingi užtikrinant

tinkamą pagrindą embriono implantacijai ir tolimesniam nėštumo vystymuisi. Endometriumas įprastai yra receptyvus tik kelias dienas per mėnesinių ciklą sekrecinės fazės metu, todėl sėkmingai implantacijai yra svarbi tiksli sinchronizacija tarp embriono ir tinkamo endometriumo pasirengimo. Vienas pagrindinių endometriumo pokyčių formuojant receptyvią būseną embriono implantacijai yra progesterono sukeliama audinio diferenciacija vadinama decidualizacija, kurios metu endometriumo stromos fibroblastai diferencijuoja į sekrecines ląsteles ir tuo pačiu į audinį yra pritraukiamos imuninės ląstelės, taip užtikrinant tinkamą mitybinę ir imuninę aplinką blastocistos implantacijai ir placentos formavimui (Okada *et al.*, 2018). Neefektyvi ar sutrikusi endometriumo audinio decidualizacija yra siejama su nėštumo sutrikimais, tokiais kaip nevaisingumas, persileidimas, priešlaikinis gimdymas, pasikartojantis implantacijos nepakankamumas bei kitos gimdos ir placentos audinio ligos (Wu *et al.*, 2017; Garrido-Gomez *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2022).

Genų raiškos pokyčius, vykstančius decidualizacijos metu, reguliuoja steroidiniai hormonai, bei kiti molekuliniai ir epigenetiniai veiksniai (Liu *et al.*, 2020; Ng *et al.*, 2020). Epigenetika tiria ląstelių dalijimosi metu paveldimus genų raiškos reguliavimo mechanizmus, kurie nekeičia pačios DNR sekos ir yra svarbūs fundamentalių ląstelių procesų palaikyme (Al Aboud *et al.*, 2023). Epigenetiniai mechanizmai, tokie kaip DNR metilinimas, histonų potransliacinės modifikacijos ir nekoduojančios RNR, yra atsakingi už tikslią decidualizacijos procesų reguliaciją. Epigenetiniai modulatoriai endometriumo ciklo proliferacinės fazės metu inicijuoja genų, atsakingų už transkripcijos aktyvaciją, endometriumo audinio augimą ir angiogenezę, raišką. Sekrecinėje fazėje epigenetiniai veiksniai indukuoja genų, susijusių su atsako į hormonus, insulino signalo perdavimo keliu, decidualizacija ir embriono implantacija, raišką (Retis-Resendiz *et al.*, 2021). Manoma, kad epigenetiniai pokyčiai yra susiję su reprodukcinėmis ligomis, tokių kaip endometriumo vėžys ar endometriozė, patogenezė (Zubrzycka *et al.*, 2020; Inoue *et al.*, 2021).

Įvykus apvaisinimui, į gimdos ertmę atkeliavęs embrionas taip pat pradeda sekretuoti veiksnius, reikalingus galutinio endometriumo pasirengimo sėkmingai implantacijai užtikrinimui. Vienas pagrindinių embriono sekretuojamų veiksnių yra žmogaus chorioninis gonadotropinas (angl. *human chorionic gonadotropin*, hCG) (d'Hauterive *et al.*, 2022). hCG reguliuoja endometriumo audinio vaskuliarizacijos (Xu *et al.*, 2020), užląstelinio užpildo gamybos (Tapia-Pizaro *et al.*, 2017; Riboldi *et al.*, 2020), imunoreguliacijos (Bourdiec *et al.*, 2013), decidualizacijos (Koch *et al.*, 2018) ir implantacijos (Makrigiannakis *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2020) procesus. Priešimplantaciniu

laikotarpiu įvykę molekulinės komunikacijos pakitimai tarp motinos audinių ir embriono gali nulemti nėštumo komplikacijas, įskaitant persileidimą ar pasikartojantį implantacijos nepakankamumą (Idelevich ir Vilella, 2020; Gunther *et al.*, 2023).

Dirbant su biologiniais mėginiais laboratorijose ir klinikose svarbu išlaikyti mėginius gyvybingus tam tikrą laiką. Įprastai biologiniai mėginiai yra užšaldomi naudojant labai žemas temperatūras, kurių aplinkoje biologinės ir cheminės reakcijos yra drastiškai sulėtinamos ir toks procesas yra vadinamas giliu užšaldymu (Jang *et al.*, 2017). Audinių gilus užšaldymas yra plačiai paplitusi procedūra ypač naudojama reprodukcinės sistemos audinių (gametos, embrionai, kiaušidės) išlaikymui (Canosa *et al.*, 2023). Tai leidžia užtikrinti ilgalaikį gyvybingų biologinių mėginių prieinamumą. Neseniai publikuoti tyrimai nepatvirtino neigiamos gilaus užšaldymo įtakos audinių gyvybingumui (Fox *et al.*, 2017; Heidari-Khoei *et al.*, 2022), tačiau audinių gilaus užšaldymo ir atšildymo įtaka mėginiais vis dar kelia klausimų, susijusių su ląstelėse sukeliama molekuliniais pokyčiais, tad tolimesni tyrimai, apimantys genetinius ir epigenetinius mechanizmus, turėtų į šiuos klausimus atsakyti.

Užląstelinės puselės (angl. extracellular vesicles, EV) yra komunikacijos tarp embriono ir motinos audinių būdas užtikrinantis sėkmingą nėštumo vystymąsi (Hart *et al.*, 2022; Sui *et al.*, 2023). Endometriumo audinys sekretuoja EV, kuriuos perneša baltymus, lipidus, RNR ir miRNR į recipientines artimų audinių ląsteles, taip inicijuojant kritinius procesus endometriume implantacijos ir placentacijos metu (Beal *et al.*, 2023). Taip pat, endometriumo epitelio ląstelių sekretuojamos EV yra sėkmingai internalizuojamos besivystančios blastocistos (Segura-Benitez *et al.*, 2023). EV yra susijusios su epigenetine reguliacija, kadangi epigenetiniai veiksniai yra atsakingi už EV biogenezę ir heterogeniškumą, o EV pernešami veiksniai toliau reguliuoja recipientinių ląstelių epigenomą (Zhou *et al.*, 2024). Taigi, kuriant implantacijos modelį su endometriumo kilmės ląstelėmis ir embriono sekretuojamais veiksniais, galima tirti implantacijos metu vykstančią komunikaciją tarp motinos organizmo ir besivystančio embriono bei šio proceso sukeltus epigenetinius pokyčius, svarbius moters reprodukcinės sistemos palaikymui.

Darbo tikslas – Įvertinti endometriumo stromos ląstelių epigenetinių ir kitų molekulinį veiksnių pokyčius, svarbius ESL decidualizacijos metu.

Darbo uždaviniai:

1. Charakterizuoti iš endometriumo audinių išskirtas ESL pagal jų morfologiją, paviršiaus žymenų pokyčius ir diferenciacijos potencialo efektyvumą.
2. Įvertinti endometriumo audinio gilaus lėto užšaldymo įtaką iš tokių audinių išskirtų stromos ląstelių savybių, įskaitant proliferacijos ir diferenciacijos efektyvumą, bei molekulinį ir epigenetinių veiksnių – genų raiškos, miRNR, histonų modifikacijų ir DNR metilinimo lygio, pokyčiams.
3. Įvertinti ESL indukuotos decidualizacijos metu vykstančius bendrus epigenetinius pokyčius – DNR metilinimo, histonų modifikacijų ir miRNR lygių persitvarkymus. Nustatyti H4hyperAc modifikacijos ir DNR metilinimo lygio pokyčius su decidualizacija susijusių genų srityse.
4. Nustatyti embriono sekretuojamo veiksnio hCG poveikį ESL savybėms įskaitant genų, susijusių su decidualizacijos, epigenetinės reguliacijos, metabolizmo, apoptozės, imuninės sistemos ir implantacijos procesais, raiškos bei histonų modifikacijų pokyčiams. Nustatyti H3K27Ac modifikacijos lygio pokyčius su endometriumo funkcijos užtikrinimų susijusių genų srityse po indukuotos ESL decidualizacijos ir hCG poveikio.
5. Išanalizuoti ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR raiškos pokyčius, paveikus ląsteles decidualizacijos indukcijos ir hCG poveikiais.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė:

Šiame moksliniame darbe analizuojamos iš pacienčių endometriumo mėginių išskirtos endometriumo stromos ląstelės (ESL). Patvirtinus, kad išskirtos ESL pasižymi mezenchiminėms stromos ląstelėms (MSL) būdingomis savybėmis bei geba efektyviai decidualizuoti, vertinome epigenetinius pokyčius, vykstančius indukuotos ESL decidualizacijos metu. Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad ESL decidualizacijos metu nustatytas bendras histono H4 hiperacetilavimo (H4hyperAc) lygis specifiskai padidėja su decidualizacija susijusių genų promotoriaus srityse (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*), o DNR metilinimo lygis šiuose regionuose išlieka žemas kaip ir prieš decidualizacijos indukciją.

Darbo metu atlikti tyrimai lyginant molekulinis ir epigenetinius pokyčius, būdingus mezenchiminėms stromos ląstelėms, išskirtoms iš nešaldytų ir iš užšaldytų endometriumo audinių. Gauti rezultatai patvirtino, kad nepaisant nustatytų nežymių skirtumų gilus užšaldymas neturėjo neigiamos įtakos stromos ląstelių charakteristikoms, tokioms kaip proliferacinis aktyvumas, paviršiaus žymenų raiška, diferenciacijos potencialas ir epigenetinių veiksnių (histonų modifikacijos, DNR metilinimas ir miRNR) raiškos lygiai. Gauti rezultatai lyginant MSL, išskirtas iš nešaldytų ir šaldytų audinių, leidžia įvertinti reprodukcinę audinių saugojimo ilgą laiką labai žemose temperatūrose įtaką ląstelių savybėms ir saugų jų tolesnę panaudojimą regeneraciniame medicinoje.

Pirmą kartą įvertinome indukuotos decidualizacijos ir vieno iš pirmųjų embriono sekretuojamų veiksnių hCG įtaką ESL savybėms. Nustatėme, kad hCG poveikis ESL priklauso nuo pasirinktos hCG koncentracijos ir apima įvairius molekulinis taikinius, įskaitant histonų modifikacijas ir genų raiškos pokyčius. Išskiriant reikšmingiausius nustatytus pokyčius, mes parodėme, kad *in vitro* 10 IU/ml hCG poveikis efektyviai padidino ESL decidualizacijos žymens PRL raišką prieš tai indukavus decidualizaciją bei užslopino prouždegiminę interleukiną koduojančio *IL6* geno raišką. Taip pat mes nustatėme, kad po hCG poveikio padidėjo bendras H3K27Ac lygis, kuris specifiškai nustatytas ir patvirtintas implantacijos ir decidualizacijos procesų veiksmis koduojančių genų (*HOXA10*, *HAND2* ir *FOXO1*) promotoriaus srityse.

Atliktais tyrimais nustatėme įvairialypę decidualizacijos ir hCG poveikių įtaką ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR raiškai. Po decidualizacijos poveikio nustatėme ESL EV padidėjusius su embriono implantacija ir nėštumu susijusių baltymų (AGT, FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAM, PAPP, WNT4) kiekius, o hCG specifinis poveikis pasireiškė padidėjusiu su imuninės sistemos reguliacija susijusių baltymų (PRTN3, CXCL12) kiekiu. Analizuojant ESL EV miRNR pokyčius nustatėme, kad hCG poveikis prieš tai decidualizuotose ESL specifiškai sukėlė hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138 ir hsa-miR-3180-5p lygio padidėjimą.

Gauti rezultatai prisideda prie bendrų žinių apie epigenetinės reguliacijos svarbą ESL decidualizacijos metu bei endometriumo molekulinę veiksnių pokyčius, stimuliuojamus atsakant į embriono sekretuojamus veiksmis. Tai sudaro prielaidas galimam šių rezultatų panaudojimui nustatant endometriumo audinio kilmės taikinius teikiant rekomendacijas nevaisingumo gydymo terapijose.

Ginamieji teiginiai:

1. Histonų H4 hiperacetilavimo lygio padidėjimas, o ne DNR metilavimo pokyčiai su decidualizacija susijusių genų promotorių srityse yra susiję su šių genų aktyvavimu ESL decidualizacijos metu.
2. Endometriumo audinio gilus užšaldymas yra tinkamas ilgalaikis saugojimo būdas, nekeičiantis iš tokių audinių išskirtų mezenchiminių stromos ląstelių pagrindinių savybių, pagrindžiant tokių ląstelių pritaikymo potencialą terapijoje.
3. hCG poveikis aktyvina ESL su decidualizacija bei implantacija susijusius veiksnius, vykstant histonų modifikacijų pokyčiams bei moduliuoja ESL sekretuojamų EV miRNR pokyčius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

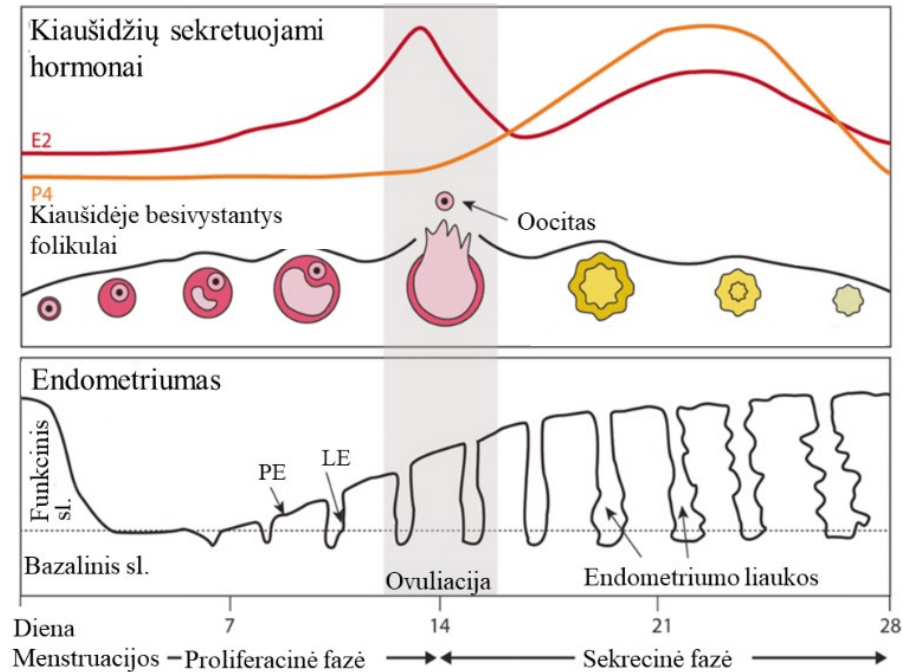
1.1. Endometriumas

Žmogaus endometriumas, tai vidinis gimdos gleivinės sluoksnis, kurio struktūra ir funkcija yra svarbi sėkmingai embriono implantacijai, placentos formavimuisi bei užsimezgdusio nėštumo palaikymui ir tolimesniam vystymuisi iki pat gimimo. Kiekvieno moters menstruacinio ciklo metu endometriume vyksta drastiški pokyčiai, kuriuos inicijuoja ir kontroliuoja kiaušidžių išskiriami hormonai, skirstomi į menstruacijas, proliferacinę ir sekrecinę fazes (1.1 pav.) (Fitzgerald *et al.*, 2021). Įprastai moters menstruacinis ciklas apima 28 dienas, tačiau gali varijuoti nuo 21 iki 35 dienų. Proliferacinė stadija trunka nuo 4 iki 14 ciklo dienų, kuomet estradiolio (E2) kiekis pradeda kilti ir didžiausia jo koncentracija yra pasiekama prieš pat ovuliaciją. E2 sukelia endometriumo liaukų ir stromos augimą, bei kraujagyslių tinklo plėtojimąsi. Po ovuliacijos prasideda sekrecinė endometriumo ciklo stadija ir trunka nuo 14 iki 28 dienos. Šios stadijos metu stebimas E2 kiekio sumažėjimas ir progesterono (P4) lygio padidėjimas, tai lemia sulėtėjusią audinio ląstelių proliferaciją ir inicijuojama ląstelių diferenciacija sekrecinių ląstelių kryptimi, taip užtikrinama tinkama aplinka embriono implantacijai ir tolimesnei nėštumo eigai. Jeigu apvaisinimas tuo metu neįvyksta, prasideda menstruacijos, kuomet endometriumas atsiskuoksnioja ir ciklas kartojasi (Reed ir Carr, 2018; Jain *et al.*, 2022).

Atsikartojantys endometriumo regeneracijos ir diferenciacijos pokyčiai menstruacinio ciklo metu nepriklausomai nuo užsimezgdusio nėštumo yra, ne tik žmonių rūšiai, bet ir keletui primatų rūšių – dygliuotosioms pelėms, drambliniams kirstukams ir kelioms šikšnosparnių rūšims, būdinga savybė. Keliamos hipotezės, kad evoliucionuojant skirtingoms žinduolių rūšims spontaninė audinio diferenciacija galėjo atsirasti nepriklausomai, arba kaip atsakas padedantis motinos organizmui apsiginti nuo invazyvių vaisiaus audinių, bei užtikrinti tik geros kokybės embrionų atranką (Emera *et al.*, 2012). Nors anksčiau didžiausias dėmesys reprodukciniėje medicinoje tekdavo embriono kokybei, dabar jau yra plačiai pripažįstama, kad ne tik blastocista, bet ir endometriumas, vaidina svarbų vaidmenį nėštumo formavimuisi. Tokia nuostata susiformavo dėl to, kad nepaisant tobulėjančių embriologijos ir embriono pernešimo technologijų atliekant pagalbinio apvaisinimo procedūras, pastojimo efektyvumas vis dar išlieka pakankamai mažas (Ombelet *et al.*, 2016; Katagiri *et al.*, 2023).

Žmogaus endometriumas struktūriškai skirstomas į du sluoksnius: viršutinį funkcinį ir apatinį bazalinį (1.1 pav.). Funkcinis sluoksnis reikalingas

suformuojant optimalią aplinką implantacijai ir embriono augimui, tačiau menstruacijų metu yra pilnai pašalinamas. Po menstruacijų, proliferacinės stadijos metu šis sluoksnis yra regeneruojamas vykstant liaukų, stromos ir kraujagyslių atsistatymui. Bazalinis sluoksnis ciklo metu nekinta ir duoda pradžią funkcinio sluoksnio atsistatymui (Evans *et al.*, 2016).



1.1 pav. Endometriumo pokyčiai menstruacinio ciklo metu. Menstruacijų ciklas yra skirstomas į menstruacijas, proliferacinę ir sekrecinę fazes. Proliferacinės fazės metu kiaušidėje esantis folikulus auga ir gamina estradiolį (E2), kuris skatina funkcinio endometriumo sluoksnio proliferaciją. Ciklo viduryje įvyksta ovuliacija, kuomet folikulus plyšta ir išlaisvinamas oocitas. Po to, prasideda sekrecinė stadija kontroliuojama progesterono (P4), kuris skatina audinio diferenciaciją (decidualizacija) siekiant pasiruošti implantacijai. Stadijos pabaigoje P4 kiekis krenta ir prasideda menstruacijos, funkcinis sluoksnis atsisluoksniuoja ir ciklas kartojasi. PE – paviršinis epitelis, LE – liaukinis epitelis (pagal Chumduri ir Turco, 2021; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

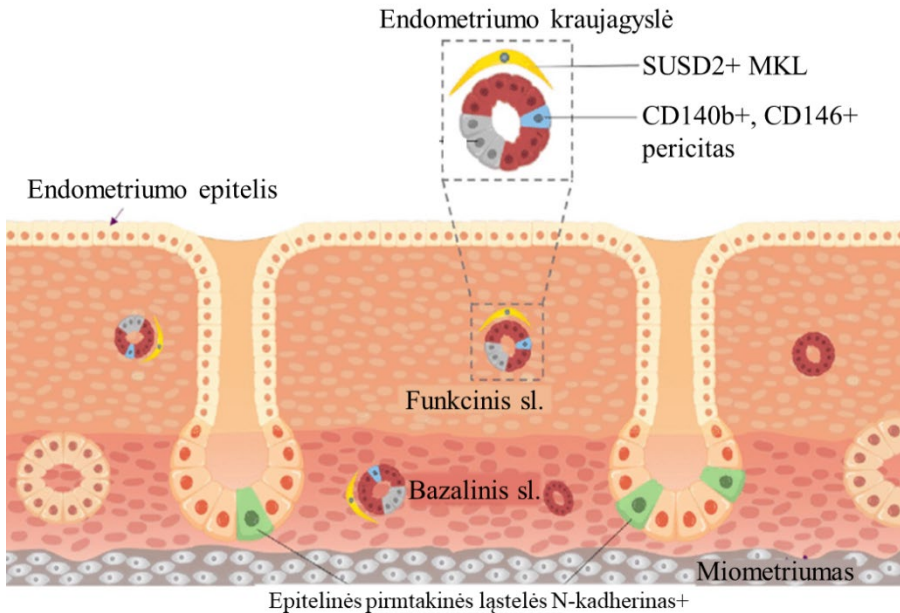
Į gimdos ertmę nukreiptas endometriumo paviršius yra sudarytas iš vienasluoksnio pseudostratifikuoto (t.y. vieno sluoksnio, bet ne vienodo aukščio ląstelių) paviršinio epitelio, prie kurio įvyksta pirminis blastocistos trofoblasto (išorinis ląstelių sluoksnis gaubiantis embrioną) prisikabinimas. Epitelio audinio invaginacijos formuoja susisukusias ir šiek tiek šakotas liaukas, kurios tęsiasi nuo paviršiaus nukreipto į gimdos ertmę iki

miometriumo sluoksnio (1.2 pav.). Endometriumo liaukos ir jų sekretas yra kritiškai svarbūs nėštumo įsitvirtinimui, taip pat užtikrinant liaukinio epitelio ir stromos ląstelių sąveiką, kuri būtina sėkmingai audinio diferenciacijai ir placentos formavimuisi (Fitzgerald *et al.*, 2021). Stromos ląstelės kartu su užląsteliniais užpildu formuoja pagrindą paviršiniam ir liaukiniam epitelio sluoksniams. Be to, endometriumo audinyje taip pat yra kraujagyslių, kuriomis audinys aprūpinamas deguonimi ir maistinėmis medžiagomis, ir imuninės sistemos ląstelių, dalyvaujančių blastocistos implantacijoje (Kelleher *et al.*, 2019).

Analizuojant endometriumo audinį kompleksiskai, nėra lengva išskirti skirtingų audinių sudarančių ląstelių charakteristikas. Tačiau pasitelkus pavienių ląstelių (*angl.* single-cell) technologijas, galima išanalizuoti audinius sudarančius skirtingus ląstelių tipus, vystymosi kryptis ir net tarpląstelinius ryšius. Išanalizavus endometriumo audinio mėginius naudojant mikroskopsčių technologiją, identifikuoti septyni pagrindiniai ląstelių tipai: epitelinės, endotelinės, stromos fibroblastai, makrofagai, limfocitai ir lygiųjų raumenų tipo ląstelės, kurioms priskiriamos ir endometriumo ląstelės su mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) charakteristikomis (Wang *et al.*, 2020). Wang ir kolegų tyrimo metu taip pat palyginti mėginiai surinkti skirtingais menstruacinio ciklo etapais. Rezultatai atskleidė, kad kai endometriumas yra pasirengęs priimti embrioną, laikotarpiu dar vadinamu implantaciniu langu, epitelyje įvyksta staigus ir nepertraukiamas transkripcijos aktyvavimas. Endometriumo diferenciacijos procesas prasideda stromos dalyje dar prieš implantacijos lango pradžią. Tokiu būdu taip pat pademonstruota tiesioginė stromos fibroblastų ir limfocitų sąveika, vykstant audinio diferenciacijai (Wang *et al.*, 2020). Tad endometriumo audinį sudarančių skirtingų ląstelių tiek nepriklausoma, tiek ir tarpusavio sąveika yra reikalinga sėkmingam endometriumo funkcionavimui.

Endometriumo kasmėnesiniam atsinaujinimui reikalingas kamieninių ląstelių rezervas audinyje. Nustatyti keli endometriumo kamieninių/pirmtakinių ląstelių tipai: CD140b⁺ CD146⁺ mažai diferencijuotos jungiamojo audinio ląstelės, dar vadinamos pericitais, SUSD2⁺ endometriumo mezenchiminės kamieninės ląstelės (eMKL) (Chan *et al.*, 2023) ir N-kadherinas⁺ endometriumo epitelinės pirmtakinės ląstelės (EPL). Pericitai ir eMKL aptinkamos šalia kraujagyslių ir dalyvauja angiogenezėje bei stromos atsinaujinime. Žmogaus endometriumo EPL lokalizuojasi liaukų apatinėje dalyje bazaliniame endometriumo sluoksnyje (1.2 pav.) ir yra atsakingos už paviršinio ir liaukinio epitelio sluoksnio atsistatymą (Counsins *et al.*, 2018). Taigi skirtingos kamieninių/pirmtakinių ląstelių grupės aptinkamos endometriumo audinyje, dažniausiai bazaliniame

sluoksnyje, užtikrina audinio gebėjimą atstatyti per menstruacijas pašalintą funkcinį sluoksnį.



1.2 pav. Endometriumo audinio sandara ir kamieninių/pirmtakinių ląstelių lokalizacija. Endometriumas sudarytas iš paviršinio ir liaukas formuojančio epitelio bei stromos, kuri siejasi su miometriumu. N-kadherinas+ pasižyminčios epitelinės pirmtakinės ląstelės aptinkamos endometriumo liaukų apatinėje dalyje bazaliniame endometriumo sluoksnyje. Pericitai (CD140b+, CD146+) aptinkami prie kraujagyslių bazinės membranos šalia endotelinių ląstelių. SUSD2+ endometriumo mezenchiminės kamieninės ląstelės (eMKL) išsidėsto aplink kraujagysles. Funkcinis sluoksnis ciklo eigoje atsiskuoksnioja ir iš naujo atsistato, o bazalinis sluoksnis yra pastovus (pagal Song *et al.*, 2021; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.2. Endometriumo stromos ląstelės

Endometriumo stromos ląstelės (ESL) atitinka minimalius Tarptautinės ląstelių ir genų terapijos asociacijos (angl. *International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT)*) keliamus reikalavimus, leidžiant jas charakterizuoti kaip įvairiagales MSL (Viswanathan *et al.*, 2019). ESL kultivuojamos geba prikibti prie plastikinių auginimo indų paviršiaus, pasižymi CD105, CD73 ir CD90 paviršinių žymenų raiška, ir nepasižymi CD45, CD34, CD14, CD19 ir HLA-DR žymenų raiška (Zlatska *et al.*, 2017; Queckborner *et al.*, 2020). ESL geba *in vitro* diferencijuotis į mezenchiminės kilmės audinių linijas – osteogenine, adipogenine ir chondrogenine ląstelių vystymosi kryptimis (Chen *et al.*, 2017; Zlatska *et al.*, 2017; Queckborner *et al.*, 2020).

Taip pat buvo palyginta ir pademonstruota, kad ESL pagal savo ląstelių paviršiaus žymenų fenotipą yra panašios į kaulų čiulpų MSL bei pasižymi kamieniškumo genų raiška ir yra klonogeniškos (Ruiz-Magana *et al.*, 2022). Kultivuojamos ilgą laiką ESL išlaiko chromosomas nepakitusias, taip pat šios ląstelės nėra tumorogeniškos (Queckborner *et al.*, 2020). ESL ląstelinio senėjimo procesų aktyvavimas yra susijęs su kamieniškumo sumažėjimu ir audinio receptyvumo funkcijos praradimu (Tomari *et al.*, 2020). Siekiant įvertinti MSL būdingą atsaką į uždegiminius procesus, ESL ląstelės buvo veikiamos gama interferonu (angl. *Interferon gamma*, *IFN-γ*) ir naviko nekrozės veiksmu (angl. *Tumor necrosis factor*, *TNF*), taip aktyvuojant imunoreguliacinių veiksnių sekreciją ir suformuojant priešuždegiminį fenotipą, tačiau stimuliuotos ESL nepasižymėjo išaugusia II klasės HLA molekulių raiška. ESL taip pat slopino CD4⁺ T ląstelių proliferaciją bei aktyvumą, o ESL sekretomas sumažino centrinių atminties T ląstelių aktyvumą, aktyvindamas efektorines atminties ląsteles (Queckborner *et al.*, 2020). Taigi nors ESL pasižymi įprastomis MSL charakteristikomis, šių ląstelių atsakas į uždegiminius veiksmus skiriasi nuo kitų MSL rūšių, tačiau toks atsakas yra svarbus endometriumo audinio specifikai užtikrinant audinio atsistatymą ir imunotoleranciją nėštumo metu.

ESL gali būti išskiriamos iš endometriumo audinio mėginio, šį pirmiausia mechaniškai susmulkinant skalpeliu ir tada fermentiškai suskaidant naudojant kolagenazę. Susidariusi ląstelių suspensija yra filtruojama pro filtrą, siekiant atskirti epitelines ląstelių struktūras nuo stromos ląstelių. Kultivuojant surinktą filtratą atitinkamoje terpėje išgryninama pirminė ESL kultūra, kuri gali būti toliau naudojama norimiems procesams analizuoti (Michalski *et al.*, 2018). Taip pat funkcionalūs endometriumo stromos fibroblastai gali būti sėkmingai gaunami diferencijuojant žmogaus embrionines kamienines ląsteles ar indukuotas pliuripotentes kamienines ląsteles atitinkamais veiksniais imituojant *in vivo* organogenezės metu endometriumo vystymosi stadijas (Cheung *et al.* 2021). Skirtingų pacientų ir imortalizuotos ESL linijos palygintos Li ir kolegų tyrimo metu atliekant pavienių ląstelių RNR sekvenavimo analizę, ir rezultatai atskleidė, kad nors analizuotos ląstelių linijos pasižymėjo konservatyviomis ląstelių grupėmis, tačiau nustatyta ir skirtingi ląstelių klasteriai būdingi kiekvienai ląstelių linijai. Individualūs skirtumai nustatyti lyginant skirtingų pacientų ESL, tačiau labiausiai išsiskyrė imortalizuotos ląstelių linijos (Li *et al.*, 2022). Taigi, ESL gali gana paprastai būti išgaunamos iš sąlyginai lengvai prieinamų organizmo audinių, o aptinkami skirtumai tarp ESL linijų atspindi biologinę įvairovę tarp pacientų, bei patvirtina, kad imortalizuotos ląstelių linijos yra labiausiai pakitusios.

1.3. Decidualizacija

Atkrantinčioji gimdos gleivinė (lot. *Decidua*) yra gimdos audinys, kuris nėštumo pradžioje apsaugo besivystantį embrioną nuo motinos organizmo imuninių ląstelių ir aprūpina jį maistinėmis medžiagomis iki tol, kol susiformuoja placenta (Mori *et al.*, 2016). *Decidua* audinys yra būdingas tik žinduoliams, tarp jų ir žmogui, nėštumo metu formuojantiems hemochorioninę placenta. Hemochorioninė placenta susidaro vaisiaus choriono gaureliams išsiskverbiančioms į gimdos gleivinę ir suardant motinos kraujagysles, taip užtikrinant, kad gaureliai yra tiesiogiai apsupti motinos kraujo (Soares *et al.*, 2018). Antroje menstruacinio ciklo pusėje, po ovuliacijos, nykstantis folikulas kiaušidėje pradeda sekretuoti P4 ir nepriklausomai nuo apvaisinimo, prasideda endometriumo diferenciacijos procesas vadinamas decidualizacija, kurios metu pailgos formos ESL diferencijuoja į specializuotas sekrecines ląsteles (Okada *et al.*, 2018). Jeigu nėštumas neužsimezga, ciklo pabaigoje endometriumo funkcionalus sluoksnis atsiskuoksnioja ir pasišalina, tačiau jeigu blastocista implantuojasi, decidualizacijos procesas tęsiasi ir galutinai susiformuoja decidualinis audinys (Ruiz-Magana *et al.*, 2022). Decidualizuotų stromos ląstelių transkriptomikos analizė atskleidė, kad decidualizacijos stimulus paveikia įvairius genų, kurių koduojamų baltymų funkcijos priskiriamos ląstelės ciklo reguliavimui, citoskeleto persitvarkymui, angiogenezei, imuninio atsako reguliacijai, oksidacinio streso atsakui, jonų ir vandens transportui, atsakui į steroidinius hormonus, užląstelinio užpildo pertvarkymui, transkripcijos reguliacijai, epigenetiniams profiliams, potransliacinėms modifikacijoms, bei augimo veiksnių, citokinų ir chemokinų signaliniams keliams, raiškiai (Salker *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2020). Taigi, endometriumo audinio decidualizacijos metu vykstantys struktūriniai ir funkciniai pokyčiai yra būtini suformuojant tinkamą pagrindą embriono implantacijai.

Decidualizacijos eigoje ESL vyksta mezenchiminis-epitelinis virsmas, kurio metu pakinta ląstelių morfologija ir funkcinės savybės. Paveikti hormonų ir kitų veiksnių, endometriumo stromos fibroblastai pirmiausia įgauna epitelines savybes, tokias kaip citoplazmos tūrio išsiplėtimas, bei šiurkščiojo endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso padidėjimas, kurie reikalingi suaktyvėjusiai ląstelių sekrecijai užtikrinti. Taip pat decidualizacijos metu stebimas branduolio suapvalėjimas, jungiamųjų baltymų, užtikrinančių tarpląstelinę komunikaciją, kiekio padidėjimas, bei citoskeleto persitvarkymas (Kajihara *et al.*, 2014; Gellersen ir Brosens, 2014). Vėliau, vykstant embriono implantacijai, tiek motinos audinio, tiek embriono išskirtos signalinės molekulės lemia išorinio epitelio ir decidualizuotos

stomos ląstelių mezenchiminių charakteristikų susigražinimą, taip padidinant ląstelių migracines savybes ir sukuriant tinkamas sąlygas trofoblasto invazijai (Owusu-Akyaw *et al.*, 2019). Taigi, endometriumo ciklo metu vyksta mezenchimis-epitelinis ir epitelinis-mezenchiminis virsmas, taip užtikrinamas šio audinio plastiškumas, būtinas reprodukcinės funkcijos išlaikymui.

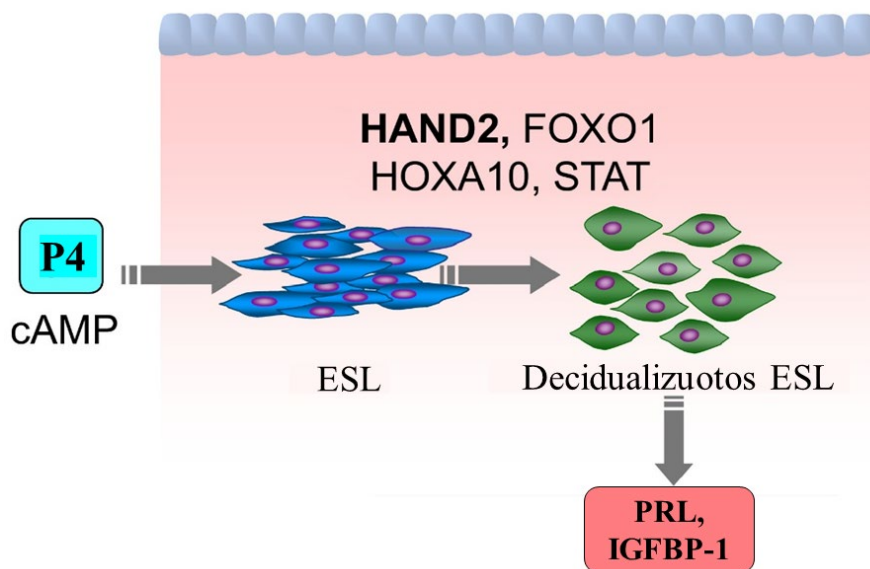
Kiaušidžių sekretuojami lytiniai hormonai (E2 ir P4) yra endometriumo decidualizacijos „varomoji jėga“. Pirmiausia proliferacinės fazės metu E2 sekrecija indukuoja progesterono receptoriaus (PR) raišką, kad sekrecinės stadijos metu endometriumas būtų pakankamai reaktyvus į išaugusį P4 kiekį (Okada *et al.*, 2018). Poovuliaciniu etapu pradėtas sekretuoti P4 jungiasi prie branduolyje esančių PR, kurių aktyvacija užtikrina endometriumo audinio homeostazę, reikalingą nėštumo palaikymui. Didžiausia PR raiška nustatoma ESL sekrecinės stadijos ir nėštumo metu, o endometriumo epitelinėse ląstelėse šio receptoriaus raiška po ovuliacijos pradeda mažėti (Okada *et al.*, 2018). Taigi, E2 ir P4 yra pagrindiniai endometriumo decidualizacijos indukcijos veiksniai.

Decidualizacijos signalo perdavimo kelias susideda iš gana konservatyvių veiksmų įtraukimo. Pirmiausia P4 aktyvuoja ciklinio adenozino monofosfato (cAMP) signalinį kelią, nors buvo pademonstruota, kad decidualizacijos metu P4 aktyvuoja tam tikrą, su decidualizacija susijusių, genų raišką ir nepriklausomai nuo cAMP (Okada *et al.*, 2018). cAMP yra plačiai paplitusi antrinė signalinė molekulė, kurios pagrindinis taikinytis yra nuo cAMP priklausoma proteinkinazė K (PKA), kurią aktyvavus, toliau perduodamas signalas fosforilinant taikininis molekules. Pagrindiniai PKA fosforilinimo taikiniai branduolyje yra transkripcijos reguliatoriai CREB ir CREM, kurie dimerizuojasi ir prikimba prie cAMP atsako elemento srities DNR sekoje, bei pritraukia baltymą CBP, kuris pasižymi histonų acetiltransferaziniu veikimu ir moduliuoja chromatino prieinamumą transkripcijos veiksmams (Gellersen ir Brosens, 2003). P4 ir cAMP aktyvuoja tolimesnius kritinius ESL decidualizacijos proceso veiksmus, tokius kaip HOXA10, FOXO1, HAND2 ir STAT (1.3 pav.) (Ujvari *et al.*, 2017; Okada *et al.*, 2018). HOXA10 yra atsakingas ne tik už gimdos vystymąsi embriogenezės metu, bet ir optimalų funkcionavimą suaugusiame organizme įskaitant implantacijos, decidualizacijos ir imunoreguliacijos procesus (Ashary *et al.*, 2020; Ekanayake *et al.*, 2022). STAT paralogai yra taip pat dominuojantys veiksniai ankstyvoje decidualizacijos indukcijos stadijoje, kadangi STAT5A ir STAT5B geba sustiprinti *PRL* promotoriaus aktyvavimą (Mak *et al.*, 2002; Rytönen *et al.*, 2019). Transkripcijos veiksnio FOXO1 padidėjusi raiška ESL sukelia ląstelės ciklo stabdymą ir inicijuoja perėjimą į diferenciacijos būseną (Vasquez *et al.*, 2015). HAND2 yra transkripcijos veiksnys, kurio raiška taip

pat padidėja decidualizacijos metu (Huyen *et al.*, 2011). Manoma, kad HAND2 reguliuoja endometriumo imunotoleranciją reikalingą embriono implantacijai (Murata *et al.*, 2020). Reguliacinis HAND2 vaidmuo ESL decidualizacijos metu nustatytas parodant, jog nuslopinus HAND2 raišką ESL P4 indukuotos decidualizacijos metu, reikšmingai sumažėjo su decidualizacija susijusių genų raiška, taip pat HAND2 nuslopinimas lėmė sumažėjusį ir FOXO1 baltymo kiekį (Cho *et al.*, 2013). WNT4, kurio raiška išauga decidualizacijos metu, taip pat yra svarbus embriono implantacijos ir decidualizacijos proceso reguliatorius, ir buvo pademonstruota, kad jo raiškos užslopinimas sumažina decidualizacijos žymenų transkripciją (Zhang *et al.*, 2021). Taigi decidualizacijos indukcija ESL sukelia viduląstelinio cAMP kiekio padidėjimą, taip aktyvuojant šios signalinės molekulės taikinių genų raišką.

Pagrindiniai decidualizacijos metu sintetiniai ir į aplinką sekretuojami baltymai yra prolaktinas (PRL) ir insulino tipo augimo veiksnį jungiantis baltymas 1 (angl. *insulin-like growth factor-binding protein 1*, IGFBP-1) (1.3 pav.). PRL, kurio pagrindinė funkcija yra inicijuoti ir palaikyti laktaciją bei nėštumo eigą, yra gaminamas ne tik hipofizės ląstelių, bet ir kitose organizmo vietose, įskaitant endometriumą ir miometriumą. Gimdoje PRL sekretuoja decidualizuojančios stromos ląstelės ir jis pradamas sekretuoti dar prieš blastocistos implantaciją (Auriemma *et al.*, 2020). IGFBP-1 yra kitas intensyviai endometriumo sekretuojamas decidualizacijos žymuo, kurio pagrindinė funkcija yra prisijungti į insuliną panašų augimo faktorių (angl. *Insulin-like growth factor*, IGF) (Allard ir Duan, 2018). IGFBP-1 sąveikaudamas su ESL membranoje esančiais integriniais toliau indukuoja decidualizacijos procesą (Matsumoto *et al.*, 2008). Tad PRL ir IGFBP-1 sekrecijos išaugimas patvirtina decidualizacijos proceso indukavimą.

Decidualizacijos procesas yra susijęs ne tik su stromos ląstelių diferenciacija, bet ir kitais endometriumo audinyje vykstančiais pokyčiais. Implantacijos metu embriono trofoblasto ląstelės sekretuoja metaloproteinazes, kurių taikynys – užląstelinio užpildo baltymai endometriumo audinyje, o decidualizuojančios stromos ląstelės sekretuoja metaloproteinazių slopiklius, taip užtikrinamas reikiamas balansas tarp blastocistos invaziją skatinančių ir slopinančių procesų, reikalingų sėkmingam pastojimui (Estella *et al.*, 2012). Histologiškai analizuojant endometriumo pokyčius, taip pat nustatyta, kad decidualizacijos metu drastiškai išauga imuninių ląstelių infiltracija į audinį, įskaitant CD56+ CD16-NK ląsteles, CD163+ makrofagus, T limfocitus ir dendritines ląsteles (Liu *et al.*, 2020). Taigi, endometriumo decidualizacijos procesas apima ir užląstelinio užpildo bei imuninių ląstelių reguliaciją.



1.3 pav. ESL decidualizacija. Progesteronas (P4) kartu su cAMP reguliuoja HAND2, FOXO1, HOXA10 ir STAT raišką inicijuodami žmogaus ESL decidualizaciją. Decidualizacijos metu pakinta ląstelių morfologija ir funkcija, bei yra aktyvinama decidualizacijos žymenų, tokių kaip PRL ir IGFBP-1 raiška (pagal Okada *et al.*, 2018; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

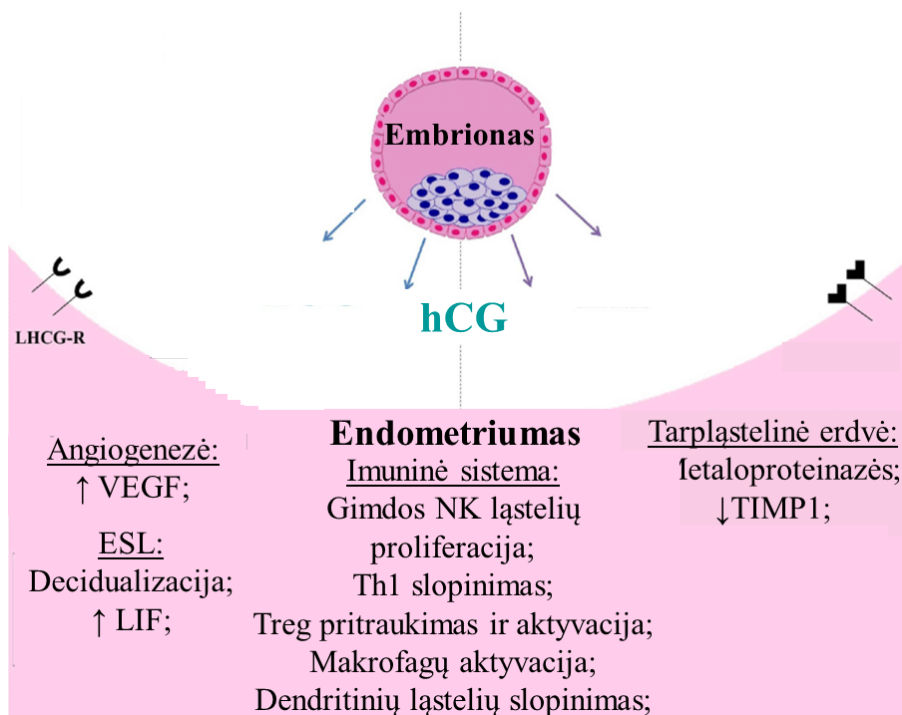
1.4. Žmogaus chorioninis gonadotropinas

Žmogaus chorioninis gonadotropinas (hCG) yra vienas pirmųjų hormoninių signalų, kurį prieš implantaciją sekretuoja blastocistos trofoblasto ląstelės (d'Hauterive *et al.*, 2022). hCG tiesiogiai reguliuoja endometriumo persitvarkymus, reikalingus sėkmingai embriono implantacijai. Vėliau vystantis nėštumui, besiformuojanti placenta taip pat pradeda dideliais kiekiais sekretuoti hCG, kurio koncentracija motinos kraujyje gali būti nustatoma jau 10 dieną po apvaisinimo. hCG užtikrina nuolatinę P4 gamybą, reikalingą nėštumo palaikymui (Makrigiannakis *et al.*, 2017). Nustatyta, kad ir pačios endometriumo ląstelės sekrecinės fazės metu gamina ir sekretuoja hCG (Schug *et al.*, 2019).

hCG tiesiogiai reguliuoja endometriumo ląstelines procesus keliais skirtingais veikimo mechanizmais (1.4 pav). Pirmiausia hCG geba padidinti metaloproteinazių raišką tuo pačiu sumažinant jų inhibitoriaus TIMP1 sekreciją, taip pertvarkoma endometriumo audinio užląstelinė aplinka ir gimdos gleivinė paruošiama trofoblasto invazijai (Fluhr *et al.*, 2008; Tapia-Pizarro *et al.*, 2013; Riboldi *et al.*, 2020). Įvertinus morfologinius ir funkcinius pakitimus buvo patvirtinta, kad hCG skatina ESL decidualizacijos procesus ir

audinio angiogenezė (Makrigiannakis *et al.*, 2017; Koch *et al.*, 2018; Riboldi *et al.*, 2020). Be to, hCG geba sukelti endometriumo receptyvumo žymens HOXA10 raiškos padidėjimą (Zhu *et al.*, 2020). Taip pat parodyta, kad po hCG poveikio padidėja decidualizacijos veiksnio LIF raiška, kurio didžiausias kiekis endometriume nustatomas implantaciniu laikotarpiu (Lee *et al.*, 2022). Nustatyta, jog hCG poveikis endometriumo ląstelėse padidina kraujagyslių endotelinio augimo veiksnio (angl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*) iRNR kiekį (Xu *et al.*, 2020). Tačiau įvertinus hCG stimuliuotų ESL sekretomo angiogenezę reguliuojantį poveikį, buvo nustatyta, kad hCG sukėlė atsaką, kuris slopino endotelinų ląstelių kapiliarų struktūrų formavimąsi (Riboldi *et al.* 2020). Taigi, vykstant grįžtamajam atsakui, po hCG poveikio padidėja ESL veiksnių, kurie slopina tiesioginį hCG endometriumi sukeltą angiogenezę skatinantį poveikį, sekrecija. Be to, hCG yra svarbus suformuojant motinos organizmo imunotoleranciją embrionui, kontroliuojant imunines ląsteles implantacijos metu įskaitant T limfocitus, makrofagus bei gimdos NK ląsteles (Makrigiannakis *et al.*, 2017). Analizuojant hCG įtaką imuniniams veiksniams, didžiausias poveikis nustatytas monocitų pritraukiančių chemokinių raiškai (Bourdiec *et al.*, 2013). Tad apibendrinant, hCG poveikis endometriumi pasireiškia per užląstelinio užpildo pertvarkymo, angiogenezės, decidualizacijos, receptyvumo ir imunoreguliacijos procesų reguliaciją.

hCG parakrininis signalo perdavimo kelias vyksta per liuteinizuojančio hormono ir chorioninio gonadotropino receptorių (LHCGR). Šie receptoriai yra aptinkami endometriumo audinyje tiek epitelinėse, tiek stromos ląstelėse ir jų raiška pasiekia aukščiausią lygį sekrecinės endometriumo ciklo fazės metu (Tapia-Pizarro *et al.*, 2017; Sacchi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). LHCGR priklauso su G baltymu susijusių receptorių šeimai ir signalas yra perduodamas sugeneruojant cAMP molekulę, kuri aktyvina proteinazę K arba Epac, toliau fosforilinant Erk1/2. Taip pat nustatyta, kad hCG signalas priklausomai nuo Erk1/2 fosforilinimo lygio lėmia laikinai padidėjusią PR raišką (Tapia-Pizarro *et al.*, 2017). Tačiau taip pat yra duomenų nurodančių, kad tik labai maža endometriumo stromos ląstelių populiacija pasižymi LHCGR raiška, ir kad aktyvavus šį receptorių cAMP lygio ir decidualizacijos žymenų raiškos padidėjimas nebuvo reikšmingas (Mann *et al.*, 2022). Kito tyrimo metu nustatyta, kad ilgai trunkantis mažos hCG dozės poveikis sukelia LHCGR slopinimą endometriumo epitelinėse ląstelėse (Evan ir Salamonsen, 2013). Nepaisant paskelbtų prieštaringų rezultatų, tyrimai, kurie mechanistiškai pademonstravo LHCGR vaidmenį ESL, neleidžia atmesti fakto, kad šis receptorių yra įsitraukęs į hCG signalo perdavimo kelią endometriumo audinyje.



1.4 pav. Embriono sekretuojamo hCG įtaka skirtingoms endometriumo sritims. hCG skatina morfologinius ir funkcinius ESL pokyčius decidualizacijos metu, taip pat kontroliuoja LIF sekreciją. hCG aktyvina angiogenezę ir kraujotakos signalinių molekulių sintezę. hCG kontroliuoja gimdos NK ląsteles, T limfocitus, makrofagus bei dendritines ląsteles ir veikia per endometriumo audinyje aptinkamą receptorių LHCG-R (pagal Polese *et al.*, 2014; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Prieštaringi duomenys paskelbti ir tyrimuose analizuojančiuose hCG injekcijų į gimdą naudą pastojimo efektyvumui, kurios yra atliekamos prieš pagalbinio apvaisinimo procedūras. Nors remiantis dauguma tyrimų patvirtina hCG teigiamą įtaką sėkmingų pastojimų dažniui (Liu *et al.*, 2019; Bielfeld *et al.*, 2019; Wadhwa ir Rani, 2021; Jahanshahi *et al.*, 2022), paskelbti keli tyrimai, kurie hCG naudos reprodukcijos efektyvumo padidėjimui nenustatė (Shiotani *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2018; Abdallah *et al.*, 2021). Tokie rezultatų skirtumai tarp tyrimų galimai atsiranda dėl naudojamų procedūrų protokolų ir hCG koncentracijų skirtumų. Nepaisant to, buvo pademonstruota, kad atliekant hCG injekcijas į moters gimdą yra indukuojama endometriumo liaukinio epitelio ir stromos dalių tarpusavio sinchronizacija (Strug *et al.*, 2016). Prieštaringi rezultatai tarp paskelbtų publikacijų atskleidžia tolimesnių tyrimų, išsamiau analizuojančių hCG koncentracijų įtaką endometriumo ląstelėms, poreikį.

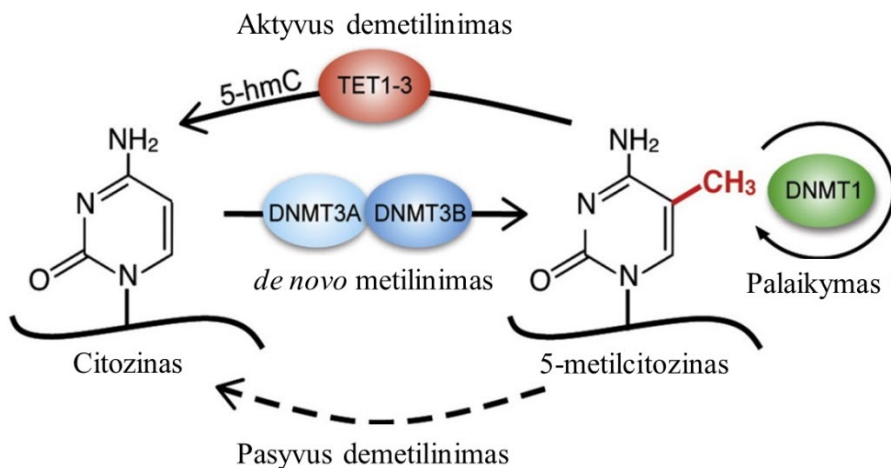
1.5. Epigenetiniai pokyčiai endometriumo ciklo metu

Epigenetika tiria paveldimus genų raiškos reguliacijos būdus, kurie nekeičia pačios DNR sekos (Dupont *et al.*, 2009). Epigenetiniai mechanizmai reguliuoja genų raišką ir dalyvauja apsprendžiant įvairias fundamentalias ląstelių funkcijas, taip pat gali būti įvairių ligų patogenezės priežastys. Pagrindiniai keturi epigenetiniai mechanizmai yra DNR metilinimas, histonų potransliacinės modifikacijos, chromatinio struktūros pokyčiai bei nekoduojančios RNR (Wu *et al.*, 2023). Vykstant endometriumo ląsteliniam persitvarkymams keičiasi didelio kiekio genų raiška, taip suformuojant pakitusį audinio fenotipą. Epigenetinių veiksnių reguliuojamas chromatinio persitvarkymas yra ir endometriumo ciklo pokyčių varomoji jėga (Retis-Resendiz *et al.*, 2021).

1.5.1. DNR metilinimas

DNR metilinimas yra cheminė DNR grandinės modifikacija, kurios metu metilo grupė yra pernešama ant penktos citozino anglies taip susiformuojant 5-metilcitozinui (1.5 pav.). DNR metilinimas, kurį atlieka DNR metiltransferazės (DNMT), genų promotorių srityse reguliuoja genų raišką neleidžiant prisijungti transkripcijos veiksniams arba pritraukiant baltymus, dalyvaujančius genų raiškos slopinime, o baltymus koduojančių sričių metilinimas, yra susijęs su intensyvesne genų raiška (Moore *et al.*, 2013; Parveen ir Dhawan, 2021). DNMT1 yra atsakingas už palaikomąjį, po replikacijos vykstantį naujos grandinės metilinimą, o DNMT3A ir DNMT3B yra *de novo* metiltransferazės (Ambrosi *et al.*, 2017). Manoma, kad endometriumo ciklo metu vykstantys DNR metilinimo pokyčiai yra tik endometriumo audiniui būdinga savybė, kadangi palyginus skirtingų menstruacijų ciklo stadijų metu surinktus endometriumo mėginius buvo nustatyti DNR metilinimo profilio skirtumai, o tokie pat pokyčiai nebuvo stebėti testuojant tais pačiais laiko etapais surinktus kraujo mėginius (Saare *et al.*, 2016; Mortlock *et al.*, 2019). Tyrimų su pirminėmis ESL kultūromis metu nustatyta, kad, kiaušidžių sekretuojami hormonai, E2 ir P4 geba modifikuoti DNR metilinimą šiose ląstelėse (Houshdaran *et al.*, 2020). Taip pat parodyta, kad ir DNR metilinimą katalizuojančių DNMTazių raiška kinta endometriume ciklo metu (Retis-Resendiz *et al.*, 2021), o *in vitro* tyrimo metu parodyta, kad E2 kartu su P4 sukelia DNMT1 raiškos sumažėjimą ESL (Mahajan *et al.*, 2020). Kiti svarbūs veiksniai DNR metilinimo procese yra TET fermentai, atsakingi už metilo grupės aktyvų pašalinimą (1.5 pav.). TET baltymai yra metilcitozino dioksigenazės, katalizuojančios metilintos grupės

hidroksilinimą, kuri toliau yra oksiduojama ir pašalinama iš DNR grandinės pakeičiant nauju nemetilintu citoziniu (Wu ir Zhang, 2017). TET1 ir TET3 iRNR kiekis reikšmingai padidėja sekrecinės fazės viduryje lyginant su kitais endometriumo ciklo etapais (Mahajan *et al.*, 2020). DNR metilinimo įtaka sutrikusiai endometriumo funkcijai buvo nustatyta parodžius, jog pakitęs tam tikrų genomo sričių, tokių kaip imuninės sistemos ir G baltymą aktyvuojančių genų, metilinimas yra susijęs su endometriumo receptyvumo sumažėjimu pasikartojančio implantacijos nepakankamumo atveju (Pathare ir Hinduja, 2020). Taigi, DNR metilinimo pokyčiai yra aptinkami skirtingose cikliškai kintančio endometriumo stadijose ir yra susiję su audinio funkcionalumu.



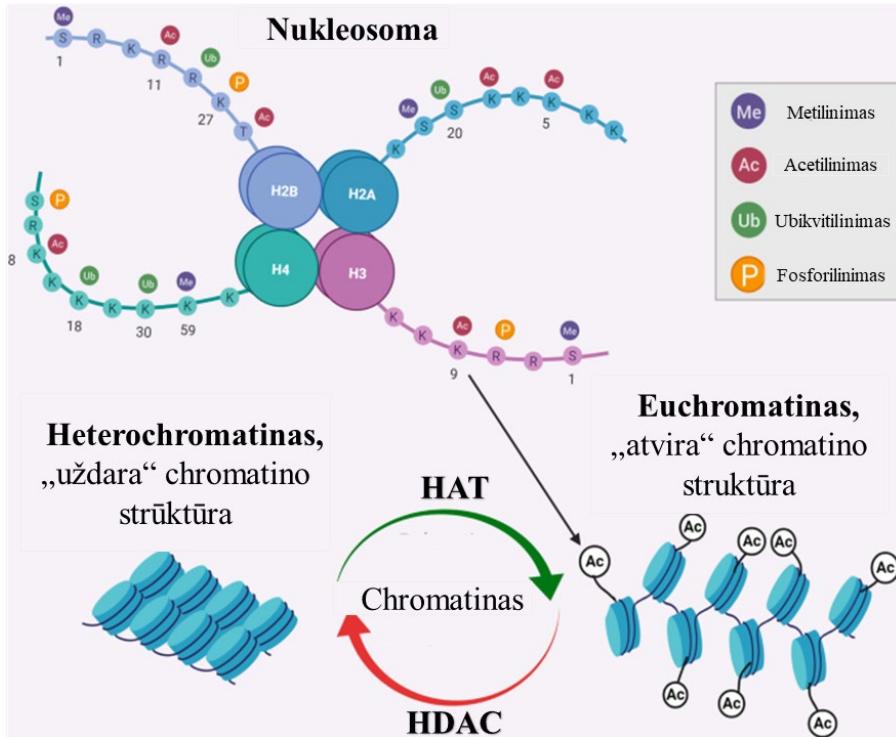
1.5 pav. DNR metilinimo proceso schema. Eukariotuose DNR metilinimas vyksta ties citozino penktu anglies atomu. *De novo* metilo grupės pernešimą katalizuoja DNMT3A ir DNMT3B, o po DNR replikacijos metilinimo lygį palaiko DNMT1. Demetilinimas gali būti pasyvus, kuomet ląstelei dalijantis nėra užtikrinamas naujos grandinės metilinimas, arba aktyvus. Aktyvaus DNR metilinimo metu TET1-3 baltymai oksiduoja 5-metilcitoziną iki 5-hidroksimetilcitozino (5hmC), kuris toliau oksiduojamas, susidariusi modifikacija yra pašalinama DNR pataisos mechanizmu ir toje vietoje įterpiamas naujas nemetilintas citozinas (pagal Ambrosi *et al.*, 2017, Licencijos numeris: 5757011313586).

1.5.2. Histonų modifikacijos

Eukariotinių ląstelių branduoliuose DNR supakuojama kartu su baltymais susidarant chromatinui, nuo kurio struktūros pokyčių priklauso genų raiškos reguliacija. Chromatinas sudarytas iš nukleosomų, t.y. 145-146 bp DNR grandinės apsisukusios aplink histonų oktamerinę šerdį. Kiekviename histonų oktamere yra po dvi kiekvieno histono H2A, H2B, H3 ir H4 baltymų kopijas

(1.6 pav.). Histonų N-galo aminorūgštys sąveikauja su DNR, taip pat yra potencialios potransliacinių modifikacijų vietos. Dažniausiai aptinkamos potransliacinės baltymų modifikacijos yra acetilinimas, metilinimas, fosforilinimas, ubikvitilinimas *et al.* (Bernstein *et al.*, 2007; Bannister ir Kouzarides, 2011). Būtent šios modifikacijos ir suformuoja vadinamąjį histonų kodą, kuris teigia, kad skirtingų potransliacinių modifikacijų tarpusavio koordinacija suformuoja chromatiną struktūrą (Prakash ir Fournier, 2018). Šios modifikacijos yra nepastovios ir katalizuojamos fermentų, kurie gali pernešti arba panaikinti modifikacines grupes. Histonų potransliacinės modifikacijos gali reguliuoti genų raišką dviem mechanizmais. Pirmasis mechanizmas yra paremtas elektrostatine sąveika tarp neigiamai įkrautos DNR ir teigiamų histonų N-galo uodegėlių. Ši sąveika gali būti išbalansuojama, kai, pavyzdžiui, histonų lizinas yra acetilinamas ir įgauna neigiamą krūvį, taip susidarant laisvesnei chromatiną struktūrai. Jeigu tokia modifikacija įvyksta promotoriaus srityje, transkripcijos veiksniai prisijungia prie atlaisvintos DNR grandinės ir aktyvuoja transkripciją. Antrasis mechanizmas, paaiškinantis kaip potransliacinės modifikacijos reguliuoja genų raišką, yra susijęs su specifiniais baltymais, kurie atpažįsta modifikacijas ir pritraukia transkripcijos veiksnius ar chromatiną permoduliuojančius baltymų kompleksus (Dong ir Weng, 2013; Retis-Resendiz *et al.*, 2021).

Histonų acetilinimą katalizuoja histonų acetiltransferazės (HAT), o acetilo grupes panaikina histonų deacetilazės (HDAC) (Shahbazian ir Grunstein, 2007) (1.6 pav.). Transkripciškai aktyvių genų promotorių srityse aptinkamas aukštesnis H3 ir H4 acetilinimo lygis, taip pat histono H3 4-to lizino trimetilinimo (H3K4Me3) lygis (Barski *et al.*, 2007). Histono H3 27-to lizino trimetilinimas (H3K27Me3) ir histono H3 9-to lizino trimetilinimas (H3K9Me3) yra transkripciškai neaktyvaus chromatiną (heterochromatiną) žymės (Liu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015). H3K27 metilinimas katalizuojamas metiltransferazės EZH2, kuri kartu su kitomis molekulėmis sudaro Polikombo slopinantį kompleksą 2 (PRC2) (Tan *et al.*, 2013). Histonų acetilinimo lygis endometriumo ląstelėse padidėja ankstyvoje proliferacinėje stadijoje, tačiau sumažėja vėlyvoje.



1.6 pav. Histonų modifikacijos ir chromatinio pokyčiai. Chromatino sudedamoji dalis nukleosoma sudaryta iš dviejų histonų baltymų H2A, H2B, H3 ir H4 rinkinių. Išsikišusios histonų aminorūgščių šoninės grandinės gali būti modifikuojamos jas metilinant, acetilinant, ubikvitilinant ar fosforilinant. Skaičiai nurodo modifikuojamos lizino grupės vietą. Histonų acetilinimą reguliuoja fermentai HAT ir HDAC, kurie atitinkamai prideda arba panaikina acetilo grupę, tai sukelia chromatinio struktūros persitvarkymą (pagal Gujral *et al.*, 2020; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Po ovuliacijos bendras histonų acetilinimo lygis vėl išauga, bet sekretinės fazės pabaigoje sumažėja, tokie histonų acetilinimo lygio svyravimai koreliuoja su hormonų (E2 ir P4) sekrecijos pokyčiais ciklo metu (Munro *et al.*, 2010; Retis-Resendiz *et al.*, 2021). Histonų acetilinimą reguliuojančių fermentų, pirmo tipo HDAC ir HAT, raiška žmogaus endometriume taip pat kinta ciklo metu (Krushe *et al.*, 2007). ESL decidualizacijos metu padidėja pagrindinių, su aktyvia transkripcija susijusių, histono modifikacijų H3K27Ac ir H3K4Me3 lygis. Transkripcijos veiksnys C/EBP β pritraukia p300 molekulę, turinčią acetyltransferazinį aktyvumą, ir katalizuoja H3K27 acetilinimą. Histonų modifikacijų pokyčiai decidualizacijos metu nustatyti ne tik artimuose promotorių, bet ir toliau nutolusiuose stipriklių regionuose (Tamura *et al.*, 2023). Išanalizavus genominius regionus, kuriuose decidualizacijos metu nustatytas H3K27Ac ir H3K27Me3 lygio padidėjimas,

buvo nustatyta, kad tos sritys yra susijusios su insulino signalo perdavimo keliu, kuris reguliuoja gliukozės pasisavinimo procesą, ir yra svarbus ESL decidualizacijos metu (Tamura *et al.*, 2014). Tad kaip ir DNR metilinimas, taip ir bendras histonų acetilinimo bei metilinimo modifikacijų lygis endometriumo ląstelėse kinta ciklo metu.

1.5.3. miRNR

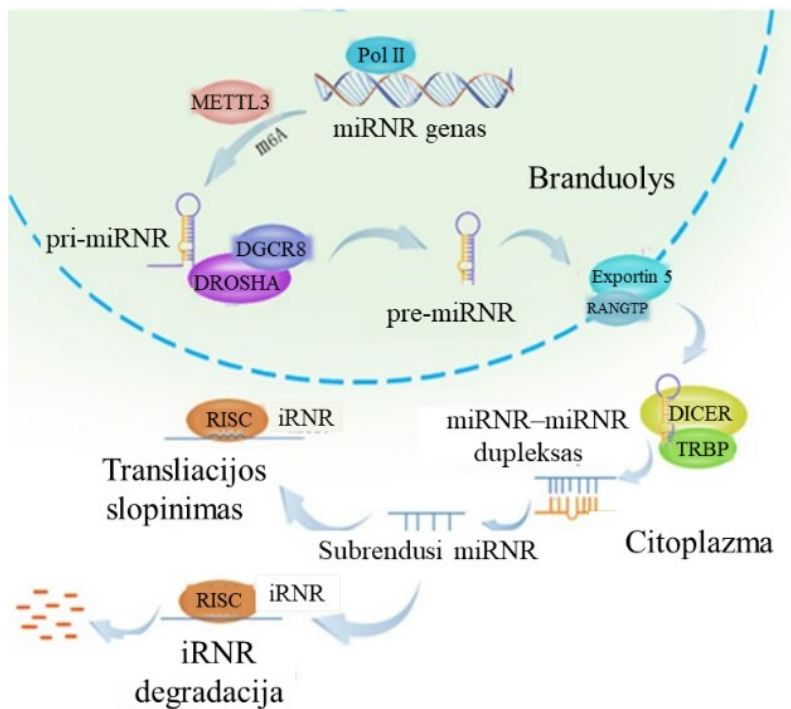
Nekoduojančios RNR (nRNR) yra funkcionalios RNR molekulės, kurios nedalyvauja translacijoje sintetinant baltymus. Pagal dydį nRNR molekulės yra skirstomos į trumpąsias (< 200 nukleotidų) ir ilgąsias nRNR (> 200 nukleotidų). Vis daugiau tyrimų patvirtina, kad nekoduojančios RNR reguliuoja transkripciją, sąveikaudamos su branduolio baltymais, tokiais kaip histonus moduliuojantys kompleksai ar DNMT, ir translacią, tiesiogiai nusitaikydamos į iRNR molekules (Peschansky ir Wahlestedt, 2014; Fu *et al.* 2023). Mikro RNR (miRNR) yra trumposios nRNR įprastai sudarytos iš 18 – 22 nukleotidų ir reguliuojančios genų raišką potranskripciniu lygmeniu, t.y. prisikabindamos prie 3' taikininės iRNR galo inicijuoja RNR aktyvaus slopinimo komplekso (angl. *RNA-induced silencing complex*, *RISC*) susiformavimą, taip užkertant kelią iRNR translacijai (Gulyaeva ir Kushlinskiy, 2016; Treiber *et al.*, 2019). Beveik visi ląstelių tipai sekretuoja miRNR, kurios geba išvengti endogeninių RNAzių ir yra aptinkamos ne tik kraujyje, bet ir kitose organizmo skysčiuose (Liu *et al.*, 2019). Dėl šių priežasčių miRNR gali būti naudojamos kaip biožymenys leidžiantys nustatyti ir stebėti fiziologinius bei patologinius procesus. Tam tikros endometriume aptinkamos miRNR siejamos su implantacijos efektyvumu (Goharitaban *et al.*, 2022), todėl potencialiai gali būti naudojamos kaip biožymenys pagalbinių apvaisinimo procedūrų metu nustatant tinkamiausią laiką blastocistos implantacijai.

miRNR raiškos profilis veikiant lytiniams hormonams varijuoja žmogaus endometriumo ciklo metu, bet tuo pačiu ir miRNR gali daryti įtaką lytinių hormonų veikimui (Kolanska *et al.*, 2021). Didžioji dalis miRNR yra sintetinės II ir III RNR polimerazės susidarant ilgai pirminei segtuko formos miRNR (pri-miRNR). Maždaug pusė šiuo metu nustatytų miRNR yra intrageninės kilmės, dažniausiai sintetinės nuo introninės sekos ir tik retais atvejais nuo baltymus koduojančių genų egzono sritys. Kita pusė nustatomų miRNR yra transkribuojamos nuo genominių sekų, esančių už genų regionų, ir šių miRNR raiška yra reguliuojama nuo jiems būdingų promotorių. Dažniausiai miRNR yra sintetinės kanoniniu keliu, kuomet branduolyje ribonuklezė Drosha „prakerpa“ pirminę miRNR molekulę (pri-miRNR) iki

pirmutinės miRNR (pre-miRNR). Tada pre-miRNR yra pernešama į citoplazmą, kur ją apdoroja endonukleazė Dicer susidarant subrendusiai miRNR (1.7 pav.) (O'Brien *et al.*, 2018). miRNR biogenezeje ir brendime dalyvaujančių ribonukleazių Dicer ir Drosha raiška menstruacinio ciklo metu irgi dinamiškai kinta, o sumažėjęs ribonukleazių kiekis, nustatytas receptyvios fazės metu, yra siejamas su implantacijos proceso sutrikimais (Loke *et al.*, 2019). Palyginus nediferencijuotas ESL ir decidualizuotas ESL nustatyta, kad hsa-miR-222 dalyvauja ESL diferenciacijoje reguliuodama ląstelės ciklo stabdymą S fazėje (Qian *et al.*, 2009). miR-542-3p nuslopinimas ESL sukelia pagrindinių decidualizacijos genų, tokių kaip *IGFBP1*, *WNT4* ir *PRL*, raiškos padidėjimą (Tochigi *et al.*, 2017). Šie rezultatai pagrindžia miRNR reguliacinę svarbą normaliam endometriumo audinio funkcionavimui.

1.6. Užląstelinės pūslelės

Užląstelinės pūslelės (angl. *extracellular vesicles, EV*) yra ląstelių į užląstelinę erdvę sekretuojamos lipidiniu dvisluoksniu gaubtos struktūros. Išskiriami trys pagrindiniai EV tipai, tai, egzosomos, mikrovezikulės ir apoptoziniai kūneliai. Visi trys EV tipai skiriasi savo biogeneze, sekrecijos būdu, dydžiu, supakuotu turiniu bei funkcija. Įprastai EV aptinkami lipidai, nukleorūgštys ir baltymai, ypač tie kurie yra susiję su plazmine membrana, citoplazma ar yra įtraukti į lipidų metabolizmą (Doyle ir Wang, 2019). Egzosomų, kurių dydis varijuoja nuo 30 iki 150 nm, biogeneze prasideda susiformuojant viduląstelinėms membraninėms struktūroms – multivezikuliniais kūneliais (MVK), talpinantiems savyje daug pūslelių, susiformavusių iš endosomų membranos. MVK esančios pūslelės gali būti sulizuojamos, kuomet MVK susilieja su lizosoma, arba paskleistos į užląstelinę ertmę, kai MVK susilieja su plazmine membrana, nuo tada jos vadinamos egzosomomis (Colombo *et al.*, 2014; De Sousa *et al.*, 2022). Skirtingai nuo egzosomų, mikrovezikulės, kurių dydis yra nuo 50 iki 1000 nm, yra tiesiogiai sekretuojamos atsipumpurojant plazminei membranai ir supakuojant tam tikrą citozolio dalį (Stahl ir Raposo, 2019). Apoptoziniai kūneliai yra didžiausios pūslelės, kurių dydis gali varijuoti nuo 1 iki 5 μm ir yra sugeneruojamos vykstant apoptozei (Battistelli ir Falcieri, 2020).



1.7 pav. miRNR biogenezės ir veikimo mechanizmas. miRNR genai nutranskribuojami II ir III RNR polimerazės susidarant ilgai pirminės struktūros pri-miRNR molekulei, kurią kerpa baltymų kompleksas, sudarytas iš prie RNR prisikabinančio baltymo DGCR8 ir III tipo ribonukleazės Drosha, susidarant apie 85 nukleotidų ilgio plaukų segtuko formos pre-miRNR molekulei. Toliau pre-miRNR molekulę iš branduolio į citoplazmą transportuoja Ran-GTP/Exportin 5 kompleksas, kur pre-miRNR apdoroja kita ribonukleazė Dicer iki 20–22 nukleotido ilgio miRNR/miRNR duplekso. Kai dupleksas išardomas subrendusi miRNR yra įtraukiama į baltymų kompleksą RISC. Toks kompleksas gali dalyvauti genų tildyme tiesiogiai skeldamas ir degraduodamas iRNR arba slopindamas transliacijos procesą (pagal Peng ir Croce, 2016, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Kadangi egzosomos ir mikrovezikulės pasižymi panašiomis fizinėmis charakteristikomis, ir kol kas nėra specifinių žymenų, pagal kuriuos jas būtų galima atskirti ir identifikuoti, todėl tirti šias pūslelės individualiai yra gana sudėtinga. Tarpautinė užląstelinių pūslelių asociacija (angl. *International Society for Extracellular Vesicles, ISEV*) dirbant su šiomis struktūromis siūlo vartoti bendrinį užląstelinių pūslelių terminą (They *et al.*, 2018; Welsh *et al.*, 2023), nebent būtų kitų būdų, kaip pagrįsti specifinį pūslelių identifikavimą. Skirtingos EV grupės dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose, įskaitant ląstelių judėjimą, diferenciaciją, proliferaciją, apoptozę, perprogramavimą bei imuninį atsaką. Taip pat EV atlieka svarbią funkciją tarpląstelinėje

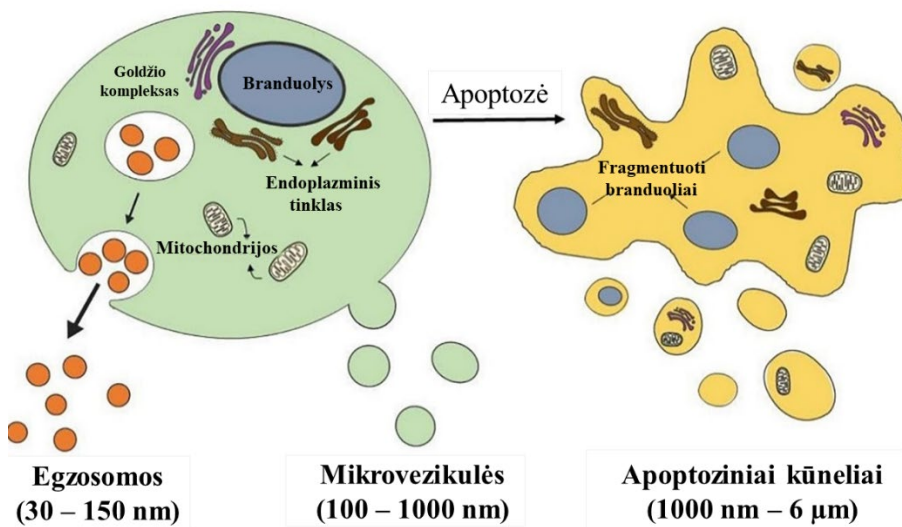
komunikacijoje (Liu ir Wang, 2023). Dėl savo savybių EV sulaukia didelio susidomėjimo siekiant jas pritaikyti terapijoje, kaip vaistus pristatančias platformas, arba ligų diagnozavimui.

Nustatyta, kad skirtingais būdais skiriami egzosomų preparatai yra efektyviai paskirstomi po įvairias organizmo vietas (Gurung *et al.*, 2021). Nors dauguma ląstelių tipų pasižymi gebėjimu nespecifiškai įsisavinti egzosomas, specifinis organų ir audinių pasirinkimas pristatant egzosomoje esantį turinį, gali būti kontroliuojamas pagal egzosomas sudarančių integrinų raiškos pasikeitimus (Horibe *et al.*, 2018). Egzosomos, pasiekusios ląsteles, gali tiesiogiai sąveikauti su ląstelės paviršiuje esančiais receptoriais, susiliesti su membrana arba būti internalizuojamos. Internalizuotos ląstelėje egzosomos patenka į tipinį endosomų brendimo kelią nuo pirminės endosomos iki MVK, kuri toliau gali susijungti su lizosoma ir būti degraduota (Friedman *et al.*, 2013). Tačiau tam tikra dalis egzosomų turinio gali išvengti degradavimo ir pasyviai pasklisti citozolyje (Gurung *et al.*, 2021). Taip pat, nustatyta, kad EV endosomų paskirstymo procese prieš susiliejančią su lizosomomis pirmiausiai yra pristatomos į endoplazminį tinklą, kur vyksta baltymų transliacija (Heusermann *et al.*, 2016). Todėl, jei egzosomų į endoplazminį tinklą pristatytame turinyje yra iRNR ir miRNR, tai gali inicijuoti arba slopinti baltymų raišką taikininėje ląstelėje (Gurung *et al.*, 2021).

Vienas pagrindinių MSL regeneracinio poveikio mechanizmų yra parakrininės sekrecijos funkcija, kurio metu stimuliuotos ląstelės į aplinką sekretuoja ir EV. MSL EV stimuliuoja pirmtakines ir kamienines ląsteles pažeistame audinyje ir skatina ląstelių atsparumą, anti-apoptotines ir angiogenines savybes (Tabeeva *et al.*, 2023). MSL ir jų EV transplantacija geba atstatyti pažeistą endometriumo audinį ir jo funkciją, slopinant fibrozinius ir uždegiminius procesus ir tuo pačiu skatinat endometriumo ląstelių proliferaciją, bei reguliuojant endometriumo receptyvumo veiksnius (Mansouri-Kivaj *et al.*, 2023).

Endometriumo ląstelės sekretuoja įvairius veiksnius, kurie gali veikti tiek autokriniškai, tiek parakriniškai, stimuliuojant stromos diferenciaciją, motinos audinių angiogenezę bei skatinant trofoblasto diferenciaciją ir vystymąsi (Ma *et al.*, 2022). Endometriumo EV yra atsakingos už tiesioginę ir dinamišką molekulinę komunikaciją tarp embriono ir motinos organizmo, vykstančią vystantis blastocitai, embrionui reguliuojant endometriumo receptyvumą, blastocistos implantacijos bei trofoblasto invazijos metu (Hart *et al.*, 2022). Žmogaus ESL taip pat sekretuoja EV vykstant audinio decidualizacijai (Ma *et al.*, 2022). Atlikus decidualinio audinio EV talpinamų baltymų analizę, nustatyta, kad į pūsleles yra supakuojamos ir sekretuojamos įvairios signalinės molekulės, augimo veiksniai, metabolizmo reguliatoriai,

taip pat veiksniai, kontroliuojantys angiogeneninį potencialą (Ma *et al.*, 2022). Receptyvios fazės metu endometriumo ląstelių sekretuojamos EV pasižymi didesniu baltymų, susijusių su endometriumo receptyvumu ir efektyvia implantacija, kiekiu lyginant su pūslelėmis, sekretuojamomis audinio nereceptyvios fazės metu (Hart *et al.*, 2023). Taip pat buvo pademonstruota, kad tokių EV, kuriose talpinamas gliukozės pernašos baltymas 1 (GLUT1), internalizacija paskatina recipientinių ESL gliukozės įsisavinimą ir taip sustiprinamas decidualizacijos procesas. ESL kilmės EV pateikimas žmogaus endotelinėms ląstelėms, stimuliuoja jų proliferaciją ir lemia suaktyvėjusį kraujotakos tinklo formavimąsi. Endometriumo stromos EV taip pat skatina trofoblastų kamienines ląsteles diferencijuotis į trofoblasto ląstelių liniją (Ma *et al.*, 2022). Šie rezultatai patvirtina decidualinio audinio ląstelių EV pleotropinį veikimą, kuris užtikrina endometriumo diferenciaciją ir angiogenezę, bei trofoblasto vystymosi proceso palaikymą.



1.8 pav. Skirtingo tipo EV biogenezė. Egzosomos yra sekretuojamos vidiniams multivezikuliniams kūneliams susilieję su plazmine membrana ir pašalinant savo turinį į išorę. Mikrovezikulės suformuojamos tiesiogiai atspumpuruojant plazminei membranai. Apoptoziniai kūneliai susidaro aktyvavus programuotos ląstelės žūties metu (pagal He *et al.*, 2021, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.7. Audinių ir ląstelių gilus šaldymas

Audinių ir ląstelių gilus užšaldymas (angl. *cryopreservation*) yra gana įprasta praktika biologijoje ir medicinoje siekiant išlaikyti audinius ir ląsteles ilgą laiką tam pasitelkiant labai žemas temperatūras (Jang *et al.*, 2017).

Reprodukcinėje medicinoje tai plačiai paplitusi technologija šaldant tokius mėginius kaip spermatozoidai, oocitai, kiaušidės ir embrioniniai audiniai (Gook ir Edgar, 2018; Canosa *et al.*, 2023). Galimybė išsaugoti gyvybingus žmogaus audinius ar ląsteles, kuriuos vėliau būtų galima naudoti terapiniais tikslais, yra svarbi įvairių sričių medicinos praktikoje ypač orientuojantis į personalizuotą gydymą.

Dažniausiai naudojami mėginių paruošimo būdai giliam šaldymui yra lėtas užšaldymas (angl. *slow-freezing*) ir vitrifikacija (angl. *vitrification*). Pagrindiniai šių metodų skirtumai yra naudojamų krioprotektorių koncentracijos ir šaldymo greičiai. Lėto šaldymo metu būtina užtikrinti labai lėtą šaldymo greitį, kad vanduo iš ląstelių spėtų pasišalinti pakeičiant jį krioprotektoriumi, taip išvengiant dėl osmoso patiriamos dehidratacijos ir viduląstelių ledo kristalų susiformavimo. Įprastai lėto šaldymo metu palaikomas kontroliuojamas apie 1 °C/min. šaldymo greitis. Tačiau lėto šaldymo metu išlieka ledo kristalų, kurie gali pažeisti ląstelių membranas, susiformavimo užląstelinėse erdmėse rizika. Vitrifikacija tai alternatyva lėtam užšaldymui, kuomet mėginių suspensijos sumaišytos su didelėmis krioprotektorių koncentracijomis iš karto perkeliama į skystą azotą ir iš skystos būsenos pereina į amorfinę būseną, taip išvengiant ledo kristalų susiformavimo. Svarbu žinoti, kad atšildymo metu, po gilaus užšaldymo, mėginių integralumas gali būti pažeidžiamas tiek po lėto užšaldymo, tiek po vitrifikacijos (Bojic *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2023). Neseniai buvo pristatyta, kad lėtas gilus užšaldymas yra labiau tinkamas minkštųjų audinių, tokių kaip gimdos kaklelio ar žarnyno gleivinės, išsaugojimui lyginant su vitrifikacija, po kurios nustatytas sumažėjęs ląstelių gyvybingumas (Hughes *et al.*, 2023). Skirtingai nei šaldant ląstelių suspensiją, audinių atveju sudėtingiau užtikrinti tolygų krioprotektoriaus pasiskirstymą ir sklandų šaldymo bei atšildymo procesą (Jang *et al.*, 2017).

Krioprotektoriai dažniausiai yra skysčiai, sumažinantys sukeltus pažeidimus gilaus šaldymo metu, tokios medžiagos turi gebėti patekti į ląstelių vidų ir pasižymėti žemu toksiškumu. Šaldymo sąlygos turi būti optimizuojamos skirtingiems ląstelių ir audinių tipams (Cury-Silva *et al.*, 2021). Dažniausiai naudojamas krioprotektorius yra dimetilo sulfoksidas (DMSO), kuris sumažina elektrolitų koncentraciją neužšalusiose viduląstelinėse ir užląstelinėse erdmėse, tačiau yra toksiškas ir gali sukelti epigenetinius pokyčius šaldomuose mėginiuose (Best, 2015; Verheijen *et al.*, 2019). Tad siekiant išlaikyti aukštą ląstelių ir audinių gyvybingumą gilaus šaldymo metu, svarbu nustatyti optimalias sąlygas, tokias kaip mėginio tūris, šaldymo ir atšildymo greičiai bei krioprotektoriaus koncentracijas.

Vykdamt lėtą arklio endometriumo užšaldymą naudojant DMSO nustatyta, kad audinio gyvybingumas po atšildymo nebuvo reikšmingai sumažėjęs lyginant su neužšaldyto audinio kontrole, be to, gilus užšaldymas neturėjo įtakos ir E2 bei P4 receptorių raiškos pokyčiams (Thompson *et al.*, 2019). Taip pat buvo parodyta, kad nepakito ir žmogaus gimdos kaklelio audinio ląstelių savybės po gilaus audinio užšaldymo ir atšildymo (Fox *et al.*, 2017). Stromos ląstelės išskirtos iš giliai užšaldyto ir vėliau atšildyto endometriumo audinio pasižymėjo panašiu atsaku į hormoninį stimuliavimą kaip ir ląstelės, išskirtos iš nešaldyto audinio (Heidari-Khoei *et al.*, 2022). Be to, iš atšildyto audinio išskirtos ląstelės neprarado savo savybės suformuoti 2D ir 3D struktūras (He *et al.*, 2020), bei organoidus, kurie taip pat išliko jautrūs hormoninei stimuliacijai (Bui *et al.*, 2020; Heidari-Khoei *et al.*, 2022). Nepaisant to, kad gilaus užšaldymo neigiamą įtaką atšildytų audinių tirtoms savybėms nebuvo nustatyta, svarbu įvertinti ir tokių procedūrų įtaką molekuliniais veiksniais, tokiems kaip epigenetinių ir kitų veiksmų genų ir baltymų raiškos lygiams, ar galimiems jų pokyčiams.

2. METODAI

2.1. Audinių surinkimas ir gilus šaldymas

Žmogaus endometriumo mėginiai buvo surinkti iš pacienčių, kurioms buvo atliekamos pagalbinio apvaisinimo procedūros (apvaisinimas mėgintuvėlyje (angl. *in vitro fertilization, IVF*) ir/arba intracitoplazminė spermatozoido injekcija (angl. *intracytoplasmic sperm injection, ICSI*)) Vilniaus universiteto Santaros klinikų ligoninės Akušerijos ir Ginekologijos Santarų Vaisingumo centre. Endometriumo mėginiai buvo surenkami atliekant endometriumo sienelės įbrėžimus su gimdos endometriumo biopsijos kateteriu (pipele) 17–22 ciklo dieną, prieš pagalbinio apvaisinimo procedūras. Visi donorai, kurių mėginiai buvo naudojami tyrime pasirašė informuotą sutikimo formą dalyvauti moksliniame tyrime. Tyrimui suteiktas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-18/7-1049-550.

Surinkti endometriumo audiniai buvo panaudojami stromos ląstelių, DNR, RNR ar baltymų skyrimui iškart arba užšaldomi. Prieš atliekant gilų užšaldymą, audiniai buvo smulkiai supjaustomi iki 2-3 mm² gabalėlių ir patalpinami į šaldymo mėgintuvėlius, kur ant jų buvo užpilama audinių šaldymo terpės (90 % fetalinis veršelio serumas (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) ir 10 % DMSO (Sigma, JAV). Mėgintuvėliai pernešami į - 80 °C ir laikomi ten per naktį, o kitą dieną perkeliama į skysto azoto talpą (- 196 °C). Po tam tikro gilaus užšaldymo laikotarpio, mėginiai buvo atšildomi šaldymo mėgintuvėlius iš skysto azoto talpos perkeliant į +37 °C vandens vonelę ir inkubuojant 3 min. Toliau stromos ląstelės, DNR, RNR ar baltymai iš tokių užšaldytų audinių skiriami, kaip ir aprašyta toliau, nešaldytų audinių atveju.

2.2. Stromos ląstelių išskyrimas, kultivavimas, bei proliferacijos ir metabolinio aktyvumo įvertinimas

ESL buvo skiriamos pagal anksčiau publikuotą protokolą (Tavakol *et al.*, 2018). Endometriumo biopsija skalpeliu susmulkinama iki 1-2 mm² dydžio gabalėlių, inkubuojami 200 U/ml II tipo kolagenazės (Genaxxon bioscience, Vokietija) tirpale. Kolagenazei fermentiškai suskaidžius audinį, ląstelių suspensija filtruojama pro 40 µm filtrą, dalis filtrą pratekėjusios endometriumo audinio ląstelių (EAL) suspensijos naudojama ląstelių charakterizavimui tėkmės citometrijos metodu, o kita dalis išsėjama į kultivavimo indus. ESL kultivuotos auginimo terpėje sudarytoje iš

DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV), 10 % FBS ir 50 µg/ml primocino (Invivogen, JAV) tirpalo, 37 °C, 5 % CO₂ persėjant kas 3 – 4 dienas.

Eksperimentuose naudotos tik ankstyvo pasažo (2-5 pasažo) iš pacientų ėminių išskirtos ESL, nebent nurodyta kitaip. Pirminės ląstelių kultūros buvo auginamos siekiant padauginti jas iki eksperimentams atlikti reikalingo kiekio. Disertacijos metu sukauptas pirminių ESL rezervas, kurio ląstelės buvo charakterizuotos pagal mezenchiminėms stromos ląstelėms keliamus reikalavimus. Tolimesniems tyrimams ląstelės iš rezervo buvo parenkamos atsitiktinai, neįtraukiant pacientų, kuriems identifikuoti ginekologiniai sutrikimai.

Siekiant nustatyti ląstelių proliferacijos efektyvumą, persėjant ląsteles jos buvo dažomos Tripano mėlio dažu ir skaičiuojamos naudojant hematocitometrą. Suminis populiacijos dvigubėjimo lygis (PDL) apskaičiuotas pagal formulę nurodytą žemiau:

$$\text{PDL}(x) = 3,32 (\log (\text{Surinktos gyv. ląstelės}) / (\text{Užsėtos gyv. ląstelės})) + \text{PDL}(x-1),$$

kur x – pasažo numeris.

Metaboliniam aktyvumui įvertinti ląstelės buvo inkubuojamos su 0,2 mg/ml MTT reagentu (Sigma-Aldrich, JAV). Metaboliškai aktyvios ląstelės geltoną tetrazolio druską redukuoja iki purpurinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano. Susidaręs formazanas buvo ištirpintas 96 % etanolyje ir tirpalo optinis tankis išmatuotas naudojant *Infinite® M200 Pro plate reader* spektrofotometrą bei naudojant *Tecan i-control™* programinę įrangą (Tecan, Šveicarija) ir analizuojant sugertį 570 ir 630 nm bangos ilgiuose. Pateikiamos vertės iš 570 nm rezultatų atimant 630 nm, kadangi šios atitinka fonines vertes.

2.3. Diferenciacijos indukcija ir efektyvumo įvertinimas

ESL buvo indukuojamos diferencijuoti adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine ir chondrogenine kryptimis. Diferenciacijos efektyvumas įvertintas kokybiškai dažant ląsteles atitinkamais dažais. Adipogeninei kryptiai indukuoti ląstelės buvo kultivuojamos terpėje sudarytoje iš DMEM (4,5 g/l gliukozės) (Genaxxon bioscience GmbH, Vokietija), 10 % FBS, 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomocino (PS) tirpalo (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), 1 µM deksametazono,

0,5 mM IBMX (angl. *3-isobutyl-1-methylxanthine*) ir 60 μ M indometacino (Cayman Chemical Company, JAV) apie 14 dienų. Siekiant patvirtinti adipogeninę diferenciaciją po dviejų savaičių, ląstelės buvo fiksuojamos su 4 % formaldehido tirpalu ir 15 min. dažomos su *Oil Red O* dažu (Sigma-Aldrich, JAV). Osteogeninės diferenciacijos indukcijos terpė sudaryta iš DMEM (1 g/l gliukozės) (Genaxxon bioscience GmbH, Vokietija), 10 % FBS, 1 % PS, 0,1 μ M deksametazono, 10 mM β -glicerofosfato ir 50 μ g/ml askorbo rūgšties (Cayman Chemical Company, JAV). Kaip ir adipogeninės diferenciacijos atveju, osteogeninė indukcija vyko apie 14 dienų. Po šio laikotarpio, ląstelės buvo fiksuojamos su šaltu 75 % etanoliu (Vilniaus degtinė, Lietuva) 30 min. KT ir tada inkubuojamos su *Alizarin Red S* dažu (Sigma-Aldrich, JAV) 2–3 min. Miogeninės diferenciacijos terpę sudarė DMEM (1 g/l gliukozės), 2 % arklio serumas (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) ir 1 % PS. Neurogeninė diferenciacija indukuota 10 dienų naudojant DMEM/F12 terpę papildytą 1 % PS, 1 % N2 priedu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) ir 1,5 μ M retinoine rūgštimi (Cayman Chemical Company, JAV). Miogeninės ir neurogeninės diferenciacijos įvertintos atliekant ląstelių dažymą su 0,1 % kristalinio violetinio tirpalu (Sigma-Aldrich, JAV) 30 min. KT. Chondrogeninei diferenciacijai ląstelės buvo užsėjamos dideliu tankiu naudojant lašelio metodą (1 x 10⁵ ląstelių 25 μ l tūrio lašelyje) siekiant sutankinti ląstelių sąveikos jungtis. Atitinkamai užsėtos ląstelės buvo inkubuojamos su DMEM (4,5 g/l gliukozės) papildyta 0,1 μ M deksametazonu, 50 μ g/ml askorbo rūgštimi, 1X ITS (Insulino, transferino ir seleno rūgšties tirpalas) (BioGems, JAV), 10 ng/ml TGF- β 3, 1 mM natrio piruvatu, 0,35 mM prolinu ir 1 % PS. Chondrogeninė diferenciacija truko dvi savaites ir įvertinimui ląstelės fiksuojamos 4 % formaldehido tirpalu 30 min. KT ir dažomos su 1 % *Alcian Blue* (Sigma-Aldrich, JAV) tirpalu. Kiekviena diferenciacijos terpė atšviežinama kas 2–3 dienas. Diferencijuotos ląstelės vaizdinamos naudojant *EVOS XL Cell Imaging System* (Thermo Fisher Scientific, JAV).

2.4. ESL decidualizacija ir hCG poveikis

Prieš pakeičiant ląstelių auginimo terpę į decidualizacijos ir hCG poveikius, ESL buvo kultivuojamos auginimo terpėje iki tol, kol pasiekė apie 80 % suaugimo tankį. Tada auginimo terpė pakeičiama į atitinkamos sudėties poveikio terpę. Decidualizacijos terpė sudaryta iš RPMI (be fenolio) (Hyclone Laboratories, JAV), 2 % anglimi filtruoto FBS (Thermo Fisher Scientific, JAV), 1 % PS tirpalo bei decidualizacijos induktorių: 0,5 mM db-cAMP (Sellechem, JAV) ir 1 μ M medroksiprogesterono acetato (MPA) (Cayman

Chemical Company, JAV). Decidualizacija analizuojama po 6 ir 24 val., bei 3 ir 6 dienų. Indukcijos terpės sudėtis atitiko decidualizacijos terpės sudėtį, išskyrus tai, kad nebuvo pridėti decidualizacijos induktoriai. Papildomai buvo palyginta 10, 50 ir 100 IU/ml hCG (Sigma-Aldrich, USA) koncentracijų įtaka ESL po 6 ir 24 val. kombinacijoje su ir be decidualizacijos stimulo. Šio eksperimento schema pateikiama Lentelėje Nr. 1. Jeigu vertinamas hCG poveikis kartu su decidualizacija, prieš poveikį su hCG, ląstelės buvo kultivuojamos 2 dienas decidualizacijos terpėje. Tačiau jeigu vertinamas hCG poveikis nepriklausomai nuo decidualizacijos, ESL prieš poveikį su hCG kultivuojamos 2 dienas indukcijos terpėje. Po dviejų dienų decidualizacijos indukcijos, pridama hCG ir ląstelės po atitinkamo laiko surenkamos tyrimams. Kontrolinės ląstelės iki mėginių surinkimo kultivuojamos indukcijos terpėje, o decidualizacijos poveikis vertintas ląsteles kultivuojant tik decidualizacijos terpėje.

Lentelė Nr. 1. hCG eksperimento schema

Mėginys	2 dienų preindukcija	Iki mėginių surinkimo (po papildomų 6 arba 24 val.)
Kontrolė	Indukcijos terpė	Indukcijos terpė
hCG	Indukcijos terpė	Indukcijos terpė + hCG
Decidua	Decidualizacijos terpė	Decidualizacijos terpė
Decidua + hCG	Decidualizacijos terpė	Decidualizacijos terpė + hCG

2.5. Tėkmės citometrija

EAL ir ESL charakterizuojamos pagal jų paviršiaus žymenų raišką. Ląstelės surinktos ir plautos naudojant PBS su 1 % galvijų serumo albuminu. Vienai reakcija imta po 5×10^4 ląstelių, kurios suspenduotos PBS su 1 % galvijų serumo albuminu ir toliau pridėti atitinkami pelės antikūnai prieš žmogaus antigenus. Analizėje naudoti antikūnai pateikti Priede Nr. 1. Ląstelės su antikūnais inkubuotos 4 °C 30 min. tamsoje. Po inkubacijos ląstelės dar kartą plaunamos su PBS papildytu 1 % galvijų serumo albuminu ir analizuojamos su *Guava® easyCyte* (Luminex, JAV) tėkmės citometru naudojant *InCyte™ 2.2.2.* programinę įrangą. Kiekvieno mėginio analizei surinkta po 10 000 matavimo įvykių. Rezultatų analizė atlikta naudojant *Flowing Software 2.5.1.* (Turku Bioscience, Suomija) programinę įrangą.

2.6. DNR ir RNR išskyrimas

DNR ir RNR iš analizuotų mėginių buvo išskirtos naudojant kolonėlių pagrindo *Quick-DNA/RNA™ Miniprep* (Zymo Research, JAV) rinkinį.

Skiriant DNR ir RNR iš audinių, šie buvo užpilami skystu azotu ir sutrinami rankiniu grūstuvu. DNR ir RNR iš surinktų ląstelių arba sutrintų audinių toliau skiriamos pagal rinkinio gamintojo instrukcijas. Išgrynintų nukleorūgščių koncentracija ir švarumas nustatyti spektrofotometriškai naudojant *NanoPhotometer*TM (Implen, Vokietija).

2.7. Atvirkštinė transkripcija (AT) ir kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija (kPGR)

Iki 1 µg RNR buvo paimta AT reakcijai naudojant *SensiFAST*TM *cDNA Synthesis Kit* (Bioline, JAV) arba *LunaSript*[®] *RT SuperMix Kit* (New England Biolabs, JAV). kPGR atlikta atitinkamai naudojant *SensiFAST*TM *SYBR*[®] *No-ROX kit* (Bioline, JAV) arba *Luna*[®] *Universal qPCR Master Mix* (New England Biolabs, JAV). Mėginiai analizuoti tikro laiko PGR termocikleryje *RotorGene 6000 system* (Corbett Life Science, QIAGEN, Vokietija) su *RotorGene 6000 Series Software 1.7* programine įranga. iRNR kiekis normalizuotas pagal *GAPDH* arba *GAPDH* ir *RPL13A* geometrinio vidurkio vertes. kPGR analizėje naudotos pradmenų sekos nurodytos Priede Nr. 2. Visi mėginiai analizuoti atliekant po du kPGR pakartojimus. Santykinė genų raiška apskaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą. Gauti rezultatai įskaitant ir kontrolinius mėginius sukalibruoti pagal kontrolinės grupės mėginių vidurkio reikšmę, kuomet $\Delta\Delta C_T = \text{mėginio } \Delta C_T - \text{kontrolinių mėginių } \Delta C_T$ vidurkis, siekiant pavaizduoti rezultatų išsibarstymą grupių įskaitant ir kontrolės viduje.

2.8. Imunofermentinė analizė (ELISA)

Siekiant įvertinti sekretuojamų baltymų pokyčius surinkta kultivuojamų ląstelių kultūrų terpė. IGFBP-1 kiekiai ląstelių kultūrų terpėje nustatyti naudojant *IGFBP-1 ELISA kit* (Mediagnost, Vokietija), o PRL – *Prolactin ELISA kit* (Biovendor – Laboratori medicina a.s., Čekija). Abu komerciniai rinkiniai naudoti pagal gamintojų nurodytas instrukcijas. IGFBP-1 ir PRL baltymų kiekiai normalizuoti pagal bendrą baltymų kiekį kiekviename mėginyje, kuris nustatytas naudojant *Bradford Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, JAV) pagal gamintojo protokolą. Šios analizės atliktos naudojant *Infinite*[®] *M200 Pro plate reader* (Tecan, Šveicarija) spektrofotometrą.

2.9. Chromatino imunoišsodinimas (ChIP) ir kPGR analizė

ChIP analizė atlikta naudojant *Zymo-Spin ChIP Kit* (Zymo Research, JAV) pagal gamintojo nurodytas instrukcijas su keleta modifikacijų. Ląstelės

fiksuojamos auginimo induose į auginimo terpę pridedant formaldehido tirpalo, kad galutinė koncentracija būtų 1 %, ir inkubuota 10 min. 37 °C vartant. Fiksavimas sustabdomas pridedant glicino tirpalo (galutinė konc. 0,125 M). Užfiksavus ląsteles ir sutvirtinus baltymų ir nukleorūgščių sąveikas ląstelės plaunamos su PBS, papildytu proteazių inhibitoriais, ir surenkamos gremžtuku. Toliau atlikti žingsniai pagal komercinio rinkinio naudojimo aprašymą. Mėginiai sonikuoti naudojant *Bioruptor® Pico* sonikavimo įrenginį (Diagenode, Belgija) atliekant 3 ciklus po 30 s su 30 s pertrauka (ON 30s, OFF 30s) ir suskaidant chromatiną iki 200–600 bazių porų dydžių fragmentų. Sonikavimo efektyvumas patikrintas frakcionuojant sonikuotą DNR agarozės gelyje ir vizualizuojant transliuminatoriuje *ChemiDoc™ XRS+ System*, bei naudojant *Image Lab* programinę įrangą (BIO-RAD, JAV). Chromatino fragmentai naudojami imunoišsodinimo reakcijoje inkubuojant 24 val. 4 °C su ChIP lygio antikūnu prieš H4hyperAc ir H4K27Ac (Merck Millipore, JAV) arba nespecifinį IgG antikūną (Advansta, JAV). 10 % imunoišsodinimui naudojamų chromatino fragmentų naudoti kaip bendro chromatino kiekio kontrolė (*Input DNR*). Imunoišsodinta DNR analizuota kPGR metodu naudojant atitinkamų genų promotorių arba genus koduojančias sekų pradmenis. Analizei buvo naudojamos vertinamo geno promotoriaus srities (1000 bp sekos intervalas iki transkripcijos pradžios srities) ir pirmojo arba antrojo egzono sekos pasirinktos iš genomo duomenų bazės (Kalifornijos Santa Kruzo universitetas, angl. *University of California Santa Cruz*, UCSC, <https://genome.ucsc.edu/>), o naudojant programinę įrangą Primer-BLAST (angl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) parenkami tinkamiausi pradmenys šioms sekoms, siekiant sugeneruoti PGR produkto dydį 70-150 bp. ChIP-kPGR naudotų pradmenų sekos pateiktos Priede Nr. 3. kPGR gautos C_T vertės (ChIP DNR) palygintos su kiekio kontrolės (*Input DNR*) mėginių vertėmis. IgG atitinka neigiamą imunoišsodinimo kontrolę. Imunoišsodintos DNR procentinis kiekis nuo *Input DNR*, atspindintis histono modifikacijos lygį atitinkamose genomo srityse, apskaičiuotas pagal šias formules:

$$\Delta C_T = ((C_T [\text{Input DNR}] - \text{Log}_2 10) - C_T [\text{ChIP DNR}])$$

$$\text{Imunoišsodinta DNR, \%} = 100 \times 2^{\Delta C_T}$$

2.10. Metilintos DNR imunoišsodinimas ir kPGR analizė

DNR išskirta iš audinių arba ląstelių kultūrų mėginių naudojant centrifugavimo kolonėlėmis paremtą komercinį rinkinį *Quick-DNA/RNA*

Miniprep Kit (Zymo Research, JAV). Išskirta DNR sonikuota naudojant *Bioruptor® Pico* sonikavimo įrenginį (Diagenode, Belgija). Sonikavimui paimta 2 µg DNR ir atlikti 7 sonikavimo ciklai po 15 s, su 90 s pertrauka (ON 15 s, OFF 90s), tokiu būdu sugeneruojami 200–500 bazių porų fragmentai. Fragmentų dydžių pasiskirstymas įvertintas atlikus DNR elektroforezę 1,8 % agarozės gelyje ir vizualizuojant rezultatus transliuminatoriuje *ChemiDoc™ XRS+ System*, bei naudojant *Image Lab* programinę įrangą (BIO-RAD, JAV). 10 % imunoišsodinimui naudotos sonikuotos DNR naudojama kaip bendro DNR kiekio kontrolė (*Input DNR*). Prieš imunoišsodinimą, sonikuotos DNR mėginiai denatūruojami 95 °C 10 min. ir iš karto pernešami ant ledo tolimesnei 5 min. inkubacijai. 320 ng sonikuotos DNR sumaišyta su 0,8 µl 1 mg/ml anti-5-metilcitozino antikūnu (Eurogentec, Belgija) bei *ZymoMag Protein A* magnetinėmis dalelėmis (Zymo Research, JAV) ir inkubuota 37 °C 1 val. ant vartyklės. Su antikūnu ir magnetinėmis dalelėmis sukibusi DNR atskirta naudojant magnetą. Antikūnas inaktyvuotas ir metilinta DNR atskirta nuo magnetinių dalelių inkubuojant mėginius 75 °C 5 min. Imunoišsodinta DNR (MeDIP DNR) analizuota atliekant kPGR ir naudojant atitinkamų genomo promotorių ir egzonų sričių pradmenis. MeDIP-kPGR naudoti pradmenys pateikti Priede Nr. 3. Metilintos DNR išskyrimo efektyvumas patikrintas pagal hipometilintą *GAPDH* promotoriaus sritį ir hipermetilintą *H19ICR* geną. IgG naudota kaip neigiama imunoišsodinimo kontrolė. MeDIP DNR C_T vertės palygintos su *Input DNR* vertėmis, kurios atitinka 10 % bendro DNR kiekio, naudoto kiekvienoje imunoišsodinimo reakcijoje. Imunoišsodintos DNR procentinis kiekis nuo *Input DNR*, atspindintis metilintos DNR lygį atitinkamose genomo srityse, apskaičiuotas pagal šias formules:

$$\Delta C_T = ((C_T [\text{Input DNR}] - \text{Log}_2^{10}) - C_T [\text{MeDIP DNR}])$$

$$\text{Imunoišsodinta DNR, \%} = 100 \times 2^{\Delta C_T}$$

2.11. *Western Blot* analizė

Ląstelės baltymų skyrimui lizuojamos naudojant natrio dodecilsulfato (angl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) lizės buferį (62,5 mmol/l Tris (pH 6,8), 100 mmol/l DTT, 2 % SDS, 10 % glicerolis). DNR degraduota į mėginius pridėdant po 2,5 U/ml benzonazės (Merck, Vokietija) ir inkubuota lede 30 min. Baltymų mėginiai frakcionuojami atliekant 7,5–15 % gradientinio SDS denatūruojančio poliakrilamido gelio elektroforezę (SDS-PAGE) ir naudojant Tris-glicino buferį. Po elektroforetinio frakcionavimo baltymai pernešti ant

polivinilideno fluorida (PVDF) membranos. Membranos prieš inkubaciją su antikūnais blokuojamos su 5 % pieno tirpalu 1 val. vartant ant vartyklės. Atitinkamų baltymų detekcijai membranos paliktos inkubuotis nuo 2 val. iki per naktį naudojant pirminius antikūnus (Priedas Nr. 4), kurių skiedimai atlikti pagal gamintojų instrukcijas. Baltymų detekcijai naudoti antriniai antikūnai (Dako, Danija; Advansta, JAV) prieš pelės, triušio ir ožkos imunoglobulinus, žymėti krienų peroksidaze (angl. *Horseradish peroxidase*, *HRP*). Chemiliuminescencijos detekcijai membranos inkubuotos naudojant *WesterBright™* rinkinius (Advansta, JAV) ir signalas išmatuotas transliuminatoriuje *ChemiDoc™ XRS+ System* naudojant *Image Lab* programinę įrangą (BIO-RAD, JAV). Analizuotų baltymų kiekiai normalizuoti pagal β -aktino arba GAPDH kiekį, o histonų modifikacijos pagal histono H3 arba histono H4 kiekius. Kiekybiniai gautų rezultatų analizei panaudota *ImageJ* (National Institutes of Health, JAV) programinė įranga.

2.12. miRNR analizė

miRNR raiškos analizei atlikti naudotas komercinis rinkinys *Taqman™ MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, JAV). Iš analizuojamų ląstelių bendra RNR išskirta kaip aprašyta 2.5. skyriuje. Pirmiausia paruoštas AT mišinys išpilstytas į mėgintuvėlius ir pridėta po 1–10 ng RNR bei testuojamą miRNR specifiskai atpažįstantys pradmenys (*Taqman™ Small RNA assay (5X)*). Analizės metu naudotos miRNR: hsa-miR29b-3p, hsa-miR145-5p, hsa-miR125b-5p, hsa-miR21-5p, hsa-miR34a-3p. Po AT, miRNR raiškos lygio įvertinimui toliau atlikta kPGR reakcija naudojant komercinį kPGR rinkinį *TaqMan™ Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems, JAV) ir kaip ir AT reakcijoje atitinkamą miRNR atpažįstančius pradmenis (*Taqman™ Small RNA assay (20X)*). Nustatytas miRNR lygis normalizuotas pagal RNU48 kiekį. Santykinė miRNR raiška apskaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą.

2.13. EV surinkimas, charakterizavimas ir baltymų ir RNR skyrimas

EV surinkimui ESL inkubuojamos 72 val. indukcinėje arba decidualizacijos terpėse, kurių sudėtis nurodyta Lentelėje Nr. 1, išskyrus tai, kad nebuvo pridėtas FBS, siekiant išvengti išorinės EV taršos. EV buvo surenkamos keliais etapais centrifuguojant surinktą ląstelių terpę. Pirmiausiai terpė centrifuguojama 300 g 10 min. siekiant atskirti ląsteles ir 2000 g 10 min. atskiriant ląstelių nuolaužas. Po šių žingsnio supernatantas pernešamas į ultracentrifugavimo mėgintuvėlius ir vėl centrifuguojama su *Optima XE Ultracentrifuge* (Beckman, JAV) naudojant *Type 70 TI* rotorių palaikant 4 °C.

Toliau vykdyti šie centrifugavimo žingsniai: 20 000 g 30 min. siekiant atskirti didesnes EV, ir 100 000 g 70 min. siekiant surinkti mažąsias EV. Po ultracentrifugavimo mažosios EV buvo plaunamos PBS ir pakartotinai centrifuguojamos 100 000 g 70 min. Po plovimo surinktos EV suspenduojamos PBS ir naudojamos iškart arba pernešamos į -80 °C ilgalaikiam saugojimui. EV charakterizavimui atlikta *Western Blot* analizė, kaip aprašyta 2.11. skyriuje naudojant antikūnus nurodytus Priede Nr. 5. EV dydžio ir kiekio pasiskirstymo įvertinimą nanodalelių analizavimo prietaisu *NanoSight LM10-HS* (Nanosight, JK) atliko dr. M. Norkienė (Eukariotų genų inžinerijos skyrius, GMC, VU). EV mėginių skenuojančios elektroninės mikroskopijos analizę atliko dr. E. Skliutas (FTMC). Surinktos EV buvo lizuojamos naudojant SDS lizės buferį. RNR iš surinktų EV buvo išskirta naudojant *TRIzol™* reagentą (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, JAV) pagal gamintojo protokolą.

2.14. EV baltymų nustatymas naudojant masių spektrometriją

EV baltymų nustatymą atliekant masių spektrometriją atliko Bristolio universiteto Proteomikos skyrius (Bristolis, JK). Pirmiausiai peptidai skirtinguose tiriamuose mėginiuose pažymėti naudojant skirtingas TMT (angl. *Tandem mass tag*) molekules ir tada mėginiai apjungiami tolimesnei analizei. Toliau atliekant aukšto pH atvirkščios fazės chromatografija (angl. *High pH reversed phase chromatography*) peptidai buvo išfrakcionuojami ir mėginiai išanalizuoti atliekant masių spektrofotometrija (angl. *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*). Gauti duomenys buvo sulygiuojami su žmogaus Uniprot duomenų baze (<https://www.uniprot.org/>). Baltymų grupavimas nustatytas naudojant programinę įrangą PD2.4 (Thermo Fisher Scientific, JAV). Kiekvienam mėginiui nustatyto baltymų kiekiai buvo normalizuoti pagal bendrą viso mėginyje nustatytų baltymų kiekio sumą, ir reikšmės buvo logaritmuojamos (\log_2) siekiant pritraukti jas arčiau normalaus pasiskirstymo. Buvo atlikti 2 biologiniai pakartojimai ($n=2$). Kiekvienam biologiniam pakartojimui atskirai nustatyti baltymų lygiai ir apskaičiuoti pokyčiai tarp poveikių, o galutinis rezultatas pateikiamas kaip dviejų biologinių pakartojimų pokyčių vidurkis. Statistinės analizės metu naudoti normalizuoti kiekiai. Palyginti tarpusavyje grupės buvo naudojamas vienanaris susijusių mėginių t-testas. p reikšmės buvo patikslintos naudojant Bendžamino-Hokbergo metodą (angl. *Benjamin-Hochberg method*). *Volcan plot* grafikai nubraižyti naudojant $-\log_{10}(p \text{ reikšmė})$ ir $\log_2(\text{pokytis kartais})$ vertes, kur pokytis laikomas statistiškai reikšmingu jeigu p reikšmė $< 0,05$, o $\log_2(\text{pokytis kartais}) > 1$ arba < -1 . Baltymų sąveikos tinklas sugeneruotas

naudojant baltymų funkcijos ryšių analizės įrankį STRING (<https://string-db.org/>), į šį tinklą įtraukti baltymai kurių $\log_2(\text{pokytis kartais}) > 1,2$, o p reikšmė $< 0,1$. STRING įrankis taip pat panaudotas pakitusių baltymų priskirimui biologiniams procesams (GO) ir funkciniam keliams (KEGG).

2.15. EV miRNR sekoskaita ir RT-kPGR

miRNR sekoskaitos ir bioinformatikos analizę EV RNR mėginiuose atliko *Novogene Co* (JK). Sekoskaita atlikta naudojant *Illumina* sekoskaitos platformą SE50 (*Illumina, JAV*). *Bowtie* programa panaudota trumpų RNR sulygavimui su referentine seka. miRNR potencialūs taikiniai nustatomi naudojant *miRanda*. miRNR sekoskaitos analizės metu vertinti 3 biologiniai pakartojimai ($n=3$). Atskirų pakartojimų metu nustatyti miRNR lygiai buvo suvidurkinami ir apskaičiuojamas pokytis tarp analizuotų poveikių. Pakitusios miRNR raiškos analizė tarp dviejų mėginių atlikta naudojant *DEGseq R package*. Skirtumas buvo laikomas statistiškai reikšmingu, jeigu p reikšmė $< 0,05$ ir pokytis $> 1,3$. *Gene Ontology* (GO) analizė naudota siekiant nustatyti skirtinga raiška pasižyminčias miRNR taikininius genus, KEGG duomenų bazė buvo panaudota įvertinti taikinių genų sąsajas ir jų funkcijas.

2.16. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software Inc*). Rezultatai pateikiami kaip vidurkiai kartu su standartiniais nuokrypiais arba mediana su interkvartiliniu pločiu (25% - 75% imties intervalas), nebent paveikslo apraše nurodyta kitaip. Mano-Vitnio testas naudotas nustatyti reikšmingus skirtumus tarp nesusijusių mėginių grupių, o Vilkoksono kriterijus susijusioms imtims. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo (α) yra 0,05. * – p reikšmė $< 0,05$; ** – p reikšmė $< 0,01$; *** – p reikšmė $< 0,001$.

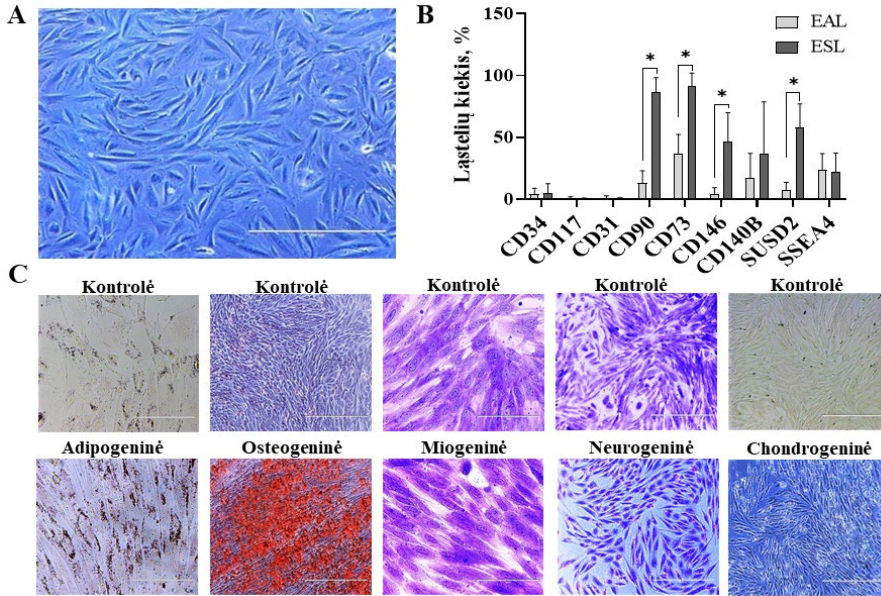
3. REZULTATAI

3.1. Endometriumo ląstelių charakterizavimas

Išskyrus endometriumo ląsteles iš pacientų endometriumo audinio mėginių, ląstelės toliau buvo charakterizuojamos vertinant jų morfologiją, paviršiaus žymenų raišką ir diferenciacijos potencialą. Skirtingų pacientų ESL gebėjo augti prisitvirtinusios prie auginimo flakono paviršiaus ir pasižymėjo fibroblastų tipo morfologija (3.1 pav. A). Taip pat buvo įvertinta ir įvairių endometriumo audinio ląstelių (EAL) suspensija, kuri buvo surinkta iš karto po audinio fermentinės disociacijos, prieš išgryninant ESL kultūrą. EAL ir ESL palygintos atliekant paviršiaus žymenų raiškos analizę naudojant tėkmės citometriją (3.1 pav. B). Rezultatai atskleidė, kad abi ląstelių grupės, pasižymėjo labai žemu hematopoetinių ląstelių žymenų CD34 (< 5 %) ir CD117 (< 1 %), bei endotelinėms ląstelėms būdingo baltymo CD31 kiekiu (< 1,1 %). Palyginus MSL žymenų raišką, nustatyta, kad reikšmingai didesnė ląstelių dalis ESL grupėje pasižymi CD90 (6,7 karto, atitinkamai 86,3 ir 12,9 %) ir CD73 (2,5 karto, atitinkamai 91,2 ir 37,1 %) raiška lyginant su EAL. Taip pat, ESL grupėje nustatytas reikšmingai didesnis endometriumo kamieninių ląstelių žymenų CD146 (11,3 karto, atitinkamai 46,5 ir 4,1 %) ir SUSD2 (7,7 karto, atitinkamai 57,7 ir 7,5 %) lygis nei EAL atveju. CD140b (atitinkamai 36,9 ir 16,9 %) ir SSEA4 (atitinkamai 22 ir 24 %) raiškos lygiai tarp ESL ir EAL reikšmingai nesiskyrė. Gauti rezultatai patvirtino, kad iš pacientų endometriumo mėginių išskyrus kompleksišką audinio ląstelių suspensiją ir ją kultivuojant yra išgryninama ESL populiacija, kuriai būdinga aukšta mezenchiminių ir endometriumo kamieninių ląstelių žymenų raiška.

Toliau buvo įvertintas ESL diferenciacijos potencialas, indukuojant ląsteles diferencijuoti adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine ir chondrogenine kryptimis (3.1 pav. C). Visų krypčių diferenciacijos efektyvumas įvertintas kokybiškai, atliekant ląstelių dažymą atitinkamais dažais. Adipogeninė diferenciacija patvirtinta dažant *Oil Red O* dažu, kuris raudonai nudažo riebalų lašelių sankaupas ląstelių citoplazmoje. Diferenciacija osteogenine kryptimi nustatyta dažant ląsteles *Alizarin Red S* dažu, kuris išryškina kalcio sankaupas. Miogeninės diferenciacijos įvertinimui ląstelės buvo dažytos Kristalo Violetu, siekiant išryškinti ląstelių morfologiją ir nustatyti daugiabranduoles ląsteles, tačiau tokie pokyčiai nebuvo nustatyti. Paveikus ESL neurogenine indukcijos terpę pastebėta, kad ląstelės pradėjo formuoti pailgas neuronų tipo citoplazmines ataugas. Chondrogeninė diferenciacija patvirtinta naudojant *Alcian Blue* dažą, kuris mėlynai nudažo glikozaminoglikanus. Taigi, šie rezultatai patvirtina, kad iš pacientų

endometriumo mėginių išskirtoms ESL yra būdingas ne tik mezenchiminės ląstelių kilmės (adipogeninė, osteogeninė, chondrogeninė), bet ir platesnis diferenciacijos potencialas įskaitant ektodermos ląstelių kilmės kryptį (neurogeninė).



3.1 pav. ESL bendrųjų charakteristikų įvertinimas. A. ESL morfologija (pažymėtas mastelis = 100 μm). B. Paviršiaus žymenų raiška EAL ($n = 16$) ir ESL ($n = 22$) grupėse, nustatyta atliekant tėkmės citometrijos analizę. Pateikiami rezultatų vidurkiai ± standartiniai nuokrypiai. C. ESL diferenciacijos adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine ir chondrogenine kryptimis efektyvumo įvertinimas atliktas nudažant atitinkamais dažais (*Oil Red O*, *Alizarin Red S*, Kristalo Violetas, *Alcian Blue*). * - p reikšmė < 0,05 apskaičiuota naudojant Mano-Vitnio kriterijų. EAL – endometriumo audinio ląstelės; ESL – endometriumo stromos ląstelės (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

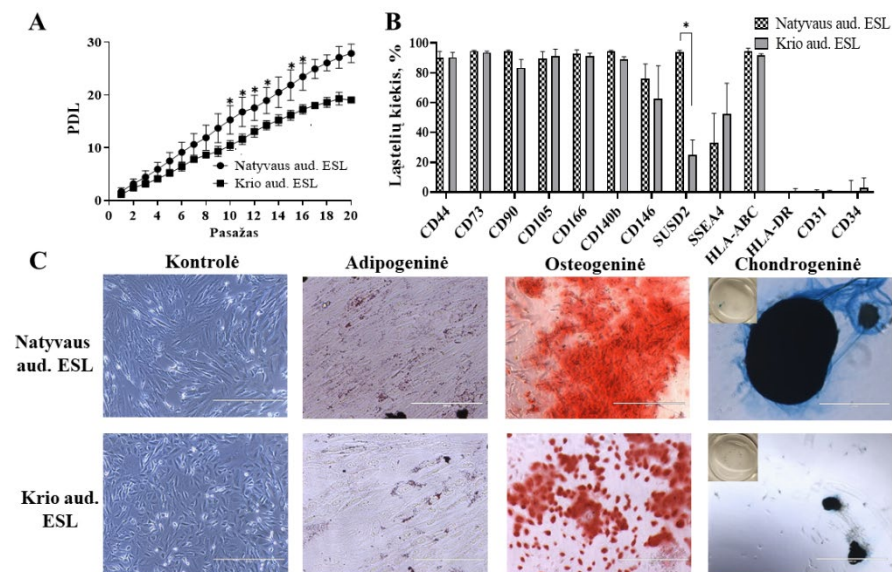
3.2. Endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtakos įvertinimas

Siekiant nustatyti endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaką molekuliniais procesams, palyginome audinių ir iš jų išskirtų stromos ląstelių charakteristikas tarp neužšaldytų audinių (Natyvus) ir po gilaus užšaldymo atšildytų (Krio) audinių grupių. Pirmiausia palyginome iš nešaldyto ir užšaldyto audinio išskirtų ESL (3.19 pav.) bendrąsias charakteristikas, tokias kaip proliferacinis efektyvumas, paviršiaus žymenų raiška ir diferenciacijos potencialas. Mūsų atlikto tyrimo metu nustatėme, kad ESL išskirtos tiek iš

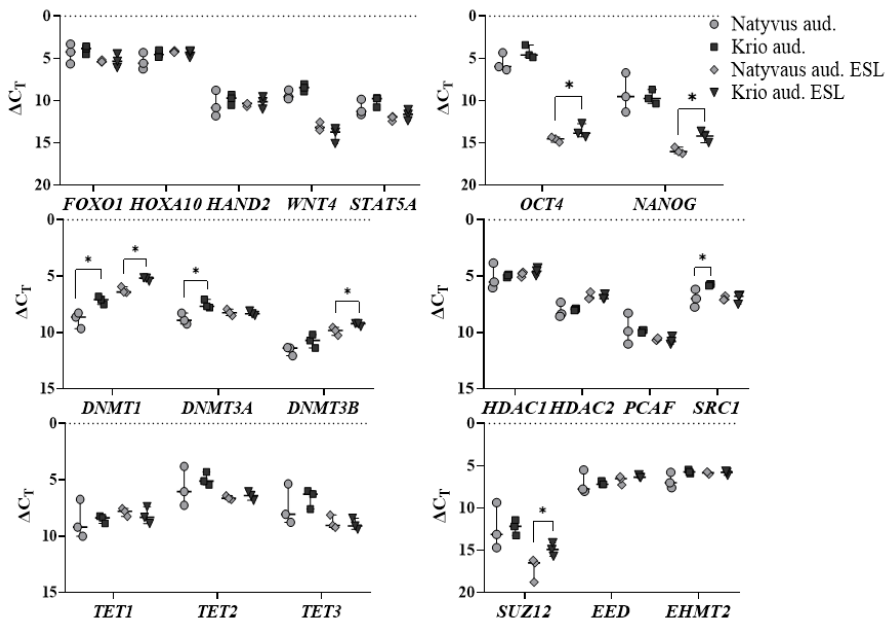
Natyvaus, tiek iš Krio audinių gebėjo proliferuoti ilgalaikėje kultūroje (analizuota iki 20 pasažo), tačiau Krio aud. ESL ląstelių proliferacinis efektyvumas po 10 pasažo sumažėjo 1,5 karto lyginant su Natyvaus aud. ESL (3.2 pav. A). Ankstyvo pasažo Natyvaus ir Krio aud. ESL pasižymėjo panašiu MSL būdingų paviršiaus žymenų raiškos profiliu (CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA4, HLA-ABC) (3.2. pav. B). Tačiau nustatytas 3,8 karto sumažėjęs SUSD2 raiška pasižyminčių ląstelių kiekis Krio aud. ESL grupėje lyginant su Natyvaus aud. ESL (3.19 pav. B). Abiejose grupėse nustatyta labai maža (< 3 %) endotelinių ir hematopoetinių žymenų raiška (CD31, CD34, HLA-DR). Įvertinus ląstelių diferenciacijos potencialą, nustatėme, kad Krio aud. ESL kaip ir Natyvaus aud. ląstelės gebėjo efektyviai diferencijuoti trimis mezenchiminės kilmės kryptimis (adipogenine, osteogenine ir chondrogenine) (3.19 pav. C). Chondrogeninės diferenciacijos metu Krio aud. ESL formavo keletą mažų 3D struktūrų vietoje vienos didelės struktūros kaip Natyvaus aud. ESL atveju. Tačiau chondrogeninė diferenciacija buvo patvirtinta ląsteles dažant *Alcian Blue* dažu mėlynai nudažančiu glikozaminglikanus, besikaupiančius kremzlinės diferenciacijos metu. Nepaisant nustatyto sumažėjusio proliferacijos efektyvumo vėlyvesnėje kultivavimo fazėje ir SUSD2 raiškos lygio Krio aud. ESL atveju, bei pakitusio *in vitro* chondrogeninės diferenciacijos efektyvumo, iš užšaldytų audinių išskirtos ankstyvo pasažo stromos ląstelės išlaikė panašias paviršiaus žymenų raiškos, proliferacijos ir diferenciacijos potencialo savybes, būdingas nešaldyto audinio stromos ląstelėms.

Palyginus bendrąsias iš Natyvaus ir Krio endometriumo audinio išskirtų stromos ląstelių savybės, toliau analizavome genų raiškos pokyčius, kuriuos galėjo sukelti audinio lėto gilaus užšaldymo ir atšildymo procesai. Tam pasiekti tyrėme iRNR išskirtą tiesiogiai iš Natyvaus ir Krio endometriumo (atitinkamai Natyvus ir Krio aud.) audinio mėginių bei iš šių audinių išskirtų ESL (Natyvaus ir Krio aud. ESL) (3.3 pav.). Išanalizavus genų raiškos pokyčius nustatėme, kad pluripotentiškumo žymenų *OCT4* ir *NANOG* raiška reikšmingai padidėjo Krio aud. ESL grupėje lyginant su Natyvaus aud. ESL (atitinkamai 2,2 ir 3,3 karto). Krio mėginiuose (Krio aud. Ir Krio aud. ESL) taip pat buvo nustatyta reikšmingai padidėjusi DNR metiltransferazių genų raiška lyginant su Natyvaus aud. mėginių atitikmenimis. *DNMT1* raiškos padidėjimas nustatytas lyginant tarpusavyje ir audinių (3,1 karto), ir ląstelių mėginius (2 kartus), o *DNMT3A* raiškos padidėjimas nustatytas lyginant Krio ir Natyvius audinius (2,4 karto), o *DNMT3B* – ląsteles (1,5 karto). Be to, buvo nustatytas reikšmingas 4 kartų *SUZ12* raiškos padidėjimas lyginant Krio aud. ESL su Natyvaus aud. ESL, o 2,1 karto *SRC1* raiškos padidėjimas aptiktas Krio aud. lyginant su Natyviu aud. Mūsų analizės metu nenustatėme

reikšmingos gilaus užšaldymo ir atšildymo procesų įtakos genų, susijusių su endometriumo funkcija (*FOXO1*, *HOXA10*, *HAND2*, *WNT4*, *STAT5A*), DNR demetilinimu (*TET1*, *TET2*, *TET3*) ir histonų modifikacijų reguliatorių (*EED*, *EHMT2*, *HDAC1*, *HDAC2*, *PCAF*), raiškai. Apibendrinant po audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo nustatyti pluripotentiškumo žymenų ir DNMT genų raiškos pokyčiai. Tuo pačiu pademonstravome, kad su endometriumo funkcionavimu, DNR demetilinimu ir histonų modifikacijomis susijusių genų raiška po audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo išlieka nepakitusi.

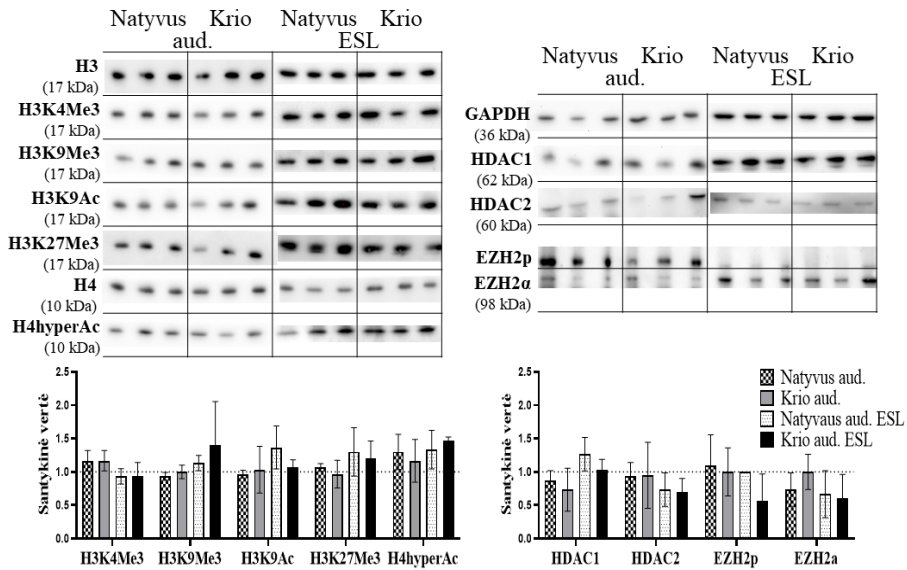


3.2 pav. ESL išskirtų iš nešaldyto (Natyvus) ir šaldyto (Krio) audinio charakteristikų palyginimas. A. Natyvaus ir Krio aud. ESL *in vitro* proliferacijos potencialas. Grafike pateikti populiacijos dvigubėjimo lygio (PDL) pokyčiai pasaužuojant ląsteles iki 20 pasažo. Rezultatai pateikiami kaip mediana su interkvartiliniu pločiu, $n = 3$. B. Natyvaus ir Krio aud. ESL paviršiaus žymenų raiškos įvertinimas nustatytas tėkmės citometrijos analizės metu. Rezultatai pateikiami kaip mediana su interkvartiliniu pločiu, $n = 3$. C. Natyvaus ir Krio aud. ESL diferenciacijos potencialo įvertinimas. Apidogeninė diferenciacija patvirtinta dažant *Oil Red O*, osteogeninė – *Alizarin Red S*, o chondrogeninė *Alcian Blue* dažu. Nuotraukose pažymėtas mastelis = 400 μm (išskyrus apidogeninę, kur = 100 μm , ir chondrogeninę diferenciaciją, kur = 1000 μm). * - p reikšmė $< 0,05$, apskaičiuota pagal Mano-Vitnio kriterijų. ESL – endometriumo stromos ląstelės (Žukauskaitė *et al.*, 2024, pagal autoriui priklausančią teisę).



3.3 pav. Genų raiškos pokyčiai nustatyti po endometriumo audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo. Nešaldyto (Natyvus aud.) ir šaldyto endometriumo audinio (Krio aud.) ir išskirtų ESL (atitinkamai Natyvaus ir Krio aud. ESL) genų raiškos palyginimas. Genų raiška įvertinta atlikus AT-kPGR, gauti rezultatai normalizuoti naudojant geometrinę *GAPDH* ir *RPL13A* raiškų verčių vidurkį. Vidurinė linija grafikuose žymi medianą, $n = 3$. * - p reikšmė $< 0,05$, apskaičiuota pagal Mano-Vitnio kriterijų. Aud. – audinys, ESL – endometriumo stromos ląstelės (Žukauskaitė *et al.*, 2024, pagal autoriui priklausančią teisę).

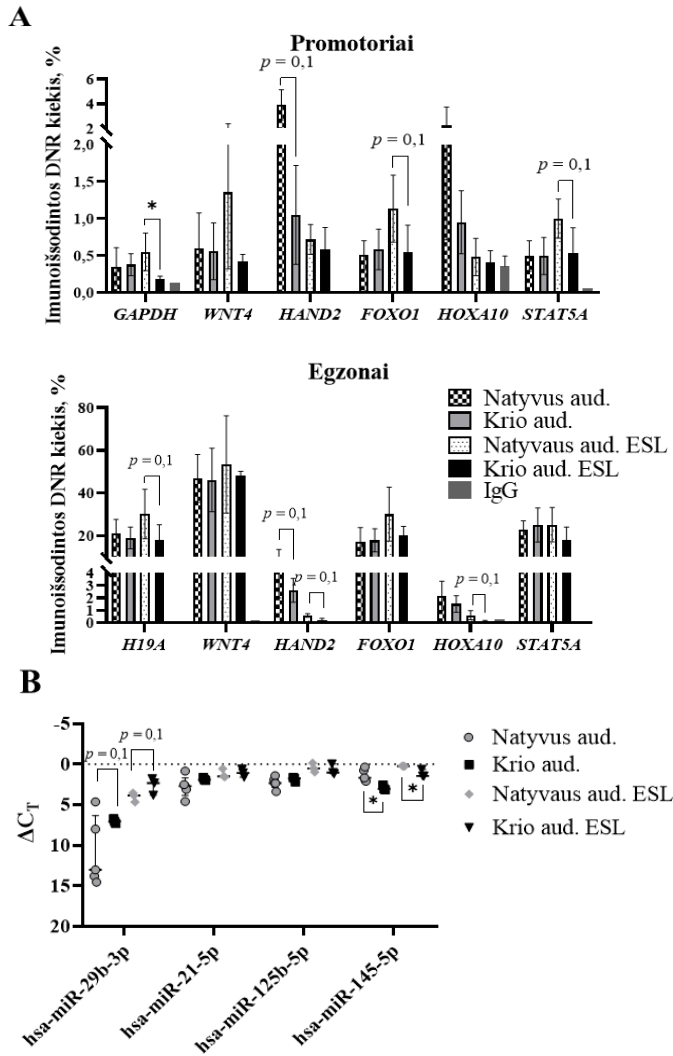
Sekančiame tyrimo etape vertinome endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaką pasirinktų histonų modifikacijų, susijusių tiek su aktyviu, tiek su užslopintu chromatinu, ir šias modifikacijos reguliuojančių veiksnių lygio pokyčiams tarp Natyvaus ir Krio aud. ESL mėginių (3.4 pav.). Nustatėme, kad endometriumo audinio gilus užšaldymas neturi reikšmingos įtakos nei tirtų histonų modifikacijų (H3K9Me3, H3K9Ac, H4hyperAc, H3K9Me3, H3K27Me3), nei jas modifikuojančių veiksnių, įskaitant PCR2 funkcinio subvieneto izoformų (EZH2 α , EZH2 β) ir histonų deacetilazių (HDAC1, HDAC2), lygio pokyčiams. Šie rezultatai leidžia teigti, kad analizuotos histonų modifikacijos išlieka stabilios po endometriumo audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo ir nesiskiria iš neužšaldytų ir užšaldytų audinių išskirtose ESL.



3.4 pav. Endometriumo gilaus užšaldymo įtaka histonų modifikacijų ir epigenetinių reguliatorių lygiams. Reprerzentatyvūs *Western Blot* membranų vaizdai ir kiekybinis histonų modifikacijų lygio vertinimas ($n = 3$). Nešaldyto (Natyvus aud.) ir šaldyto endometriumo audinio (Krio aud.) ir išskirtų ESL (atitinkamai Natyvaus ir Krio aud. ESL) palyginimas. Rezultatų kiekybinė analizė atlikta naudojant ImageJ programinę įrangą, baltymų kiekis normalizuotas pagal histonų H3 ir H4 (histonų modifikacijos) arba GAPDH kiekius (modifikuojantys veiksniai). Rezultatai pateikiami kaip mediana su interkvartiliniu pločiu. Aud. – audinys, ESL – endometriumo stromos ląstelės (Žukauskaitė *et al.*, 2024, pagal autoriui priklausančią teisę).

Kadangi mūsų gauti ir aukščiau aprašyti genų raiškos pokyčių rezultatai atskleidė, kad po gilaus endometriumo audinio užšaldymo ir atšildymo padidėja DNR metiltransferazių genų raiškos lygis, toliau analizavome DNR metilinimo lygio pokyčius su endometriumo funkcija susijusių genų promotorių ir egzonų srityse lygindami DNR išskirtą iš Natyvaus ir Krio audinio, bei iš tokių audinių mėginių išskirtų stromos ląstelių. Lyginant Natyvaus ir Krio endometriumo audinius nustatėme tendenciją, kad Krio grupės mėginiai pasižymi 3,7 karto mažesniu *HAND2* promotoriaus sekos ir 3 kartus mažesniu egzoninės dalies DNR metilinimu (abiem atvejais $p = 0,1$) (3.5 pav. A). Lyginant iš Natyvaus ir Krio aud. išskirtas ESL, Krio aud. ESL pasižymi statistiškai reikšmingai 2,9 karto sumažėjusiu *GAPDH* promotoriaus sekos DNR metilinimo lygiu. Be to, sumažėjęs DNR metilinimo lygis nustatytas ir kitose genomines vietose, tokiose kaip *HI9A* regionas, *FOXO1* ir *STAT5A* promotoriai, bei *HAND2* ir *HOXA10* baltymus koduojančios sritys, tačiau šie skirtumai, dėl sąlyginai nedidelės imties ($n = 3$), nebuvo statistiškai

reikšmingi ($p = 0,1$). Šie rezultatai leidžia manyti, kad po endometriumo audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo, sumažėja DNR metilinimo lygis įvairiose geno srityse.

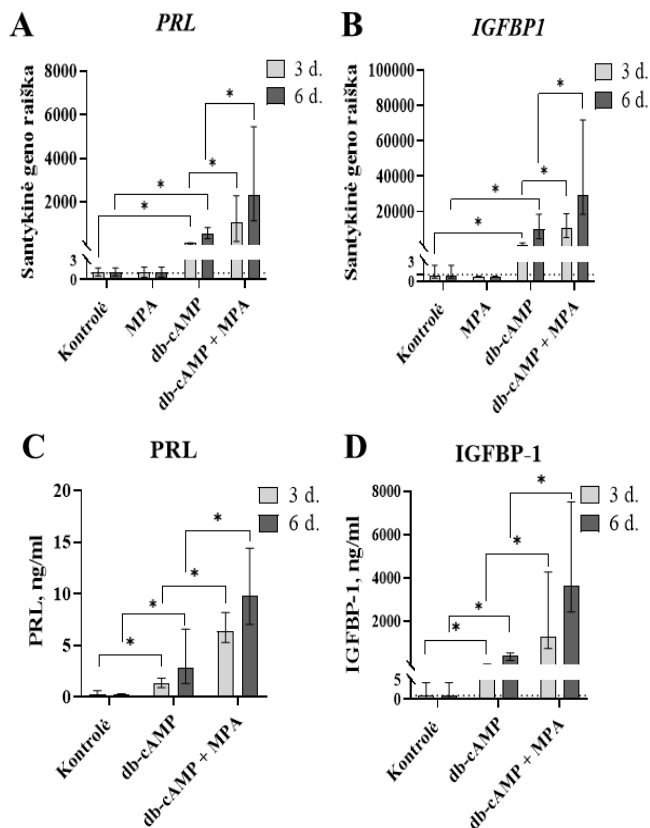


3.5 pav. Endometriumo gilaus užšaldymo įtaka DNR metilinimo lygio ir miRNR raiškos pokyčiams analizuojant endometriumo audinių ir stromos ląstelių mėginius A. DNR metilinimo lygis nustatytas su endometriumo funkcija susijusių genų promotorių ir egzonų srityse. IgG atitinka neigiamą imunoišsodinimo kontrolę. Rezultatai pateikiami kaip mediana su interkvartiliniu pločiu, $n = 3$. B. miRNR raiškos lygiai. Nustatytas RNU48 raiškos lygis naudotas bendro miRNR kiekio normalizavimui. Vidurinė linija grafikuose žymi medianą, $n = 3$ (Natyvus aud. $N = 5$, dėl nustatyto didesnio verčių išsibarstymo). * - p reikšmė $< 0,05$, apskaičiuota pagal Mano-Vitnio kriterijų. aud. – audinys, ESL – endometriumo stromos ląstelės (Žukauskaitė *et al.*, 2024).

Taip pat įvertinome miRNR, kurios yra svarbios reprodukcinių audinių po-transliacinėje reguliacijoje, raiškos lygių skirtumus tarp Natyvių ir Krio aud. mėginių. Nustatėme statistiškai reikšmingą hsa-miR-145-5p raiškos sumažėjimą Krio endometriumo audinių (Krio aud., 3,3 karto) ir ESL (2 kartus) grupėse lyginant su Natyvių mėginių atitikmenimis (3.5 pav. B). Taip pat nustatėme hsa-miR-29b-3p lygio padidėjimo tendencijas tiek lyginant Natyvius ir Krio aud., tiek ir ESL mėginius, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p = 0,1$). Nenustatėme hsa-miR-125b-5p ir hsa-miR-21-5p raiškos pokyčių tarp Natyvių ir Krio aud. mėginių. Apibendrinant, endometriumo audinio gilus užšaldymas yra susijęs su DNR metilavimo veiksnių raišką reguliuojančių miRNR tokių kaip hsa-miR-145-5p lygio sumažėjimu ir hsa-miR-29b-3p lygio padidėjimo tendencija.

3.3. ESL decidualizacijos įvertinimas

Charakterizavus ESL ir įvertinus endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaką šių ląstelių savybėms, toliau buvo vertinamas endometriumo audiniui būdingas ESL decidualizacijos efektyvumas. Įprasta ESL auginimo terpė pakeista decidualizacijos indukcijos terpe, kurios sudėtis papildyta pridodant 0,5 mM db-cAMP arba 0,5 mM db-cAMP kartu su 1 μ M MPA. ESL decidualizacija buvo indukuojama 3 ir 6 d., po kurių ląstelės surinktos RNR skyrimui ir genų raiškos analizei, o ląstelių augimo terpė su ESL sekretuojamomis molekulėmis – baltymų kiekio įvertinimui naudojant *ELISA*. ESL decidualizacijos efektyvumas įvertintas analizuojant decidualizacijai būdingų sekretuojamų baltymų PRL ir IGFBP-1 kiekius bei jų genų raišką. Mūsų atlikto tyrimo metu patvirtinome, kad po db-cAMP poveikio padidėja decidualizacijos genų raiška. Po 3 d. nuo decidualizacijos indukcijos su db-cAMP pradžios *PRL* raiška padidėja 160 kartų, o po 6 d. – 600 kartų lyginant su kontrolinėmis ESL (3.6 pav. A). Dar didesnis genų raiškos pokytis lyginant su kontrole nustatytas *IGFBP1* atveju (po 3 d. – 860 kartų, o po 6 d. – 8500 kartų, 3.6 pav. B). Decidualizacijos indukcijos terpės su db-cAMP papildymas MPA lėmė reikšmingą *PRL* (po 3 d. – 8,7 karto, o po 6 d. – 5,5 karto 3.2 pav. A) ir *IGFBP1* (po 3 d. – 17 kartų, o po 6 d. – 6,1 karto, 3.2 pav. B) raiškos padidėjimą lyginant su diferenciacijos terpe, kurios sudėtyje buvo tik db-cAMP. Tačiau naudojamas atskirai, MPA neturėjo įtakos šių genų raiškos aktyvavimui.



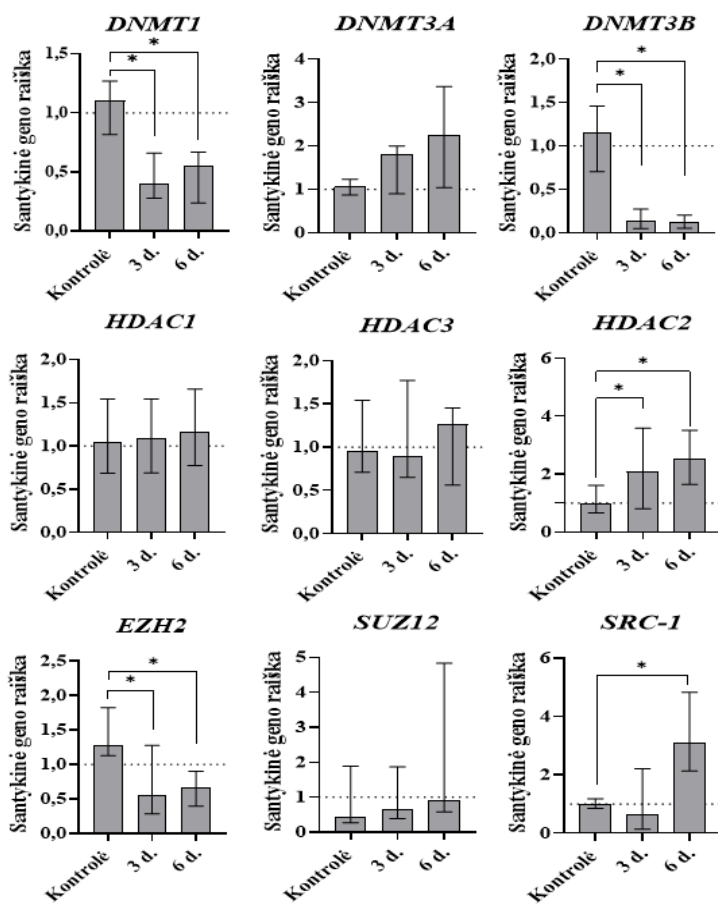
3.6 pav. ESL decidualizacijos įvertinimas. Decidualizacijos efektyvumas įvertintas ištyrus *PRL* (A) ir *IGFBP1* (B) genų raiškos pokyčius po 3 ir 6 ESL decidualizacijos dienų ($n = 6$). Genų raiška įvertinta atlikus AT-kPGR, nustatytas *GAPDH* raiškos lygis panaudotas kaip vidinė kontrolė iRNR kiekio normalizavimui. Rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą ir pateikti kaip pokytis lyginant su kontrolinėmis (neveiktomis) ląstelėmis. Decidualizacija taip pat patvirtinta išmatavus sekretuojamų PRL (C) ir IGFBP-1 (D) baltymų kiekius ESL kultivavimo terpėje ($n = 4$). Pateikiamos rezultatų medianos su interkvartiliniais pločiais. * - p reikšmė $< 0,05$, apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

Išanalizavus indukuotą decidualizacijai ESL terpes buvo patvirtinta, kad db-cAMP poveikis lėmė ne tik genų raiškos padidėjimą, bet ir į užląstelinę erdvę sekretuotų PRL (po 3 d. – 3,7 karto, o po 6 d. – 12,5 karto, 3.6 pav. C) ir IGFBP-1 (po 3 d. – 16,9 karto, o po 6 d. – 290 kartų, 3.6 pav. D) baltymų kiekio reikšmingą išaugimą lyginant su kontrole. Po MPA pridėjimo į decidualizacijos terpę su db-cAMP, kaip ir genų raiškos atveju, nustatytas PRL (po 3 d. – 4,9 karto, po 6 d. – 2,9 karto) ir IGFBP-1 (po 3 d. – 96 kartų, o po 6 d. – 12 kartų) kiekio padidėjimas lyginant su ESL indukuotomis

decidualizuoti tik su db-cAMP. Nustatyta reikšmingai padidėjusi decidualizacijos žymenų raiška patvirtina, kad pasirinktas ESL *in vitro* decidualizacijos modelis naudojant decidualizacijos induktorius db-cAMP ir MPA yra tinkamas tolimesnei šio proceso molekulinį mechanizmų analizei.

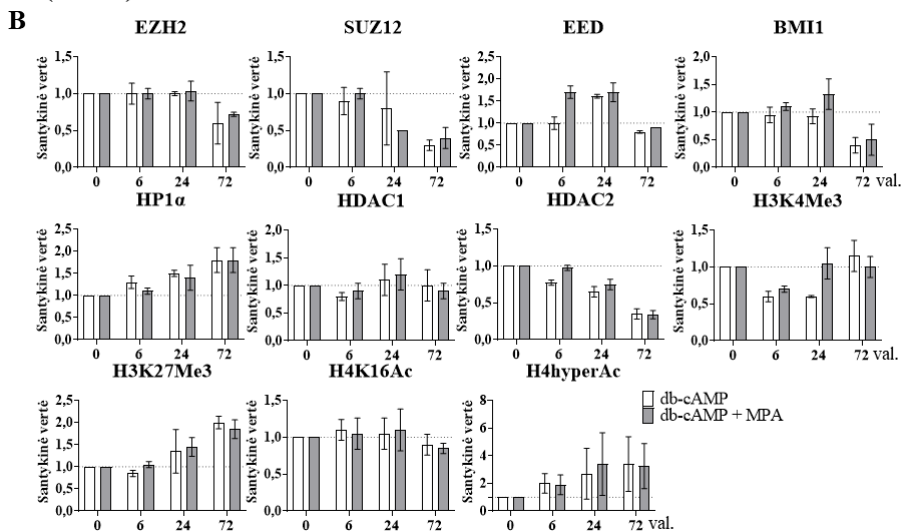
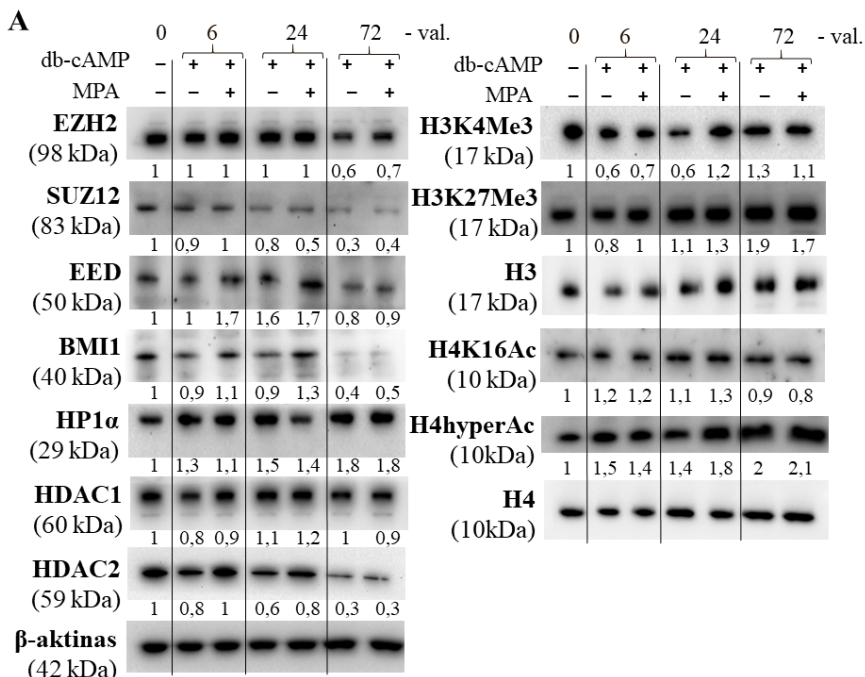
3.4. Epigenetinių reguliatorių ir jų katalizuojamų modifikacijų pokyčiai ESL diferenciacijos metu

Išskyrus bei charakterizavus ESL ir patvirtinus decidualizacijos indukcijos modelio naudojant db-cAMP ir MPA tinkamumą, toliau analizavome ESL decidualizacijos metu vykstančius epigenetinius pokyčius. Pirmiausia buvo įvertinti epigenetinių moduliatorių genų raiškos pokyčiai ESL decidualizacijos metu (3.7 pav.). Nustatėme, kad trečiąją indukuotos decidualizacijos dieną reikšmingai sumažėja DNR metiltransferazių *DNMT1* (2,8 karto) ir *DNMT3B* (8,6 karto) raiškos lygiai. Šių genų raiškos reikšmingas sumažėjimas nustatytas ir po 6 d. Taip pat nustatyta padidėjusi *DNMT3A* raiška, tačiau šis pokytis nebuvo statistiškai reikšmingas. Išanalizavus histonų acetilinimą reguliuojančius veiksnius koduojančių *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* ir *SRC-1* raiškos lygius, buvo nustatytas tik *HDAC2* (po 3 d. – 2,2 karto, o po 6 d. 2,6 karto) ir *SRC-1* (po 6 d. 3,3 karto) raiškos padidėjimas. Analizuodami su histonų metiliniu susijusių veiksnių genų raišką nustatėme, kad diferenciacijos metu reikšmingai sumažėja *EZH2* (po 3 d. – 2,5 karto, o po 6 d. – 2,2 karto) raiška, o *SUZ12* atveju išryškėjo tendencija, kad šių genų raiškos lygis didėjo ESL decidualizacijos metu, tačiau šie pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi. Taigi, mūsų tyrimo rezultatai patvirtino, kad decidualizacijos stimulo signalas lemia ESL epigenetinius mechanizmus reguliuojančių veiksnių iRNR kiekio pokyčius, susijusius su DNR metiliniu ir histonų acetilinimo bei metilavimo modifikacijomis.



3.7 pav. Epigenetinių veiksnių genų raiškos analizė ESL decidualizacijos metu. Genų raiškos pokyčiai nustatyti atlikus AT-kPGR 3-ąją ir 6-ąją ESL decidualizacijos dieną indukcijai naudojant db-cAMP ir MPA. Nustatytas *GAPDH* raiškos lygis naudojamas kaip vidinė kontrolė bendram iRNR kiekiui normalizavimui. Rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą ir pateikti kaip pokytis lyginant su kontrolinėmis (neveiktomis) ląstelėmis. Pateikiami rezultatų vidurkiai \pm standartiniai nuokrypiai ($n = 6$). * - p reikšmė $< 0,05$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

Išanalizavus epigenetinių reguliatorių genų raiškos pokyčius ESL decidualizacijos metu, toliau tyrėme ar šie pokyčiai taip pat aptinkami ir epigenetinių reguliatorių baltymų bei jų katalizuojamų histonų modifikacijų lygyje pasitelkiant *Western Blot* analizę (3.8 pav.).

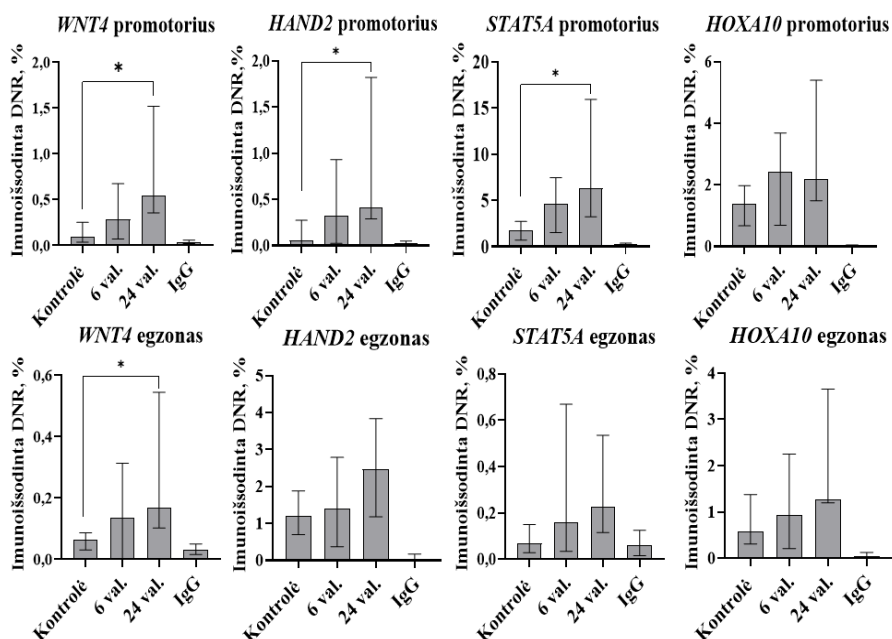


3.8 pav. Epigenetinių veiksmių ir histonų modifikacijų pokyčiai ESL decidualizacijos metu. A. Reprezentatyvūs *Western Blot* membranų vaizdai. B. Kiekybinio baltymų kiekio vertinimo *Western Blot* metodu rezultatai ($n = 2$). Rezultatai pateikiami mediana su tarpkvartiliniu pločiu. Baltymų kiekių pokyčiai, indukuojant ESL decidualizaciją, naudojant tik db-cAMP arba kombinacijoje su MPA, vertinti praėjus 6, 24 ir 72 val. nuo indukcijos pradžios. Intensyvumas išmatuotas naudojant ImageJ programinę įrangą ir normalizuotas pagal β -aktino bei histonų H3 ir H4 kiekius. Skaitiniai rezultatai pateikti lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis (0 val.) (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

Parodėme, kad PRC2 komplekso, kuris katalizuoja histono H3 27-to lizino trimetilinimą ir sąlygoja transkripcijos supresiją, subvienetų EZH2, SUZ12 bei polikombo slopinančio komplekso 1 (PRC1) komponento BMI1 baltymų raiškos lygis sumažėjo po 72 val. nuo ESL decidualizacijos indukcijos pradžios. Taip pat nustatėme, kad H3K27Me3 lygis padidėjo beveik du kartus. HP1 α baltymo, kuris siejamas su heterochromatinu, kiekis taip pat padidėjo ESL decidualizacijos eigoje. Histonų deacetilazių atveju nenustatėme skirtumų tarp HDAC1 kiekio skirtingais decidualizacijos laiko etapais, o HDAC2 kiekis jau po 24 val. pradėjo mažėti. Ryškiausias pokytis buvo nustatytas aktyvios chromatinos žymės H4hyperAc atveju, kuomet padidėjimas išryškėjo jau po 6 val. nuo ESL decidualizacijos indukcijos pradžios. Išanalizavus kitas, su aktyvia transkripcija susijusias, histonų modifikacijas nustatėme, kad H3K4Me3 ir H4K16Ac modifikacijų lygiai nekito tirtais ESL decidualizacijos laiko etapais. Taigi, apibendrinant galima teigti, kad ESL decidualizacijos indukcija yra susijusi tiek su neaktyvia (H3K27Me3, PRC2 komponentai), tiek ir su aktyvia (H4hyperAc, HDAC2) chromatinos būseną susijusių modifikacijų ir veiksmų lygio pokyčiais.

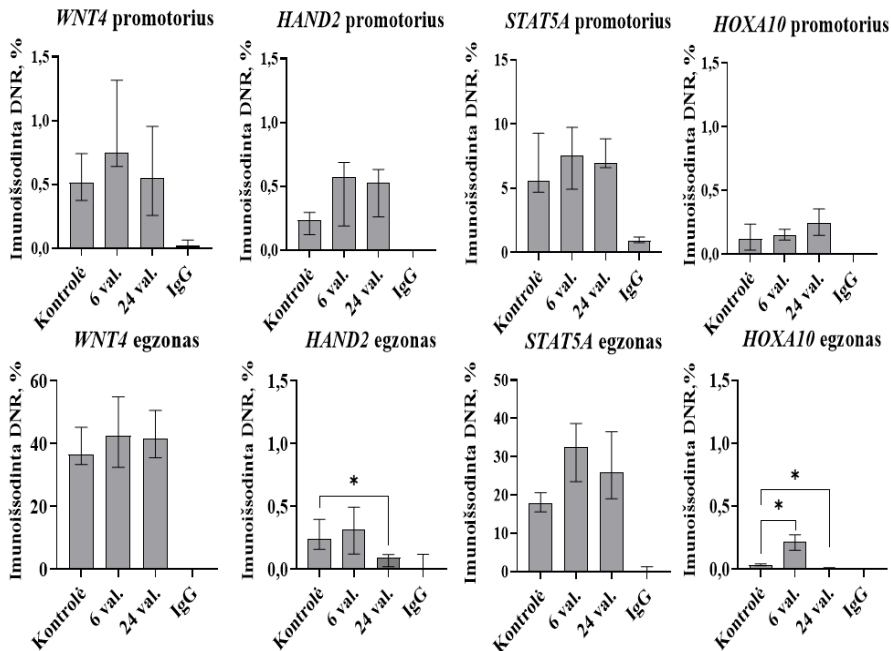
3.5. H4hyperAc ir DNR metilinimo pokyčiai su decidualizacija susijusių genų srityse

Kadangi parodėme, kad bendras H4hyperAc lygis didėja ESL decidualizacijos metu, toliau siekėme išsamiau iširti, kaip šios aktyvaus chromatinos žymės lygis kinta specifiskai su decidualizacija susijusių genų promotorių ir baltymus koduojančiose srityse (egzonuose) (3.9 pav.). Atliekant chromatinos imunoišsodinimo reakciją (ChIP) buvo naudojami antikūnai prieš H4hyperAc, o išsodinta DNR įvertinta atliekant kiekybinę PGR su pradmenimis nutaikytais į specifinių genų promotorių ir egzonų sritis. Nustatėme reikšmingą H4hyperAc lygio padidėjimą *WNT4* (6,3 karto), *HAND2* (7,3 karto) ir *STAT5A* (4,1 karto) promotorių regionuose ESL praėjus 24 val. nuo decidualizacijos indukcijos pradžios lyginant su kontrole. Taip pat H4hyperAc lygio didėjimo tendencija nustatyta ir *HOXA10* promotorių srityse, tačiau šie pokyčiai nebuvo statistiskai reikšmingi. Ištyrus visų analizuotų genų egzonų sritis, tik *WNT4* (4,6 karto) atveju nustatytas reikšmingas H4hyperAc lygio padidėjimas. Apibendrinant gautus duomenis nustatėme, kad vykstant ESL decidualizacijai H4hyperAc lygis didėja specifiskai su decidualizacija susijusių genų promotorių srityse.



3.9 pav. Histono H4hyperAc pokyčiai su decidualizacija susijusių genų srityse ESL decidualizacijos metu. H4hyperAc lygio kiekybinis vertinimas su decidualizacija susijusių genų promotorių ir egzonų srityse atliktas naudojant ChIP ir kPGR metodus. IgG yra neigiama imunoišsodinimo kontrolė. Rezultatai pateikiami medianomis su interkvartiliniais pločiais ($n = 4$). * - p reikšmė $< 0,05$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

Įvertinus histono H4hyperAc lygio pokyčius su decidualizacija susijusių genų srityse, toliau siekėme nustatyti DNR metilinimo pokyčius tuose pačiuose regionuose atliekant metilintos DNR imunoišsodinimą (MeDIP) naudojant antikūną prieš 5-metilcitoziną ir išsodintą DNR toliau vertinant kPGR metodu. Nustatėme, kad DNR metilinimo lygis tirtų genų promotorių srityse yra labai žemas ir nekito ESL decidualizacijos metu (3.10 pav.). *WNT4* ir *STAT5A* genų egzoninėse srityse nustatytas didesnis DNR metilinimo lygis nei promotorių srityse, tačiau reikšmingi pokyčiai tarp decidualizuotų ESL ir neveiktų kontrolinių ląstelių nenustatyti.



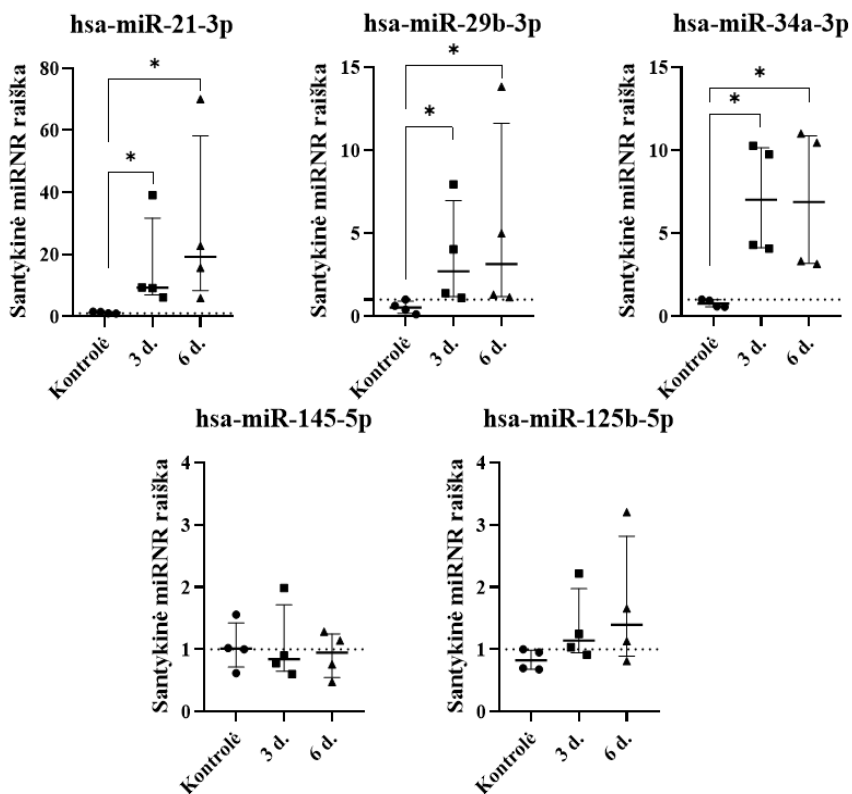
3.10 pav. DNR metilinimo pokyčiai su decidualizacija susijusių genų srityse ESL decidualizacijos metu. DNR metilinimo lygio kiekybinis įvertinimas su decidualizacija susijusių genų promotorių ir egzonų srityse nustatytas atliekant MeDIP ir kPGR. IgG yra neigiama imunoišsodinimo kontrolė. Rezultatai pateikiami medianomis su interkvartiliniais pločiais ($n = 4$). * - p reikšmė $< 0,05$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų (Žukauskaitė *et al.*, 2023; pagal autoriui priklausančią teisę).

HAND2 ir *HOXA10* egzonų sričių DNR metilinimo lygis buvo pakankamai žemas ir reikšmingai sumažėjęs diferencijuotose ESL po 24 val. lyginant su neveikta kontrole (*HAND2* atveju 3,4 karto, o *HOXA10* – 8 kartų). Nepaisant to, *HOXA10* egzono srityje po 6 val. nustatytas netgi 6,5 karto padidėjęs DNR metilinimo lygis lyginant su kontrole. Tačiau nėra aišku, kodėl šios pasirinktos egzonų sritys pasižymi daug žemesniu DNR metilinimo lygiu nei kitų genų egzonų sričių atvejais ir ar nustatyti pokyčiai turi funkcinę reikšmę. Taigi, apibendrinant, DNR metilinimo pokyčiai nebuvo nustatyti su decidualizacija susijusių genų raišką reguliuojančiuose regionuose ir galimai nėra tokie svarbūs ESL decidualizacijos reguliacijoje.

3.6. miRNR pokyčiai ESL decidualizacijos metu

Analizuojant epigenetinius pokyčius, vykstančius ESL decidualizacijos metu, įvertinome miRNR, kurie pagal literatūros duomenis yra svarbūs moters reprodukcinėse audinių funkcijose palaikyme, lygio pasikeitimus. Buvo tirti ir

palyginti hsa-miR-145-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-34a-3p ir hsa-miR-125b-5p kiekiams kontrolinėse ir decidualizuotose ESL praėjus atitinkamai 3 ir 6 d. nuo decidualizacijos indukcijos pradžios. Mūsų tyrimų metu nustatėme, kad šių analizuotų miRNR raiškos lygiai didėja lyginant su kontrole: hsa-miR-21-3p (po 3 d. – 6,1 karto, po 6 d. – 12,9 karto), hsa-miR-29b-3p (po 3 d. – 7,2 karto, po 6 d. – 8,2 karto) ir hsa-miR-34a-3p (po 3 d. – 10,3 karto, po 6 d. – 10,1 karto) (3.11 pav.).

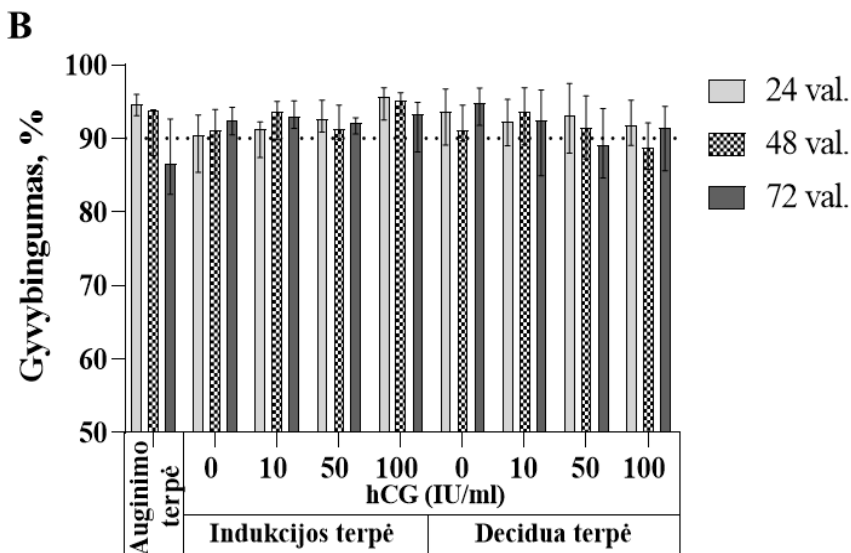
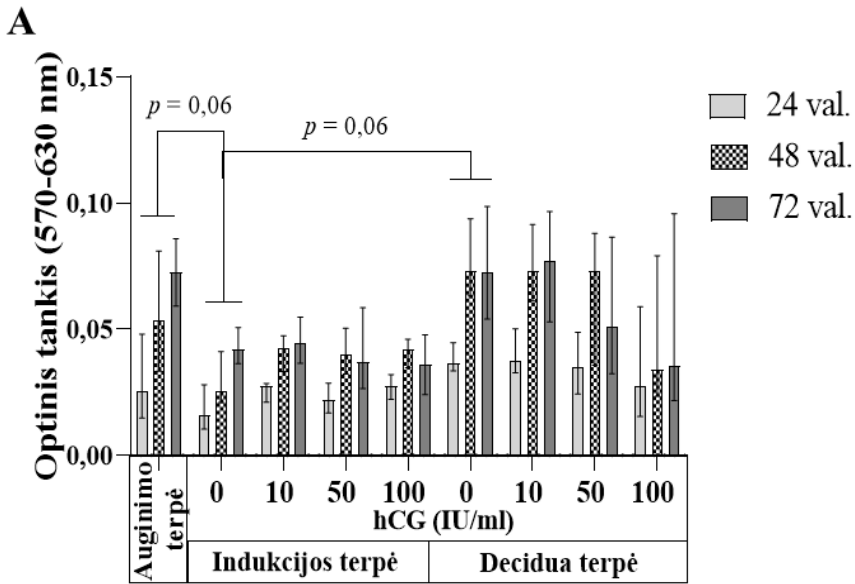


3.11 pav. miRNR pokyčiai ESL decidualizacijos metu. miRNR raiškos lygio kiekybinis įvertinimas nustatytas atliekant AT-kPGR ir naudojant atitinkamas miRNR specifiskai atpažįstančius pradmenis. Nustatytas RNU48 raiškos lygis naudotas kaip vidinė kontrolė bendram miRNR kiekio normalizavimui. Rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą ir pateikti kaip pokytis lyginant su kontrolinėmis (neveiktomis) ląstelėmis. Vidurinė linija žymi imties medianą, o apatinė ir viršutinė tarpkvartilinį plotį ($n = 4$). * - p reikšmė < 0,05 apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų.

hsa-miR-145-5p ir hsa-miR-125b-5p raiškos lygiai nekito ESL decidualizacijos metu. Tad, ESL decidualizacijos indukcija yra susijusi su specifinių miRNR, įskaitant hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p ir hsa-miR-34a-3p, raiškos padidėjimu.

3.7. hCG poveikis ESL savybėms

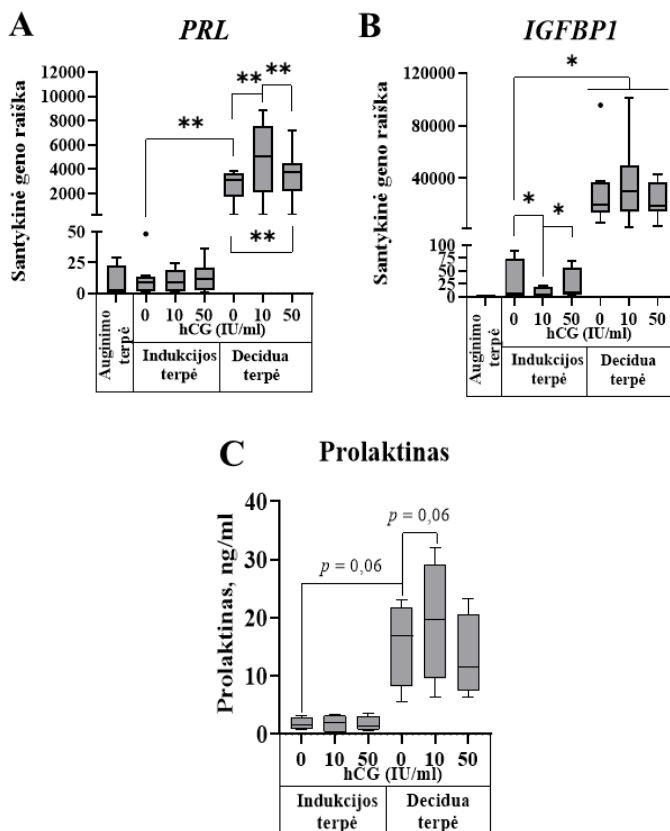
Tolimesniais tyrimo etapais vertinome vieno iš pirmųjų embriono sekretuojamų veiksnių hCG poveikį ESL charakteristikoms, tokioms kaip metabolinis aktyvumas, gyvybingumas ir diferenciacijos potencialas, bei genų raiška ir baltymų kiekiai. hCG įtaka vertinta veikiant neindukuotas ESL arba decidualizuotas ESL. Pirmiausia įvertinome skirtingų hCG koncentracijų poveikį ESL metaboliniam aktyvumui ir gyvybingumui veikiant ląsteles hCG 24, 48 ir 72 valandas. MTT testo rezultatai atskleidė, kad auginimo terpę pakeitus indukcijos terpe (kaip nurodyta 2.4 skyriuje) sumažėja metabolinis aktyvumas (3.12 pav. A). Tačiau, kuomet indukcijos terpė buvo papildyta decidualizacijos induktoriais (Decidualizacijos terpė), metabolinio aktyvumo sumažėjimas nebuvo nustatytas. Vertinant gautus duomenis, nenustatėme reikšmingos skirtingų hCG koncentracijų įtakos ESL metaboliniam aktyvumui, išskyrus išvelgiamą tendenciją, kad 100 IU/ml hCG poveikis decidualizuotose ląstelėse slopina metabolinį aktyvumą. ESL gyvybingumo vertinimas atskleidė, kad tirti poveikiai nesukėlė ląstelių žūties analizuotais laiko etapais (3.12 pav. B), kadangi visais tirtais atvejais nustatytas apie 90 % ląstelių gyvybingumas. Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad 10 ir 50 IU/ml hCG koncentracijų poveikis neturėjo neigiamos įtakos ESL metaboliniam aktyvumui bei gyvybingumui. Vykdam tolimesnius tyrimus atsisakėme 100 IU/ml hCG koncentracijos, dėl neigiamos įtakos ESL metaboliniam aktyvumui, ir pasirinkome 10 ir 50 IU/ml hCG 24 val. poveikius.



3.12 pav. Skirtingų hCG koncentracijų ir decidualizacijos indukcijos įtaka ESL metaboliniam aktyvumui ir gyvybingumui. A. Ląstelių metabolinis aktyvumas įvertintas atliekant MTT testą. **B.** ESL gyvybingumas paveikus ląsteles skirtingais poveikiais nustatytas dažant Tripano mėliu. ESL standartiškai kultivuojamos auginimo terpėje, kuri pakeista į indukcijos arba decidualizacijos (Decidua) terpę, ir ląstelės analizuotos praėjus 24, 48 ir 72 val. Rezultatai pateikiami kaip mediana su tarpkvartiliniu plociu ($n = 4$). p reikšmės apskaičiuotos naudojant Vilkoksono kriterijų.

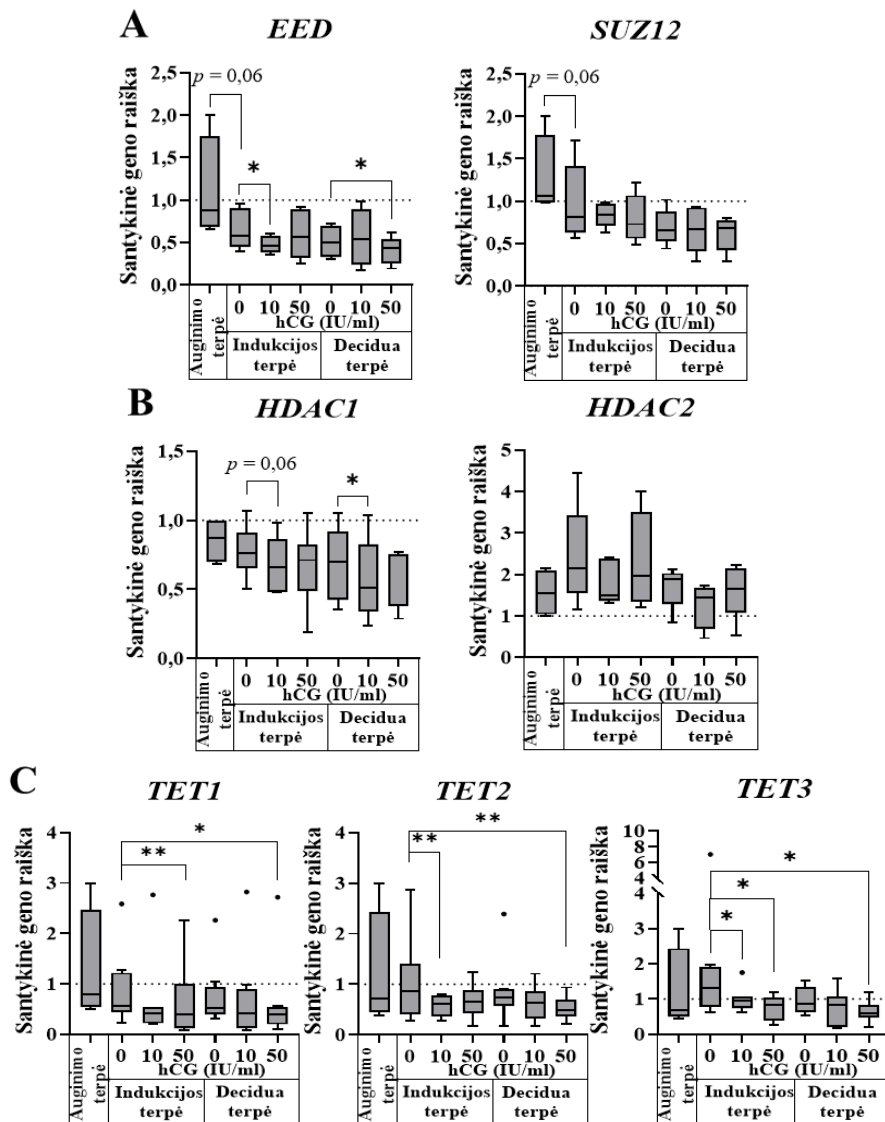
Toliau analizavome hCG įtaką decidualizacijos proceso žymenų, tokių kaip PRL ir IGFBP-1, raiškai. Abiejų decidualizacijos žymenų genų raiška intensyviai išaugo inkubuojant ląsteles decidualizacijos terpėje (*PRL* – 378,6 karto, o *IGFBP1* – 4734,9 karto), o indukcijos terpė be decidualizacijos induktorių poveikio decidualizacijos žymenų raiškos padidėjimui neturėjo (3.13 pav.). Nepaisant to, kad hCG neturėjo poveikio nedecidualizuotoms ląstelėms, mūsų tyrimo rezultatai atskleidė, kad decidualizacijos terpę papildžius 10 IU/ml hCG reikšmingai 1,6 karto padidėjo *PRL* raiška lyginant su decidualizuotomis ląstelėmis be hCG (3.13 pav. A). Po poveikio su didesne hCG koncentracija (50 IU/ml) taip pat nustatytas reikšmingas 1,2 karto *PRL* raiškos padidėjimas lyginant su decidualizuotomis ESL be hCG, tačiau šis padidėjimas buvo reikšmingai 1,3 karto mažesnis negu 10 IU/ml hCG atveju. Nepaisant to, kad nedecidualizuotose ESL nustatėme 2 kartus sumažėjusią *IGFBP1* raišką po 10 IU/ml hCG poveikio, decidualizuotose ląstelėse, kaip ir *PRL* raiškos atveju, galima išžvelgti tendenciją, kad papildomas 10 IU/ml hCG poveikis beveik 2 kartus padidina *IGFBP1* raišką lyginant su tik decidualizuotomis ESL (3.13 pav. B), tačiau šis pokytis nebuvo statistškai reikšmingas ($p = 0,2$). Teigiamo 10 IU/ml hCG poveikio įtaka *PRL* raiškai decidualizuotose ESL buvo patvirtina ir baltymų lygyje įvertinant stimuliuotų ESL į užląstelinę aplinką sekretuojamo PRL kiekį (3.13 pav. C), kuris padidėjo 1,2 karto papildžius decidualizacijos terpę 10 IU/ml hCG ($p = 0,06$) lyginant su tik decidualizuotomis ESL. Taigi, hCG pasižymi nuo koncentracijos priklausomu poveikiu decidualizacijos žymenų raiškai, ir būtent 10 IU/ml hCG sukėlė didžiausią *PRL* raiškos padidėjimą tiek genų raiškos, tiek baltymų sekrecijos lygyje.

Tolimesniame tyrimų etape analizavome, kaip hCG ir decidualizacijos indukcija reguliuoja įvairius epigenetinius veiksnius koduojančių genų raišką. Gauti rezultatai parodė, kad 10 IU/ml hCG poveikis indukcijos terpėje ir 50 IU/ml hCG poveikis decidua terpėje sukėlė vieno iš PCR2 komponentų *EED* koduojančio geno raiškos reikšmingą sumažėjimą (atitinkamai 1,2 ir 1,1 karto, 3.14 pav. A). Taip pat nustatyta bendra tendencija, kad auginimo terpės pakeitimas į indukcijos terpę sumažina *EED* ir kito PCR2 komponentą *SUZ12* koduojančio geno raiškos lygius ESL ($p = 0,06$). Nustatėme, kad 10 IU/ml hCG poveikis slopino *HDAC1* raišką tiek neindukuotų (1,2 karto, $p = 0,06$), tiek indukuotų decidualizacijai (1,4 karto) ESL grupėse (3.14 pav. B). Be to, po hCG poveikio nustatyta sumažėjusi ir DNR demetilazių genų raiška. 10 IU/ml hCG poveikis slopino *TET2* ir *TET3* (atitinkamai 1,4 ir 1,3 karto), o 50 IU/ml hCG slopinamasis efektas nustatytas *TET1* ir *TET3* raiškai (atitinkamai 1,4 ir 1,6 karto) nedecidualizuotų ESL grupėje (3.14 pav. C).



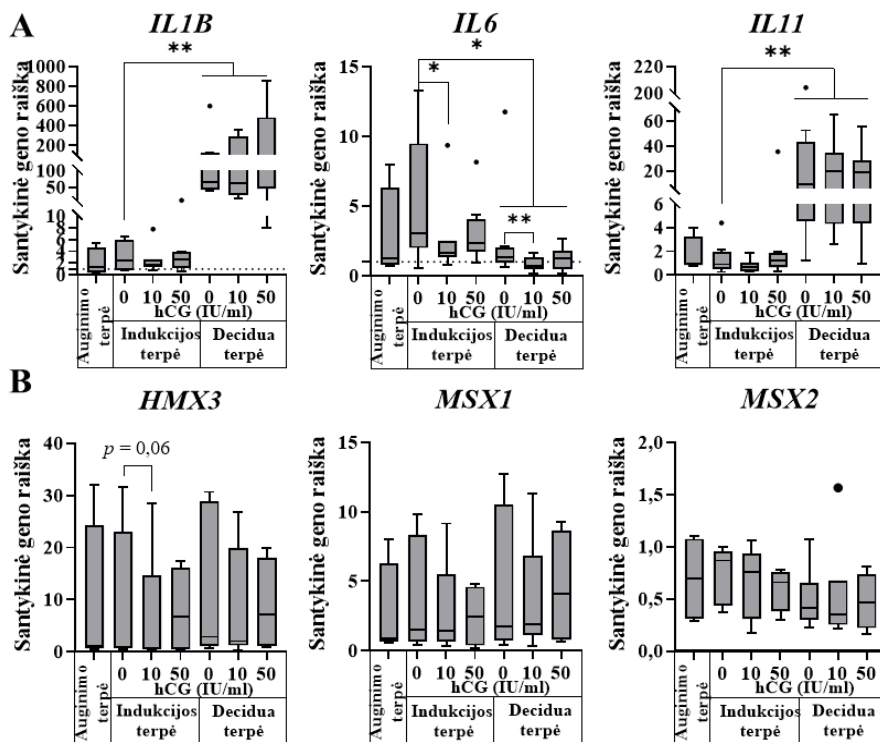
3.13 pav. hCG ir decidualizacijos indukcijos įtaka decidualizacijos žymenų raiškai. A. *PRL* raiška. B. *IGFBP1* raiška. Genų raiškos pokyčiai veikiant ESL skirtingais poveikiais įvertinti atlikus AT-kPGR ($n = 8$). Prieš hCG poveikį ESL auginamos 2 d. indukcijos arba decidualizacijos (Decidua) terpėje, ląstelės analizei surenkamos praėjus dar 24 val. po hCG pridėjimo. *GAPDH* ir *RPL13A* raiškos lygio verčių geometrinis vidurkis naudotas bendram iRNR kiekio normalizavimui, rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą. C. Paveiktų ESL *PRL* sekrecija vertinta atlikus *ELISA* ($n = 4$) analizę. Linija stulpelių viduje žymi imties medianą, stulpelis apibrėžia tarpkvartilinį plotį. Viršutinė ir apatinė linijos už stulpelio ribų atitinka maksimalią ir minimalią imties reikšmes. * - p reikšmė $< 0,05$, ** - p reikšmė $< 0,01$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų.

Prieš 50 IU/ml hCG poveikį decidualizuotų ESL atveju taip pat nustatytas *TET1* (1,4 karto, $p = 0,06$), *TET2* (1,9 karto) ir *TET3* (2,4 karto) raiškos sumažėjimas lyginant su kontrole. Šie rezultatai pagrindžia įvairialypį hCG poveikį ESL epigenetinei reguliacijai, įskaitant histonų modifikacijas ir DNR demetilinimą reguliuojančių genų raiškos pokyčius.



3.14 pav. hCG ir decidualizacijos indukcijos įtaka su epigenetine reguliacija susijusių genų raiškai. A. Antrojo polikombo slopinančio komplekso (PRC2) komponentai. B. Histonų deacetilazės. C. DNR demetilavimo veiksniai. Genų raiškos pokyčiai veikiant ESL skirtingais poveikiais įvertinti atlikus AT-kPGR. *GAPDH* ir *RPL13A* raiškos lygio verčių geometrinis vidurkis naudotas bendram iRNR kiekio normalizavimui, rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą. Linija stulpelių viduje žymi imties medianą, o pats stulpelis apibrėžia tarpkvartilinį plotį ($n = 8$). Viršutinė ir apatinė linijos už stulpelio ribų atitinka maksimalią ir minimalią imties reikšmes. * - p reikšmė $< 0,05$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų.

Taip pat įvertinome hCG įtaką interleukinus koduojančių ir su blastocistos implantacija susijusių genų raiškai. Analizuojami interleukinai (*IL1B*, *IL6*, *IL11*) buvo pasirinkti dėl savo svarbios funkcijos moduluojant imunosupresinę aplinką gimdoje nėštumo metu. Pirmiausia nustatėme, kad po ESL decidualizacijos indukcijos slopinama *IL6* raišką (2,3 karto), o *IL1B* ir *IL11* raiška padidėjo (atitinkamai 19,8 ir 10,6 karto) (3.15 pav. A).



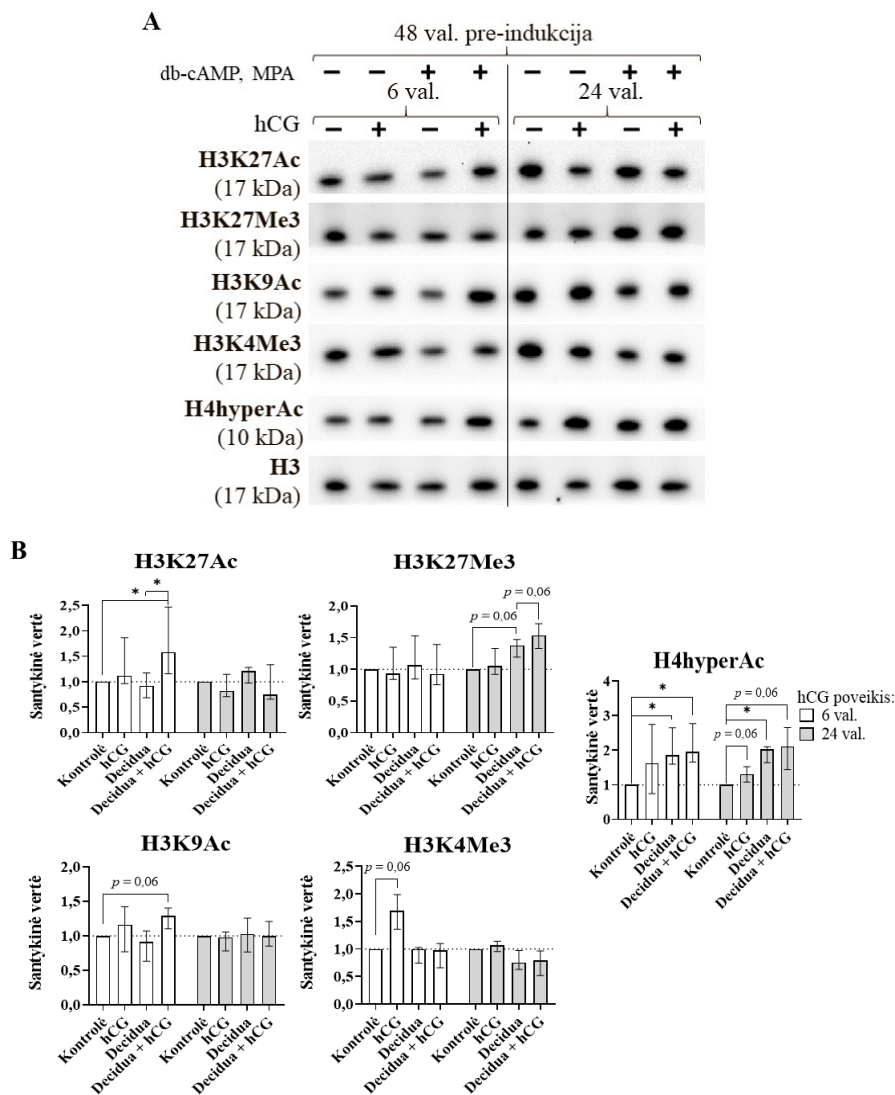
3.15 pav. hCG ir decidualizacijos indukcijos įtaka interleukinų ir implantacijos genų raiškai. A. Interleukinus koduojantys genai. B. Su implantacijos procesu susiję genai. Prieš hCG poveikį ESL auginamos 2 d. indukcijos arba decidualizacijos (Decidua) terpėje, ląstelės analizei surenkamos praėjus dar 24 val. po hCG pridėjimo. Genų raiškos pokyčiai veikiant ESL skirtingais poveikiais įvertinti atlikus AT-kPGR. *GAPDH* ir *RPL13A* raiškos lygio verčių geometrinis vidurkis naudotas bendram iRNR kiekio normalizavimui, rezultatai apskaičiuoti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą. Linija stulpelių viduje žymi imties medianą, o pats stulpelis apibrėžia tarpkvartilinį plotį ($n = 8$). Viršutinė ir apatinė linijos už stulpelio ribų atitinka maksimalią ir minimalią imties reikšmes. * - p reikšmė $< 0,05$, ** - p reikšmė $< 0,01$ apskaičiuota naudojant Vilkoksono kriterijų.

Reikšminga hCG poveikio įtaka analizuojant interleukinų genų raišką nustatyta tik *IL6* atveju, kuomet po 10 IU/ml hCG poveikio pastebėta

sumažėjusi *IL6* raiška tiek neindukuotų (1,9 karto), tiek indukuotų decidualizacijai (2,1 karto) ESL grupėse. Reikšmingų pokyčių nenustatėme analizuodami su implantacija susijusių genų *MSX1*, *MSX2* raišką, išskyrus pastebėtą tendenciją, kad 10 IU/ml hCG poveikis slopino *HMX3* raišką ($p = 0,06$) (3.15 pav. B). Taigi remiantis mūsų gautais interleukinų ir su implantacijos procesu susijusių genų raiškos rezultatais, galima teigti, kad tiek hCG, tiek decidualizacijos stimulo atveju ryškiausias nustatytas pokytis reguliuojant ESL uždegiminiuosius procesus yra susijęs su *IL6* raiškos slopinimu.

Vertinant hCG įtaką metabolizmo procesui pasirinkome analizuoti mitochondrijų biogenezės (*PPARGCIA*) ir antioksidacinių veiksnių (*TXN*, *GPXI*), o apoptozės atveju, pagrindinių apoptozės signalo perdavimo kelyje dalyvaujančių veiksnių (*BAX*, *BCL2*, *BAK1*) genų raiškos pokyčiams. Mūsų tyrimo rezultatai atskleidė, kad *PPARGCIA* raiška išaugo 15 kartų indukuojant ESL decidualizacijos stimulu, tačiau papildžius decidualizacijos terpę 50 IU/ml hCG šis transkriptų kiekio padidėjimas sumažėjo (1,2 karto, $p = 0,06$) (3.16 pav. A). Vertinant kitus su metabolizmu susijusius genus, nenustatėme ryškių pokyčių, išskyrus tai, kad decidualizuotose ląstelėse 50 IU/ml hCG poveikis slopino *TXN* (1,5 karto), o 10 IU/ml – *GPXI* raišką (1,2 karto). Analizuojant su apoptoze susijusių genų raišką nustatėme, kad decidualizacijos stimulus slopino *BAX* ir *BCL2* raišką (atitinkamai 1,5 ir 2,3 karto), o hCG poveikis reikšmingai sumažino *BAK1* raišką: nedecidualizuotų ESL atveju 50 IU/ml – 1,3 karto, decidualizuotų ESL atveju 10 IU/ml – 1,8, o 50 IU/ml – 1,9 karto (3.16 pav. B). Apibendrinant, nustatėme, kad pagrindinius su metabolizmu ir apoptoze susijusių genų raiškos skirtumus lėmė ESL decidualizacijos indukcija, o po hCG poveikio nustatyti mažesni pokyčiai, įskaitant *BAK1*, *TXN*, *GPXI* raiškos slopinimą.

Tolimesniems tyrimams pasirinkome 10 IU/ml hCG koncentraciją ir analizavome hCG ir decidualizacijos poveikio įtaką ESL histonų modifikacijų lygio pokyčiams. Analizuojant histonų modifikacijas nustatėme, kad po 6 val. hCG poveikio padidėjo H3K27Ac, H3K9Ac ir H3K4Me3 lygis, tačiau šių modifikacijų padidėjimo nebenustatėme mėginiuose surinktuose po 24 val. poveikio (3.17 pav. A ir B). H3K4Me3 lygio padidėjimas nustatytas tik neindukuotose decidualizacijai, o H3K9Ac tik indukuotose decidualizacijai ESL (atitinkamai 1,7 ir 1,3 karto, $p = 0,06$) lyginant su kontrole. H3K27Ac lygio reikšmingas padidėjimas po 6 val. nustatytas decidualizuotų ESL grupėje po hCG pridėjimo atitinkamai 1,8 karto lyginant tiek su kontrole, tiek ir su tik decidualizuota ESL grupe. Po 6 val. tik decidualizacijos stimulo, bei po decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikio nustatytas 2 kartus reikšmingai padidėjęs H4hyperAc lygis ESL išliko ir po 24 val. Taip pat,

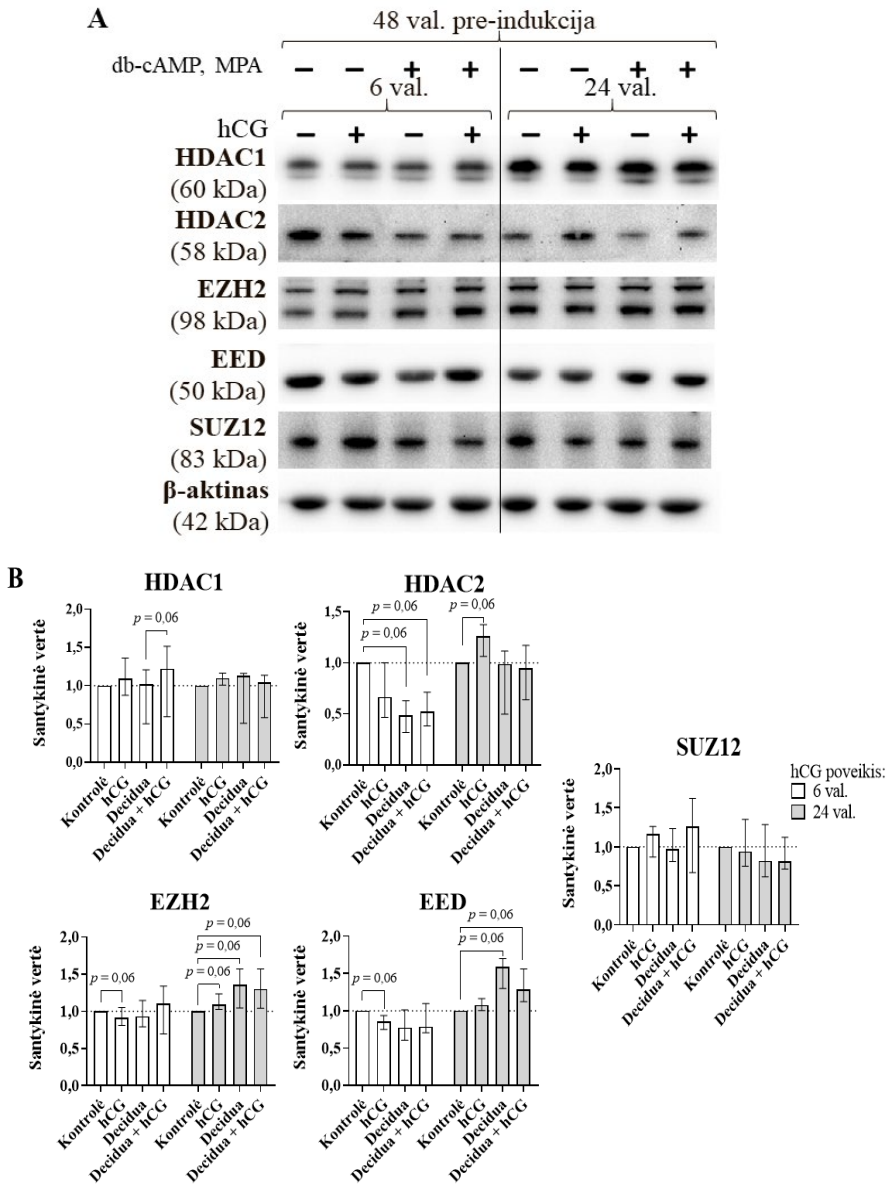


3.17 pav. hCG ir decidualizacijos indukcijos poveikių įtaka histonų modifikacijų lygių pokyčiams. A. Reprezentatyvūs *Western Blot* membranų vaizdai ir nustatyti santykiniai baltymų kiekiai. B. Kiekybinis histonų modifikacijų lygio įvertinimas ($n = 4$). Rezultatų kiekybinė analizė atlikta naudojant ImageJ programinę įrangą normalizuojant pagal bendrą histono H3 kiekį. Kiekybiniai rezultatai pateikti kaip pokyčiai lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Stulpeliai žymi imties medianą, o apatinis ir viršutinis brūkšnelis apibrėžia imties interkvartilinį plotį. P reikšmės apskaičiuotos naudojant Vilkoksono kriterijų, kur * - p reikšmė $< 0,05$.

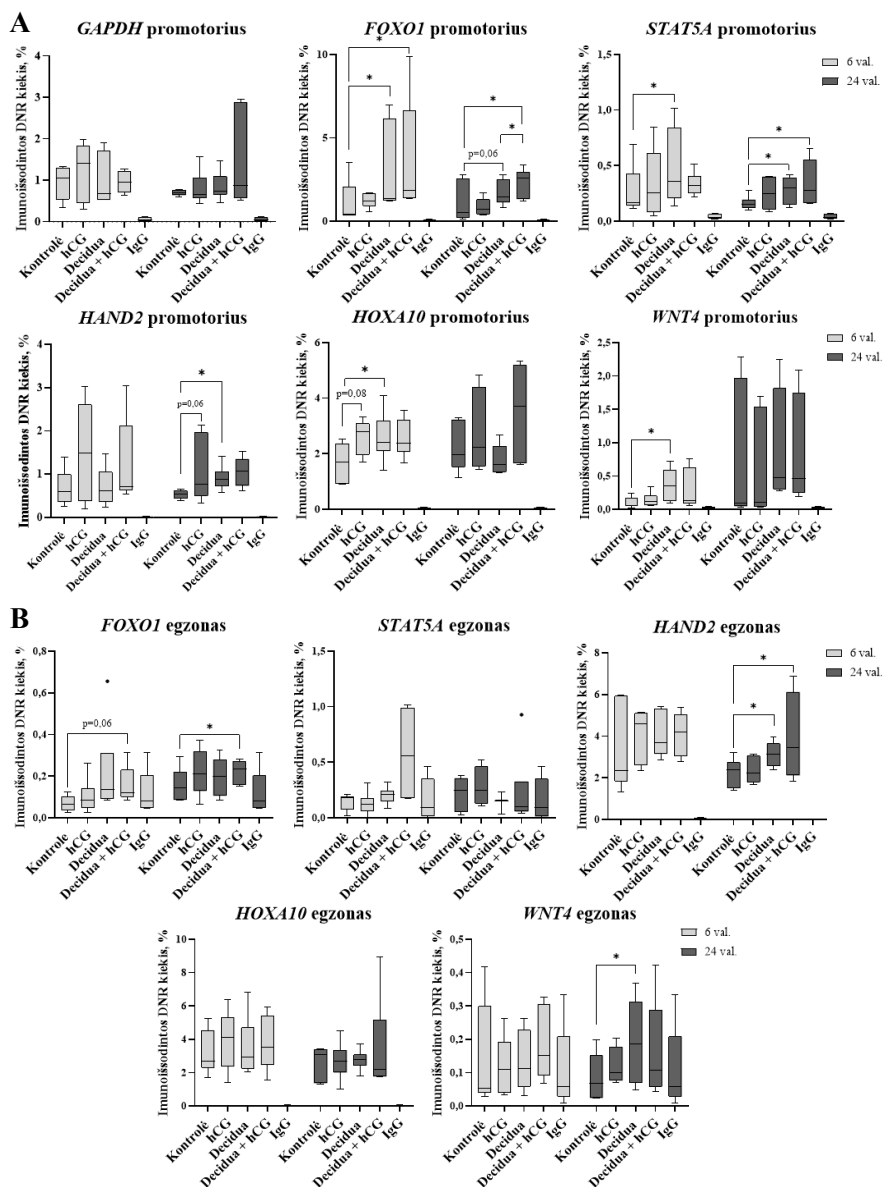
Toliau analizavome hCG ir decidualizacijos įtaką histonų modifikacijas katalizuojančių veiksnių kiekio pokyčiams. Tiriant histonų deacetilazes neaptikome analizuotų poveikių reikšmingos įtakos HDAC1 kiekio

pokyčiams, išskyrus nustatytą tendenciją, kad po 6 val. hCG poveikio prieš tai decidualizuotose ESL 1,2 karto padidėjo šio veiksnio kiekis lyginant su tik decidualizuotomis ESL ($p = 0,06$) (3.18 pav. A ir B). Taip pat nustatėme, kad po 6 val. decidualizacijos ir hCG poveikio HDAC2 baltymo kiekis 2 kartus sumažėjo lyginant su kontrole ($p = 0,06$), o po 24 val. hCG poveikio nedecidualizuotų ESL grupėje padidėjo 1,3 karto ($p = 0,06$). Nustatėme, kad po 6 val. hCG poveikio sumažėjo EZH2 ir EED kiekiai ($p = 0,06$), o po 24 val. decidualizacijos stimulo atskirai ir su hCG poveikio kombinacijos atveju abiejų šių veiksnių raiška padidėjo ($p = 0,06$). SUZ12 atveju reikšmingų pokyčių nenustatėme. Taigi, mes parodėme, kad decidualizacijos indukcija ir trumpalaikis hCG poveikis sumažino histonų deacetilazių ir metiltransferazių kiekius, o ilgesnės trukmės hCG poveikis susijęs su šių epigenetinių veiksnių kiekio padidėjimu.

Kadangi atlikus bendro histonų modifikacijų lygio pokyčių analizę nustatėme, kad po hCG poveikio bendras H3K27Ac lygis padidėja, tolimesniame tyrimo etape nagrinėjome, kaip ši histono modifikacija kinta su decidualizacija susijusių genų srityse. Tam pasiekti pasitelkėme chromatino imunoišsodinimą naudojant antikūną prieš H3K27Ac ir išgryninome su šia modifikacija susijusias DNR sekas, kurias toliau kiekybiškai įvertinome atliekant kPGR analizę. Nustatėme, kad po decidualizacijos indukcijos H3K27Ac lygis padidėjo *FOXO1* (2,4 karto), *STAT5A* (2 kartus), *HAND2* (1,7 karto), *HOXA10* (1,4 karto) ir *WNT4* (6,5 karto) promotorių srityse (3.19 pav. A). Praėjus 24 val. po hCG poveikio prieš tai decidualizuotose ESL H3K27Ac lygis *FOXO1* promotoriaus srityje padidėjo dar papildomai 1,8 karto lyginant su tikta decidualizuotomis ESL. Taip pat nustatėme tendencijas, kad hCG poveikis nepriklausomai nuo decidualizacijos signalo sukėlė H3K27Ac lygio padidėjimą *HAND2* ir *HOXA10* promotorių srityse (atitinkamai 1,4 ir 1,7 karto). Analizuojant su decidualizacija susijusių genų egzonų sritis nustatėme, kad po decidualizacijos indukcijos reikšmingai padidėjo H3K27Ac lygis *HAND2* (1,3 karto) ir *WNT4* (2,7 karto) egzonų srityse (3.19 pav. B). Taip pat šios modifikacijos padidėjimas nustatytas po decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikio *FOXO1* egzono regione (1,6 karto). Šie rezultatai pagrindžia hCG reguliacinį vaidmenį aktyvuojant decidualizacijos procese dalyvaujančių genų raišką per šių genų promotorių sričių H3K27Ac lygio padidėjimą.



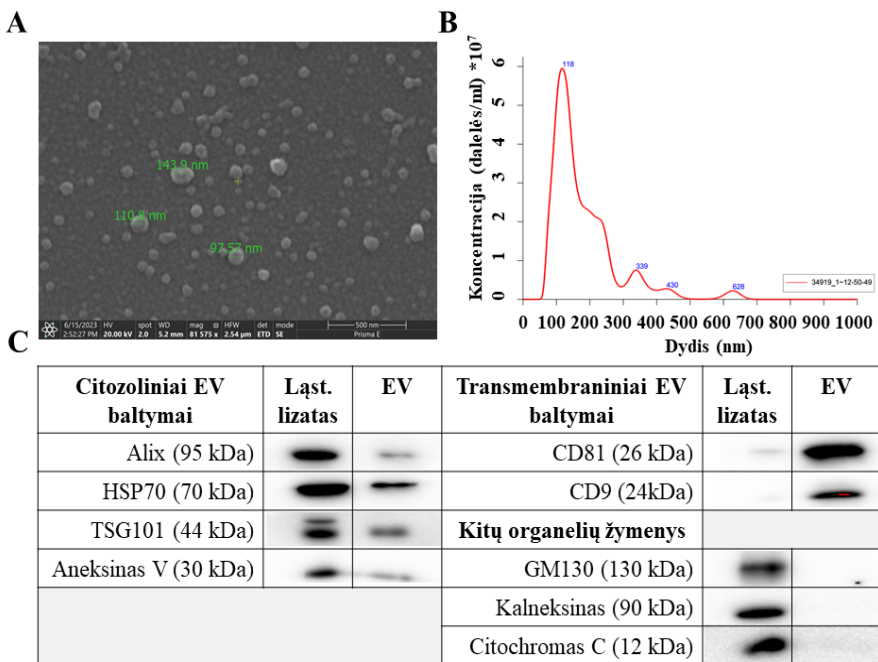
3.18 pav. hCG ir decidualizacijos indukcijos įtaka epigenetinių reguliatorių kiekiui. A. Reprezentatyvūs *Western Blot* membranų vaizdai ir nustatyti santykiniai baltymų kiekiai. B. Kiekybiniai histonų modifikacijų nustatymo pakartojimų rezultatai ($n = 4$). Prieš hCG poveikį ESL auginamos 48 val. indukcijos (Kontrolė) arba decidualizacijos (Decidua) terpėje, ląstelės analizei surenkamos praėjus dar 6 ir 24 val. po 10 IU/ml hCG pridėjimo. Rezultatų kiekybinė analizė atlikta naudojant ImageJ programinę įrangą normalizuojant pagal β -aktino kiekį. Kiekybiniai rezultatai pateikti kaip pokyčiai lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Stulpeliai žymi imties medianą, o apatinis ir viršutinis brūkšnelis apibrėžia imties interkvartilinį plotį. P reikšmės apskaičiuotos naudojant Vilkoksono kriterijų.



3.19 pav. hCG ir decidualizacijos įtaka histono H3K27Ac lygio pokyčiams su decidualizacija susijusių genų srityse. A. Su decidualizacija susijusių genų promotorių regionai. **B.** Analizuotų genų egzonų sritys. Prieš hCG poveikį ESL auginamos 2 d. indukcijos (Kontrolė) arba decidualizacijos (Decidua) terpėje, ląstelės H3K27Ac lygio įvertinimui surinktos praėjus 6 ir 24 val. po 10 IU/ml hCG pridėjimo. H3K27Ac lygio kiekybinis įvertinimas atliktas naudojant chromatino imunoišodinimo (ChIP) ir kPGR analizes. IgG yra neigiama imunoišodinimo kontrolė. Linija stulpelių viduje žymi imties medianą, stulpelis apibrėžia tarpkvartilinį plotį, o apatinis ir viršutinis horizontalus brūkšnelis minimalią ir maksimalią reikšmes ($n = 6$). P reikšmės apskaičiuotos naudojant Vilkoksono kriterijų.

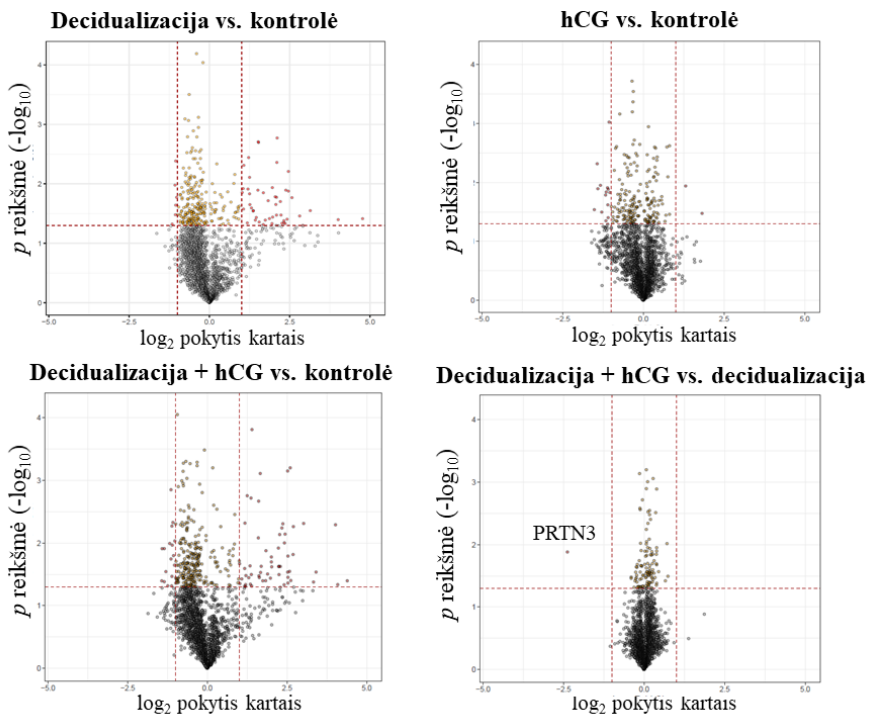
3.8. Decidualizacijos ir hCG poveikio įtaka ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR pokyčiams

Toliau analizavome decidualizacijos ir hCG poveikių, atskirai ir kombinacijoje, įtaką ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR raiškos pokyčiams. EV buvo surinktos ultracentrifuguojant po poveikių surinktas ESL kultivavimo terpes. Surinktos EV buvo charakterizuojamos pagal morfologiją, dydį ir žinomų baltymų raišką (3.20 pav.). Vizualizuojant skenuojančiu elektroniniu mikroskopu patvirtinome, kad surinktomis EV būdinga apvali ir uždara struktūra (3.20 pav. A), o nanodalelių matavimo prietaiso pagalba nustatėme, kad didžioji dalis surinktų EV pateko į 90 – 150 nm dydžio intervalą (3.20 pav. B). Analizuojant EV lizatus ir atliekant *Western Blot*, nustatėme citozolinius baltymus (Alix, HSP70, TSG101, Aneksinas V), kurie yra supakuojami į EV, bei EV membranas sudarančius baltymus (CD81, CD9) (3.20 pav. C). EV lizatuose nenustatėme kitoms ląstelių organelėms būdingų žymenų (GM130, kalneksinas, citochromas C). Šie tyrimai leido patvirtinti, kad surinktos pūslelės atitinka EV charakterizavimui keliamus reikalavimus.



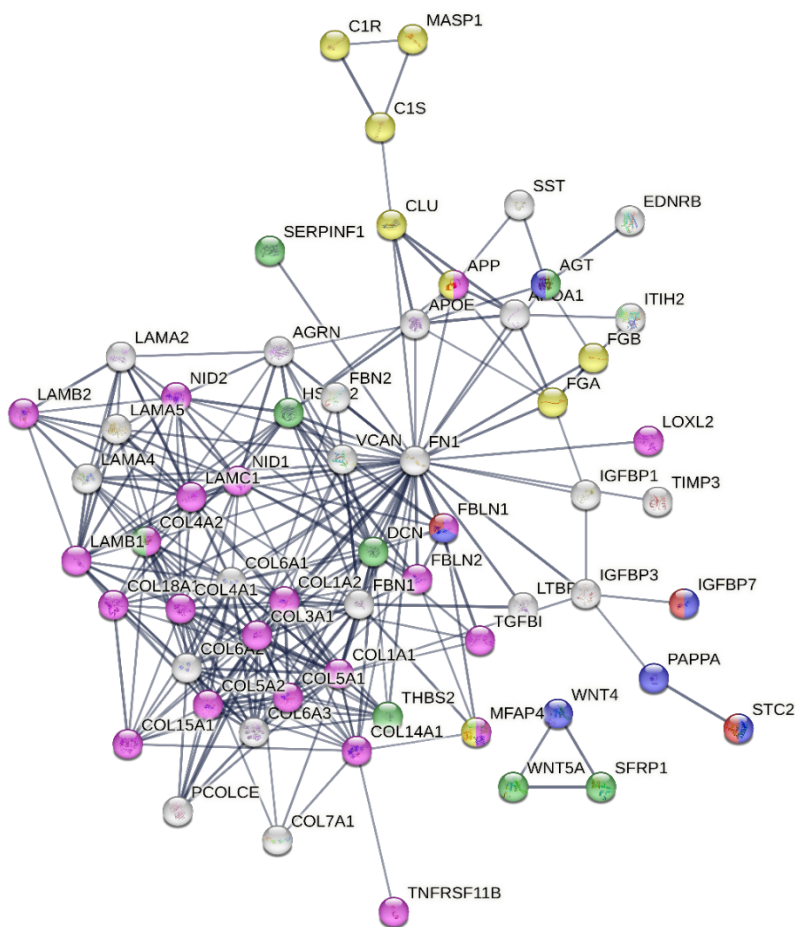
3.20 pav. EV charakterizavimas. A. EV buvo vizualizuotos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. B. EV dydžių pasiskirstymas ir koncentracijos nustatymas atliktas nanodalelių analizavimo prietaisu NanoSizer. C. *Western Blot* analizės metu nustatyta baltymų raiška ląstelių lizatų ir surinktų EV mėginiuose (nepublikuota).

Patvirtinus EV būdingas savybes, toliau palyginome ESL EV baltymų kiekio pokyčius po decidualizacijos ar hCG poveikių atskirai ir kombinacijoje atliekant masių spektrometrijos analizę. Iš viso identifikuota virš 2200 baltymų ir jų raiška skirtingu lygmeniu nustatyta visuose tirtuose EV mėginiuose. Išanalizavus rezultatus nustatėme, kad decidualizacijos poveikis sukelia daugiau reikšmingų EV baltymų kiekio pokyčių negu hCG poveikis, tačiau šių poveikių kombinacija turi didžiausią poveikį lyginant su kontrole (3.21 pav). Nepaisant to, palyginus tarpusavyje decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikio rezultatus su tik decidualizuotomis ESL, nustatytas tik vienas reikšmingai pakitęs EV baltymas – PRTN3. Taigi decidualizacijos poveikis turi stipriausią efektą moduluojant ESL sekretuojamų EV baltymų pokyčius ir užgožia hCG sukeltą efektą.



3.21 pav. Po decidualizacijos ir hCG poveikio ESL EV baltymų kiekio pokyčiai. Decidualizacijos ir hCG bei šių poveikių kombinacijos baltymų kiekio pokyčiai nustatyti atliekant masių spektrometriją. *Volcano plot* grafikai reprezentuoja baltymų raiškos pokyčius lyginant poveikių mėginius su kontrole arba tarpusavyje ($n = 2$). Pilki simboliai žymi nereikšmingus pokyčius, geltoni – p reikšmė $< 0,05$, o raudoni – p reikšmė $< 0,05$ ir \log_2 pokytis kartais > 1 arba < -1 (nepublikuota).

Siekiant įvertinti po poveikių pakitusio kiekio EV baltymų funkcinę reikšmę, baltymai buvo įvertinti pagal jų tarpusavio sąveiką ir priklausymą biologiniams procesams ir funkciniais keliams. Po decidualizacijos poveikio pakitusio kiekio baltymai yra susiję su embriono implantacijos, nėštumo, tarpląstelinio užpildo organizacijos, angiogenezės reguliacijos ir humoralinio imuninio atsako biologiniais procesais (3.22 pav.). Kiti biologiniai procesai ir funkciniai keliai pateikti Lentelėje Nr. 2.



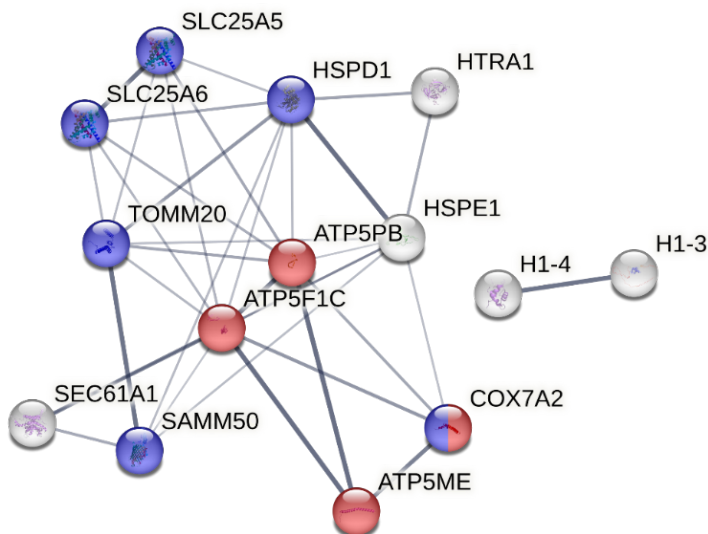
3.22 pav. Po decidualizacijos poveikio pakitusių ESL sekretuojamų EV baltymų sąveikos tinklas. Baltymų sąveikos tinklas sugeneruotas naudojant baltymų funkcijos ryšių analizės įrankį STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02). Spalvos žymi tam pačiam biologiniam procesui priskiriamų baltymų grupes. Raudona – embriono implantacija (GO:0007566); mėlyna – nėštumas (GO:0007565); violetinė – tarpląstelinio užpildo organizacija (GO:0030198); žalia – angiogenezės reguliacija (GO:0045765); geltona – humoralinis imuninis atsakas (GO:0006959), pilki – kitiems biologiniams procesams priklausantys baltymai (nepublikuoti).

Lentelė Nr. 2. Po decidualizacijos poveikio pakitusių ESL EV baltymų priklausymo biologiniams procesams ir funkciniais keliams nustatymas. Rezultatai sugeneruoti naudojant STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02) (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	p reikšmė
GO:0030198	Tarpląstelinio užpildo organizavimas	26 iš 278	5,96e-23
GO:0110011	Pamatinės laminos struktūros reguliavimas	5 iš 11	2,79e-06
GO:0006959	Humoralinis imuninis atsakas	9 iš 268	0,00045
GO:0038030	Nekanoninis Wnt signalo perdavimo kelias įtraukiant MAPK kaskadą	2 iš 6	0,0238
GO:0032964	Kolageno biosintezės procesas	3 iš 10	0,0020
GO:0007566	Embriono implantacija	4 iš 42	0,0038
GO:0007565	Nėštumas	7 iš 170	0,0012
GO:0045765	Angiogenezės reguliacija	9 iš 288	0,00066
GO:0045087	Įgimtas imuninis atsakas	11 iš 754	0,0194
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	p reikšmė
hsa04512	Tarpląstelinio užpildo ir receptorių sąveika	17 iš 88	2,80e-20
hsa04610	Komplemento ir koaguliacijos kaskados	5 iš 82	0,00084
hsa04926	Relaksino signalo perdavimo kelias	6 iš 126	0,00055
hsa04151	PI3K-Akt signalo perdavimo kelias	15 iš 349	1,54e-09

hCG poveikis neturėjo įtakos po decidualizacijos poveikio nustatytų paveiktų biologinių procesų ir funkcinį kelių baltymų pokyčiams, tačiau

nustatyta, kad hCG lėmė EV baltymų pokyčius, susijusius su oksidaciniu fosforiliniu ir mitochondrijų biogeneze (3.23 pav., Lentelė Nr. 3).

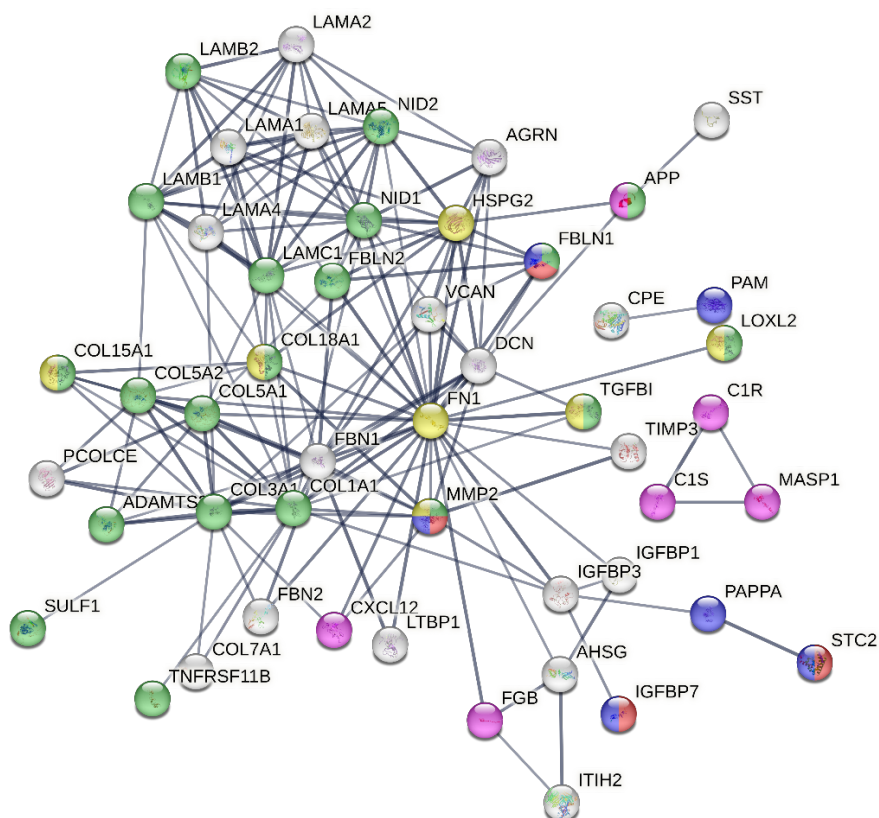


3.23 pav. Po hCG poveikio pakitusių ESL sekretuojamų EV baltymų sąveikos tinklas. Baltymų sąveikos tinklas sugeneruotas naudojant baltymų funkcijos ryšių analizės įrankį STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02). Spalvos žymi tam pačiam biologiniam procesui priskiriamų baltymų grupes. Raudona – oksidacinis fosforilimas (GO:006119); mėlyna – mitochondrijų biogeneze (GO:0007005), pilki – kitiems biologiniams procesams priklausantys baltymai (nepublikuoti).

Lentelė Nr. 3. Po hCG poveikio pakitusių ESL EV baltymų biologiniams ir funkciniais procesų nustatymas. Rezultatai sugeneruoti naudojant STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02) (nepublikuoti).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
GO:0006119	Oksidacinis fosforilimas	4 iš 122	0,0174
GO:0007005	Mitochondrijų biogeneze	6 iš 445	0,0128
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
hsa00190	Oksidacinis fosforilimas	4 iš 128	0,0012

Decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikis lemė panašius EV baltymų, susijusių su embriono implantacija, imuniniu atsaku, tarpląstelinio užpildo reguliacija, angiogeneze ir nėštumu, kiekių pokyčius kaip ir decidualizacijos poveikis (3.24 pav.). Kiti po decidualizacijos ir hCG poveikio pakitusių EV baltymų biologiniai procesai ir funkciniai keliai pateikti Lentelėje Nr. 4.

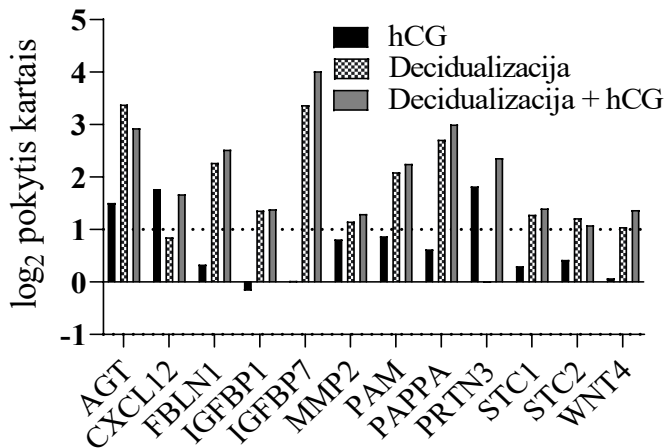


3.24 pav. Po decidualizacijos ir hCG kombinuoto poveikio pakitusių ESL sekretuojamų EV baltymų sąveikos tinklas. Baltymų sąveikos tinklas sugeneruotas naudojant baltymų funkcijos ryšių analizės įrankį STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02). Spalvos žymi tam pačiam biologiniam procesui priskiriamų baltymų grupes. Raudona – embriono implantacija (GO:0007566); violetinė – humoralinis imuninis atsakas (GO:0006959); žalia – tarpląstelinio užpildo organizacija (GO:0030198); geltona – angiogenezė (GO:0001525); mėlyna – nėštumas (GO:0007565), pilki – kitiems biologiniams procesams priklausantys baltymai (nepublikuoti).

Lentelė Nr. 4. Po decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikio pakitusių ESL EV baltymų biologiniams ir funkciniais procesų nustatymas. Rezultatai sugeneruoti naudojant STRING (<https://string-db.org/>; 2024-06-02) (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	p reikšmė
GO:0110011	Pamatinės laminos reguliacija	6 iš 11	6,55e-08
GO:2001046	Teigiama su integriniais susijusių signalų perdavimo reguliacija	6 iš 13	1,34e-07
GO:0032964	Kolageno biosintezės procesas	3 iš 10	0,0039
GO:0007566	Embriono implantacija	5 iš 42	0,00053
GO:0030198	Tarpląstelinio užpildo organizacija	25 iš 278	2,35e-21
GO:0007565	Nėštumas	8 iš 170	0,00034
GO:0006959	Humoralinis imuninis atsakas	9 iš 268	0,00076
GO:0001525	Angiogenezė	9 iš 325	0,0025
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Baltymai (vnt.) iš visų grupei priskirtų baltymų skaičiaus	p reikšmė
hsa04512	Tarpląstelinio užpildo ir receptorių sąveika	11 iš 88	1,47e-10
hsa04510	Jungtys tarp viduląstelinio struktūrų ir užląstelinio užpildo	9 iš 195	1,55e-05
hsa04151	PI3K-Akt signalo perdavimo kelias	9 iš 349	0,00086

Su embriono implantacijos, nėštumo ir imuninės sistemos reguliacijos procesais susijusių baltymų pokyčiai palyginti tarpusavyje po hCG, decidualizacijos ir šių poveikių kombinacijos (3.25 pav., Lentelė Nr. 5). Decidualizacijos bei decidualizacijos ir hCG kombinacijos poveikiai lėmė padidėjusį su embriono implantacija ir nėštumu susijusių baltymų kiekio padidėjimą ESL EV lyginant su kontrole: AGT (1,28 ir 1,4 karto), FBLN1 (atitinkamai 3,38 ir 2,93), IGFBP1 (3,37 ir 4,02 karto), IGFBP7 (2,09 ir 2,25), MMP2 (1,15 ir 1,3 karto), PAM (1,05 ir 1,37 karto), PAPP (2,71 ir 3 karto), STC1 (2,27 ir 2,52 karto), STC2 (1,36 ir 1,39 karto), WNT4 (1,22 ir 1,08 karto). Galima išvelgti tendenciją, kad nepaisant to, kad decidualizacijos ir decidualizacijos kartu su hCG poveikiai nulėmė labai panašius baltymų kiekio pokyčius, didžiosios dalies analizuotų baltymų kiekis buvo nežymiai didesnis po kombinacinio abiejų veiksnių poveikio. hCG naudojamas nedecidualizuotų ESL atveju neturėjo įtakos su embriono implantacija ir nėštumu, angiogeneze ir užląstelinio užpildo reguliacija susijusių baltymų pokyčiams EV. Tačiau nustatėmė, kad su imunine reguliacija susijusių baltymų – CXCL12 (atitinkamai 1,77 ir 1,67 karto) ir PRTN3 (atitinkamai 1,82 ir 2,36 karto) kiekis buvo padidėjęs po hCG bei decidualizacijos ir hCG bendro poveikio, tačiau šių baltymų padidėjimo nenustatėmė tikrai decidualizuotų ESL EV. Taip pat, hCG poveikis, priešingai nei decidualizacijos ir decidualizacijos su hCG, neigiamai reguliavo su oksidaciniu fosforiliniu ir mitochondrijų biogeneze susijusių baltymų kiekį ESL EV.

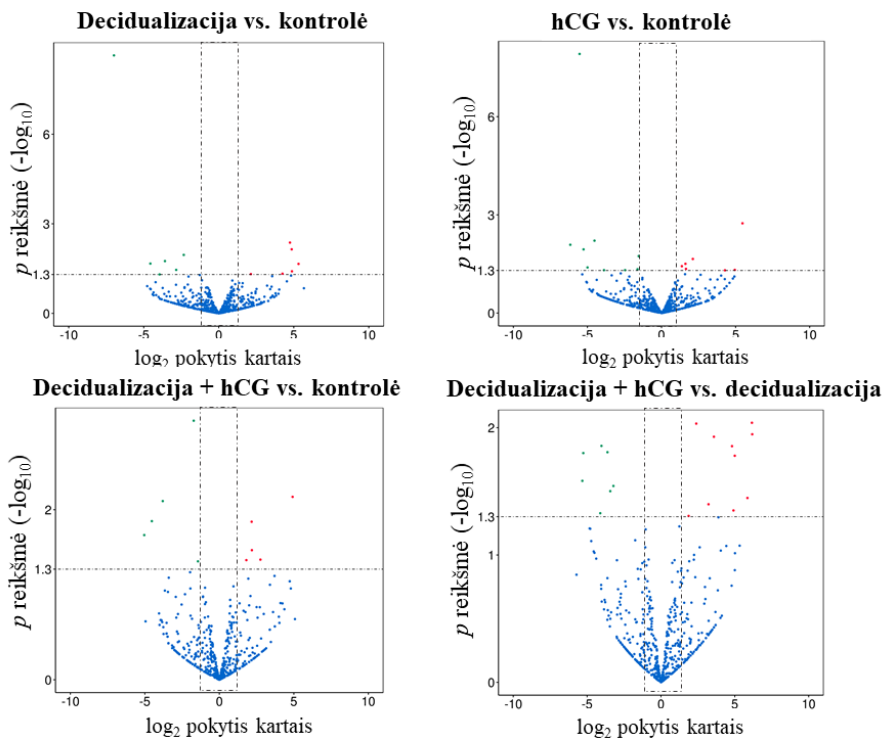


3.25 pav. Su embriono implantacija, nėštumu ir imuninės sistemos reguliacija susijusių baltymų kiekio pokyčiai ESL EV po decidualizacijos ir hCG poveikio atskirai arba kombinacijoje. Pateikti EV baltymų kiekio pokyčiai po atitinkamų poveikių lyginant su kontrole (nepublikuota).

Lentelė Nr. 5. Su embriono implantacija, nėštumu ir imuninės sistemos reguliacija susijusių baltymų aprašymai.

Baltymo sutrumpinimas	Pilnas baltymo pavadinimas	Funkcija
AGT	angl. <i>angiotensinogen</i>	Hormonų sistemos, reguliuojančios kraujospūdį ir skysčių balansą, komponentas (Lu <i>et al.</i> , 2016).
CXCL12	angl. <i>C-X-C motif chemokine 12</i>	Leukocitus aktyvuojantis chemokinas (Janssens <i>et al.</i> , 2017).
FBLN1	angl. <i>fibulin-1</i>	Užląstelinį užpildą reguliuojantis baltymas svarbus ląstelių adhezijoje ir migracijoje (Twal <i>et al.</i> , 2001).
IGFBP1/7	angl. <i>Insulin-like growth factor-binding protein 1/7</i>	IGF prijungiantys ir taip reguliuojantys šio veiksnio prieinamumą baltymai (Allard ir Duan, 2018).
MMP2	angl. <i>Matrix metalloproteinase-2</i>	Reguliuoja užląstelinio užpildo pertvarkymą, kadangi gali skelti I ir IV tipo kolagenus (Nikolov <i>et al.</i> , 2021).
PAM	angl. <i>Peptidyl-glycine alpha-amidating monoxygenase</i>	Katalizuoja peptidų amidinimą (Kaufmann <i>et al.</i> , 2021).
PAPPA	angl. <i>pregnancy-associated plasma protein A</i>	Metaloproteinazė, kuri reguliuoja vietinio IGF bioaktyvumą, suskaidant IGFBP (Conover <i>et al.</i> , 2023).
PRTN3	angl. <i>Proteinase 3</i>	Neutrofilams specifinė serino proteazė (Akgun <i>et al.</i> , 2020).
STC1/2	angl. <i>Stanniocalcin-1/2</i>	STC yra pleurotropiniai hormonai reguliuojantys kalcio ir fosfato balansą organizme (Joshi, 2020).
WNT4	angl. <i>Wnt family member 4</i>	Transkripcijos veiksnys reguliuojantis ESL proliferaciją, išgyvenamumą ir diferenciaciją (Zhang <i>et al.</i> , 2021).

Taip pat tyrimo metu tyrėme po analizuojamų poveikių ESL sekretuojamų EV miRNR lygio pokyčius, atliekant miRNR sekoskaitos analizę. Bendrai apjungiant visus EV mėginius identifikuota virš 900 miRNR. Sekoskaitos rezultatai atskleidė reikšmingai pakitusio kiekio miRNR EV po decidualizacijos ir hCG arba abiejų šių veiksnių kombinacijos poveikio lyginant su kontrole, bei kombinacinį poveikį lyginant tik su decidualizacijos sukeltais pokyčiais (3.26 pav.). Didžioji dalis reikšmingai pakitusio kiekio EV miRNR buvo unikalios kiekvienam analizuotam poveikiui, tačiau keletas tų pačių miRNR buvo nustatytos skirtingų poveikių atvejais (Lentelė Nr. 6). hCG stimulus decidualizuotų ląstelių atveju lėmė tokių miRNR kaip hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3180-5p, hsa-miR-4508 raišką, kuri nebuvo nustatyta kitų tirtų poveikių atvejais.



3.26 pav. Decidualizacijos ir hCG įtaka į EV supakuojamų miRNR raiškos pokyčiams. Volcano plot grafikai reprezentuoja miRNR raiškos pokyčius lyginant poveikių mėginius su kontrole arba tik su decidualizacijos poveikiu. Mėlyni simboliai žymi nereikšmingus pokyčius, raudoni – p reikšmė $< 0,05$ ir \log_2 pokytis kartais $> 1,3$, o žali p reikšmė $< 0,05$ ir \log_2 pokytis kartais $< -1,3$, ($n = 3$) (nepublikuota).

Lentelė Nr. 6. Po decidualizacijos ir hCG poveikių ESL EV reikšmingai pakitusio kiekio miRNR (nepublikuota).

Rezultatas	Poveikis	
	Decidualizacija vs. kontrolė	hCG vs. kontrolė
Kiekis padidėjo (pokytis kartais)	hsa-let-7c-3p (4,86); hsa-miR-29b-3p (4,75); hsa-miR-675-3p (4,88); hsa-miR-889-3p (2,14); hsa-miR-1193 (5,32); hsa-miR-4647 (4,25).	hsa-miR-192-5p (2,12); hsa-miR-218-5p (1,62); hsa-miR-372-3p (5,47); hsa-miR-381-3p (1,37); hsa-miR-548o-3p (1,65); hsa-miR-1185-1-3p (4,28); hsa-miR-1285-3p (4,95).
Kiekis sumažėjo (pokytis kartais)	hsa-miR-1-3p (3,95); hsa-miR-9-5p (6,99); hsa-miR-150-5p (2,84); hsa-miR-184 (4,56); hsa-miR-760 (3,59); hsa-miR-2682-5p (2,33).	hsa-miR-1-3p (3,88); hsa-miR-9-5p (5,53); hsa-miR-122-5p (1,54); hsa-miR-122b-3p (1,54); hsa-miR-150-5p (2,46); hsa-miR-184 (5,26); hsa-miR-299-3p (6,15); hsa-miR-329-5p (4,99); hsa-miR-483-3p (4,52); hsa-miR-671-3p (1,62).
Rezultatas	Poveikis	
	Decidualizacija + hCG vs. kontrolė	Decidualizacija + hCG vs. Decidualizacija
Kiekis padidėjo (pokytis kartais)	hsa-miR-29c-5p (2,76); hsa-miR-139-5p (2,17); hsa-miR-193a-5p (1,81); hsa-miR-340-3p (2,18); hsa-miR-4508 (4,92).	hsa-miR-9-5p (4,81); hsa-miR-181a-3p (3,58); hsa-miR-206 (6,16); hsa-miR-340-3p (1,87); hsa-miR-663a (5,85); hsa-miR-766-5p (6,18); hsa-miR-2682-5p (2,39); hsa-miR-3138 (3,22); hsa-miR-3180-5p (5); hsa-miR-4755-5p (4,91).
Kiekis sumažėjo (pokytis kartais)	hsa-let-7e-3p (4,53); hsa-miR-92a-3p (1,72); hsa-miR-184 (5,04); hsa-miR-501-3p (3,80); hsa-miR-589-5p (1,44).	hsa-miR-25-5p (3,22); hsa-miR-29b-3p (3,43). hsa-miR-501-3p (3,62); hsa-miR-541-3p (5,26); hsa-miR-148b-5p (4,11); hsa-miR-1193 (5,32); hsa-miR-4485-3p (4,03);

Po decidualizacijos, hCG ir kombinacinio poveikio pakitusių lyginant su kontrole ir kombinacinio poveikio lyginant tik su decidualizacija ESL EV miRNR paveikiami biologiniai procesai ir funkciniai keliai pateikiami atitinkamai Lentelėse Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9, Nr. 10. Decidualizacijos poveikis lemė ESL EV miRNR raiškos profilius, susijusius su mažųjų GTPazių signalo perdavimu, sinapsių plastiškumo reguliacija, aktino filamentų organizacija, integrinų signalo perdavimo keliu, lizosomomis ir lizino degradavimu (Lentelė Nr. 7). Po hCG poveikio pakitusių EV miRNR taikininiai procesai – tai autofagija, GTPazių aktyvumo reguliacija ir histono H4 acetilinimas (Lentelė Nr. 8). Skirtingi rezultatai, gauti kombinacinio decidualizacijos ir hCG poveikį lyginant su kontrole arba tik su decidualizacijos poveikiu. Pirmu atveju nustatyti taikininiai funkciniai keliai susiję su fosfolipidazės D signalo perdavimo keliu, amino rūgčių biosinteze ir MAPK signalo perdavimo keliu (Lentelė Nr. 9). Antruoju atveju identifikuotas galimas poveikis skydliaukės hormonų, oksitocino, insulino ir MAPK signalo perdavimo keliams ir apoptozės procesams. Išanalizavus visų poveikių sukeltų EV miRNR pokyčių galimus taikininis biologinius procesus, nustatyta, kad tik decidualizacijos ir hCG kombinacinis poveikis reikšmingai indukavo ESL sekretuojamų EV miRNR pokyčius, kurie reguliuoja embriono vystymąsi gimdoje (Lentelė Nr. 10). Taigi, decidualizacijos ir hCG poveikiai atskirai bei kombinacijos sukelia unikalius ESL EV miRNR raiškos pokyčius, o tik hCG poveikis tik prieš tai indukuotose decidualizuoti ląstelėse sukėlė ESL sekretuojamų EV miRNR pokyčius, kurie yra atsakingi už embriono vystymąsi gimdoje.

Lentelė Nr. 7. Po decidualizacijos poveikio pakitusių ESL EV miRNR įtakos biologiniams ir funkciniais procesų nustatymas (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
GO:0007264	Signalų perdavimas dalyvaujant mažosioms GTPazėms	229 iš 5641	< 0,001
GO:0048167	Sinapsių plastiškumo reguliacija	80 iš 5641	0,002
GO:0007015	Aktino filamentų organizacija	156 iš 5641	0,002
GO:0007229	Integrinių signalų perdavimo kelias	53 iš 5641	0,025
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
hsa04142	Lizosomos	68 iš 2746	0,032
hsa04142	Lizino degradavimas	35 iš 2746	0,049

Lentelė Nr. 8. Po hCG poveikio pakitusių ESL EV miRNR įtakos biologiniams ir funkciniais procesų nustatymas (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
GO:0006914	Autofagija	153 iš 4059	0,022
GO:0043087	GTPazės aktyvumo reguliacija	154 iš 4059	0,043
GO:0043967	Histono H4 acetilinimas	30 iš 4059	0,045

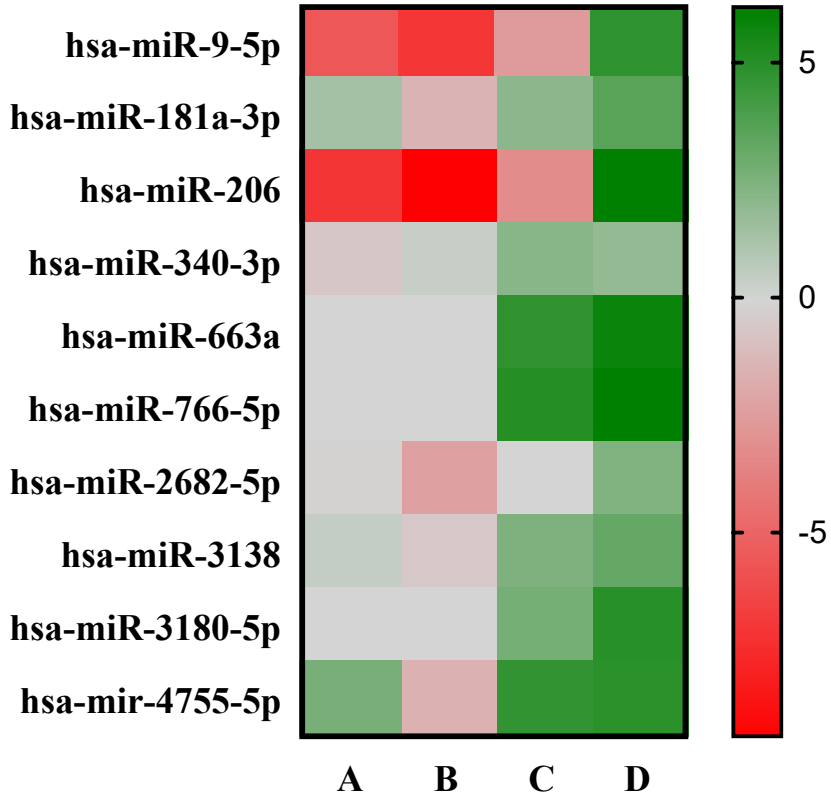
Lentelė Nr. 9. Po decidualizacijos ir hCG kombinacinio poveikio lyginant su kontrole pakitusių ESL EV miRNR įtakos biologiniams ir funkciniam procesų nustatymas (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
GO:0051962	Teigiama nervų sistemos vystymosi reguliacija	153 iš 3665	< 0,001
GO:0042176	Baltymų katabolinio proceso reguliacija	109 iš 3665	0,006
GO:0048732	Liaukų vystymasis	130 iš 3665	0,009
GO:0007178	Transmembraninių receptorių baltymų serino/treonino kinazių signalo perdavimo kelias	99 iš 3665	0,009
GO:0010720	Teigiama ląstelių vystymosi reguliacija	144 iš 3665	0,01
GO:0048568	Embriono organų vystymasis	125 iš 3665	0,02
GO:0030111	Wnt signalo perdavimo kelio reguliacija	98 iš 3665	0,04
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
hsa04072	Fosfolipidazės D signalo perdavimo kelias	53 iš 1816	0,04
hsa01230	Aminorūgščių biosintezė	30 iš 1816	0,04
hsa04010	MAPK signalo perdavimo kelias	92 iš 1816	0,04

Lentelė Nr. 10. Po decidualizacijos ir hCG kombinacinio poveikio lyginant su tik decidualizacijos poveikiu pakitusių ESL EV miRNR įtakos biologiniams ir funkciniais procesų nustatymas (nepublikuota).

Biologiniai procesai (GO)			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė
GO:0016055	Wnt signalinis kelias	264 iš 7470	< 0,001
GO:0043087	GTPazių aktyvumo reguliacija	263 iš 7470	< 0,001
GO:0006914	Autofagija	252 iš 7470	0,003
GO:0001701	Embriono vystymasis gimdoje	170 iš 7470	0,03
GO:0043966	Histono H3 acetilinimas	38 iš 7470	0,04
KEGG analizė			
Numeris	Aprašymas	Taikiniai (vnt.) iš visų grupei priskirtų taikinių skaičiaus	<i>p</i> reikšmė^b
hsa04919	Skyd liaukės signalo perdavimo kelias	77 iš 3679	0,008
hsa04921	Oksitocino signalinis kelias	88 iš 3679	0,04
hsa04210	Apoptozė	80 iš 3679	0,04
hsa04010	MAPK signalinis kelias	161 iš 3679	0,04
hsa04910	Insulino signalinis kelias	78 iš 3679	0,04

Atrinkti po hCG poveikio prieš tai decidualizuotose ESL reikšmingai išaugusio kiekio EV miRNR pokyčių kiekybiniai rezultatai pateikti 3.27 pav. hsa-miR-9-5p ir hsa-miR-206 lygiai ESL EV sumažėjo tiek po decidualizacijos (atitinkamai 7 ir 9,3 kartus), tiek ir po hCG poveikio (atitinkamai 5,5 ir 7 kartus), tiek ir po šių poveikių kombinacijos lyginant su kontrole (atitinkamai 2,5 ir 3,2 karto). Lyginant šių veiksmų kombinaciją poveikį su decidualizacijos poveikiu, hsa-miR-9-5p kiekis ESL EV reikšmingai 4,8 karto padidėjo, o hsa-miR-206 – 6,2 karto. hsa-miR-181a-3p padidėjo 1,4 karto po hCG poveikio, o po decidualizacijos 1,5 karto sumažėjo lyginant su kontrole. Po decidualizacijos ir hCG kombinacinio poveikio nustatytas padidėjęs hsa-miR-181a-3p lygis lyginant tiek su kontrole (2,1 karto), tiek su decidualizuotomis ESL (3,6 karto). hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138 ir hsa-miR-3180-5p kiekio pokyčiai nebuvo nustatyti po decidualizacijos ar hCG vieno poveikio, tačiau po abiejų veiksmų kombinacijos šių miRNR kiekiai išaugo daugiau nei du kartus lyginant tiek su kontrole, tiek su decidualizuotomis ląstelėmis. Sumažėjęs hsa-miR-2682-5p kiekis nustatytas po decidualizacijos poveikio lyginant su kontrole (2,3 karto), tačiau kai decidualizuotos ESL buvo paveikiamos hCG nustatytas 2,4 karto padidėjimas lyginant su decidualizuotomis ESL. hsa-miR-4755-5p kiekis ESL EV padidėjo po hCG poveikio ir decidualizacijos kartu su hCG poveikio lyginant su kontrole (atitinkamai 2,7 ir 4,7 karto) bei 4,9 karto po decidualizacijos kartu su hCG poveikio lyginant tik su decidualizacija. Taigi, decidualizacijos ir hCG bei šių poveikių kombinacija sąlygoja unikalius miRNR kiekio pokyčius, tačiau tik decidualizacijos ir hCG kombinacinis poveikis padidina tokių miRNR kaip hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, hsa-miR-3180-5p kiekį ESL EV.



3.27 pav. Decidualizacijos ir hCG įtaka ESL EV miRNR raiškos pokyčiams. A - hCG vs. kontrolė B - Decidualizacija vs. kontrolė C - Decidualizacija + hCG vs. Kontrolė D - Decidualizacija + hCG vs. Decidualizacija. Spalvos ir jų intensyvumas reprezentuoja miRNR raiškos pokyčius ESL EV po analizuotų poveikių ($n = 3$) (nepublikuota).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Žmogaus reprodukcinė funkcija priklauso nuo endometriumo pasirengimo būsenos, kurią cikliška kontroliuoja kiaušidžių sekretuojami lytiniai hormonai (Ng *et al.*, 2020; Mumusoglu *et al.*, 2021). Menstruacinio ciklo metu endometriume vyksta drastiški struktūros ir funkcijos pokyčiai, kuriuos reguliuoja epigenetiniai veiksniai, aktyvuojant arba slopinant atitinkamus su decidualizacija susijusius genus. Epigenetinės modifikacijos kinta menstruacinio ciklo metu ir koreliuoja su skirtingų ciklo stadijų transkripciniu aktyvumu (Munro *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2020). Mūsų tyrimo metu įvertinome ESL epigenetinių veiksnių, histonų modifikacijų, DNR metilinimo ir miRNR raiškos lygio pokyčius ir nustatėme, kad histono H4 hiperacetilavimo, bet ne DNR metilinimo lygio pokyčiai, yra siejami su ESL decidualizacijos proceso aktyvavimu. Taip pat pademonstravome vieno iš pirmųjų embriono sekretuojamų veiksnių hCG poveikio įtaką ESL epigenetiniams pokyčiams, įskaitant genų raiškos, histonų modifikacijų lygio ir miRNR profilių pokyčius, bei ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR raiškos pokyčius. Taip pat įvertinę stromos ląstelių, išskirtų po endometriumo audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo, savybes, nepaisant tam tikrų aptiktų nežymių variacijų, patvirtinome, kad audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo procesai nesukelia ryškių stromos ląstelių pokyčių.

Pirmiausia dirbant su iš pacientų mėginių išskirtomis ląstelėmis yra svarbu jas charakterizuoti. Mūsų tyrimo metu tirtos iš pacientų mėginių išskirtos ESL atitiko ISCT keliamus minimalius reikalavimus, leidžiant charakterizuoti šias ląsteles kaip MSL (Beeravolu *et al.*, 2017; Zlatska *et al.*, 2017; Queckborner *et al.*, 2020). Išanalizavus ESL nustatėme, kad šios ląstelės pasižymėjo specifinių mezenchiminių paviršiaus žymenų raiškos profilu, fibroblastine morfologija ir įvairiagaliu diferenciacijos potencialu, taip pat ESL buvo nustatyta endometriumo kamieninių ląstelių žymenų raiška ir jos gebėjo efektyviai decidualizuoti. Charakterizavus ląsteles patvirtinome, kad iš pacienčių audinių išskirtos ESL atitinka MSL savybes ir yra tinkamos tolimesniems tyrimams.

4.1. Endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaka išskirtoms stromos ląstelėms

Siekiant įvertinti endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaką išskirtoms stromos ląstelėms, kurios galėtų būti pritaikomos terapijoje, mes palyginome nešaldytų ir užšaldytų audinių ląstelių molekulinės ir epigenetinės savybes. Mūsų tyrimo metu nustatėme, kad stromos ląstelės, išskirtos tiek iš nešaldyto

(Natyvus), tiek iš šaldyto (Krio) audinio, pasižymi labai panašiomis bendrosiomis charakteristikomis, išskyrus vėlyvesniuose pasažuose (> 10 pasažas) sumažėjusį proliferacijos potencialą ir SUSD2 raiška pasižyminčių ląstelių kiekį Krio audinio ESL lyginant su Natyvaus audinio ESL. Analizuodami iš užšaldyto endometriumo audinio išskirtų ląstelių proliferacijos efektyvumą, ansktyvaisiais pasažais kaip ir Gastal su kolegomis (2017), kurie tyrė kiaušidės audinį, nenustatėme reikšmingų pokyčių lyginant Krio ir Natyvaus audinių mėginius. Žinoma, kad ląstelių proliferacijos potencialas vėlyvuose pasažuose sumažėja dėl susikaupusių reaktyvių deguonies formų indukuoto ląstelinio senėjimo (Gu *et al.*, 2016) arba jonų pernašos sutrikimų (Marakhova *et al.*, 2019). Literatūroje aptinkami rezultatai apie gilaus užšaldymo įtaką ląstelių proliferacijos potencialui yra prieštaringi, kadangi keli tyrimai nenustatė įtakos MSL proliferacijos efektyvumui prieš ir po gilaus užšaldymo (Li *et al.*, 2017; Bahsoun *et al.*, 2020; Sugimoto *et al.*, 2021), o kita studija patvirtino po užšaldymo sumažėjusį MSL proliferacijos potencialą (Antebi *et al.*, 2019). Nustatytas reikšmingai sumažėjęs ląstelių, pasižyminčių SUSD2 paviršiaus žymens raiška, kiekis Krio audinio ESL grupėje. Šis žymuo yra transmembraninis baltymas, dalyvaujantis ląstelių tarpusavio adhezijoje ir adhezijoje su užląstelinio užpildu (Sparovec *et al.*, 2022). Pademonstruota, kad SUSD2 raiškos sumažėjimas yra susijęs su ląstelinio senėjimu (Zhang *et al.*, 2017). Taigi, remiantis mūsų gautais tyrimo rezultatais, galima manyti, kad po endometriumo audinio gilaus užšaldymo paspartėja ESL senėjimo procesai ir dėl to vėlyvuose pasažuose sumažėja ląstelių proliferacinis efektyvumas.

Iš nešaldyto ir užšaldyto endometriumo audinių išskirtų ESL genų raiškos palyginamoji analizė atskleidė, kad gilus užšaldymas sukelia pliuripotentiškumo genų (*NANOG*, *OCT4*) raiškos padidėjimą. Ankstesni tyrimai taip pat patvirtino, kad šių pliuripotentiškumo genų raiška išauga po amniotinio skysčio (Gholizadeh-Ghaleh Aziz *et al.*, 2019), virkštelės (Shivakumar *et al.*, 2015) ir riebalinio audinio MSL (Duan ir Lopez, 2018) užšaldymo. Kitas tyrimas analizavęs žmogaus danties folikulinio audinio gilaus užšaldymo įtaką šio audinio MSL pliuripotentiškumo genų raiškai, reikšmingų skirtumų nenustatė (Park *et al.*, 2014). Pliuripotentiškumo genų raiška sumažėja ląstelėms diferencijuojant ir normalaus vystymosi metu šis pokytis įprastai yra negrįžtamas, tačiau šių genų raiškos indukavimas atliekamas kuriant indukuotas pliuripotentes kamienines ląsteles (Miyamoto *et al.*, 2015). Vertinant mūsų gautus rezultatus, galima teigti, kad nepaisant prieš tai aprašyto sumažėjusio proliferacinio efektyvumo vėlyvesniuose pasažuose, ankstyvuosiuose pasažuose gilaus audinio užšaldymo poveikis

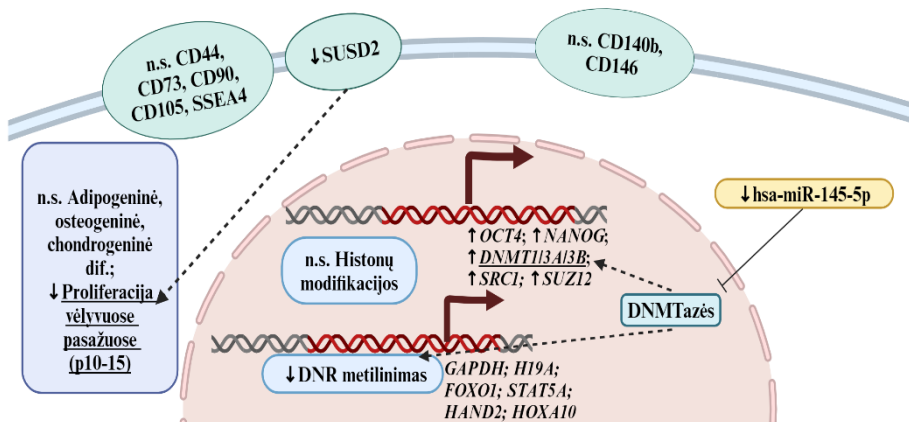
indukuoja išskirtų stromos ląstelių dediferenciacijos procesą padidėjant pliuripotentiškumo genų raiškai.

Toliau analizuojant audinio gilaus užšaldymo įtaką įvertinome epigenetinės reguliacijos pokyčius endometriumo audinyje ir ESL. Mūsų tyrimo metu nenustatėme reikšmingų pokyčių analizuojant pasirinktų histonų modifikacijų lygius. Tačiau nustatėme, kad endometriumo audinio gilus užšaldymas yra susijęs su DNR metiltransferazių (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) genų raiškos padidėjimu. Be to, nustatyta tendencija, kad DNR metilinimo lygis yra sumažėjęs Krio mėginiuose lyginant su nešaldyto audinio mėginiais atitinkamuose genomo regionuose. Nustatyti DNR metilinimo raiškos pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi ir nėra pakankamai duomenų patvirtinti, kad jie turi funkcinę reikšmę analizuotų regionų genų raiškai. Užšaldymo-atšildymo procesas besidalijančiose ląstelėse sukelia DNR dvigubos grandinės trūkius ir epigenetinių modifikacijų pokyčius (Falk *et al.*, 2018). Gilus užšaldymas gali sukelti reaktyvių deguonies formų disbalansą ir oksidacinį stresą, kurie gali nulemti promotoriaus sričių hipermetilinimą ir bendrą viso genomo hipometilinimą (Reyes Palomares *et al.*, 2022). DMSO kaip krioprotektoriaus naudojimas gilaus šaldymo metu yra susijęs su padidėjusiu chromatino susikondensavimu ir didesniu ląstelių po atšildymo atsigavimu (Falk *et al.*, 2018). Anksčiau atlikta studija analizavusi DMSO įtaką gilaus užšaldymo metu nustatė, kad net labai mažos DMSO koncentracijos (0,1 %) sukelia viso genomo DNR metilinimo profilio pokyčius širdies audinio modelyje ir taip pat indukuoja *DNMT1* ir *DNMT3A* raiškos padidėjimą. Tačiau nustatyti metilinimo lygio pokyčiai aptikti specifiskai tik tuose genomo regionuose, kurie neturi genų raiškos reguliavimo funkcijos (Verheijen *et al.*, 2019). DMSO citotoksinis efektas gali būti sumažinamas atliekant užšaldymo procedūras žemose temperatūrose ir ribojant biologinių medžiagų ir DMSO kontakto laiką (Traversari *et al.*, 2022). Taigi, trumpalaikis DMSO poveikis naudojant žemas temperatūras neturėtų sukelti šalutinių efektų ląstelių molekulinėms savybėms. Nepaisant to, mūsų aptikti DNR metiltransferazių genų raiškos ir DNR metilinimo lygio pokyčiai patvirtina tolimesnių tyrimų poreikį, kurie plačiau įvertintų po audinio gilaus užšaldymo sukeltą DNR metilinimo pokyčių svarbą.

Tyrimo metu taip pat vertinome endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaką pasirinktų miRNR raiškos lygių pokyčiams. Nustatėme, kad hsa-miR-145-5p raiška sumažėja užšaldytame endometriumo audinyje, ir šis sumažėjimas išlieka ir iš Krio audinio išskirtose stromos ląstelėse. hsa-miR-145 padidėjimas buvo susietas su pasikartojančiu implantacijos nepakankamumu ir endometriozės sukeltu nevaisingumu (Saare *et al.*, 2017; Jahanbakhsh *et al.*, 2023). Padidėjęs hsa-miR-145 lygis, kuris tiesiogiai

slopina *IGF1* geno raišką, buvo susietas su sutrikusiu embriono prisitvirtinimu prie endometriumo paviršiaus (Kang *et al.*, 2015). Be to, miR-145 tiesiogiai slopina DNMT3A (Zhang *et al.*, 2018) ir DNMT3B (Xue *et al.*, 2015). Tad mūsų tyrimo metu nustatytas po endometriumo audinio gilaus užšaldymo ir atšildymo nustatytas hsa-miR-145-5p raiškos sumažėjimas koreliuoja su anksčiau aprašytu DNR metiltransferazių genų raiškos padidėjimu, o šio miRNR kiekio sumažėjimas galimai susijęs su endometriumo ląstelių geresne prognoze reprodukcinės funkcijos užtikrinimui.

Apibendrinant, mūsų atlikti tyrimai papildė esamas žinias apie audinio gilaus užšaldymo poveikio įvairialypę įtaką stromos ląstelių bendrosioms charakteristikoms, genų raiškai ir epigenetinėms modifikacijoms, tokioms kaip histonų potransliacinės modifikacijos, DNR metilinimas ir miRNR raiškos lygiai (4.1 pav.). Po užšaldymo nepakinta pagrindinės MSL savybės įskaitant paviršiaus žymenų raišką ir diferenciacijos potencialą. Nustatytas sumažėjęs iš užšaldyto endometriumo audinio išskirtų ląstelių proliferacijos potencialas tik vėlyvuose ESL pasažuose ir sumažėjęs *SUSD2* raiška pasižymintųjų ląstelių kiekis, bei padidėjęs DNR metiltransferazių ir sumažėjęs DNR metilinimo ir hsa-miR-145-5p lygis leidžia suprasti užšaldymo metu sukiamų pokyčių kompleksiskumą. Šios žinios yra svarbios siekiant optimizuoti audinių gilaus užšaldymo metodus bei besiplečiant užšaldytų mėginių pritaikymui įvairiose srityse, įskaitant regeneracinę mediciną, ląstelių terapiją ir reprodukcinę sveikatą.



4.1 pav. Endometriumo audinio gilaus užšaldymo įtaka išskirtoms stromos ląstelėms. Audinio gilaus užšaldymo poveikio įtaka stromos ląstelių bendrosioms charakteristikoms, genų raiškai ir epigenetinėms modifikacijoms, tokioms kaip histonų potransliacinės modifikacijos, DNR metilinimas, ir miRNR raiškos lygiai. n. s. nėra skirtumų. Paveikslas sukurtas naudojant Biorender.com.

4.2. Epigenetinių veiksnių pokyčiai ESL *in vitro* decidualizacijos metu

Analizuojant epigenetinių veiksnių pasikeitimus ESL decidualizacijos metu, pirmiausia įvertinome DNR metilinimo lygio pokyčius. Mes pademonstravome, kad DNR metiltransferazių DNMT1 ir DNMT3B iRNR kiekiai sumažėjo po ESL decidualizacijos indukcijos. DNMTazių raiškos sumažėjimas taip pat buvo patvirtintas endometriumo sekretinės fazės metu (Yamagata *et al.*, 2009) ir *in vitro* ESL decidualizacijos metu (Logan *et al.*, 2013). Nepaisant nustatyto sumažėjusio DNMTazių genų raiškos lygio, nenustatėme reikšmingų DNR metilinimo lygio pokyčių su decidualizacija susijusių genų srityse indukuotos ESL decidualizacijos pradžioje. Analizuotų genų promotorių regionų DNR metilinimo lygis buvo labai žemas dar prieš decidualizacijos stimuliaciją ir nekito jos metu. Didesnis DNR metilinimo lygis genus koduojančiuose regionuose nei promotorių srityse galėtų būti paaiškinamas tuo, kad šiose srityse DNR metilinimo funkcija yra susijusi su alternatyviojo splaisingo reguliavimu (Shayevitch *et al.*, 2018). Taip pat skirtumų nenustatėme aukšto DNR metilinimo lygio su decidualizacija susijusių genų egzonų srityse, tačiau analizuojant genų egzonines sritis, kuriose nustatytas žemas DNR metilinimo lygis, buvo aptikti reikšmingi skirtumai po decidualizacijos indukcijos. Nėra aišku, ar šie pokyčiai galėtų turėti funkcinę reikšmę genų raiškos reguliacijoje. Taigi, nepaisant nustatytų variacijų DNR metilinimą reguliuojančių veiksnių genų raiškoje, DNR metilinimo lygio įvertinimo rezultatai leidžia manyti, kad DNR metilinimo pokytis nėra decidualizacijos genų raišką reguliuojantis veiksnys ESL indukuotos decidualizacijos metu. Anksčiau atlikta pilno genomo DNR metilinimo analizė atskleidė, kad ESL kultivuojant su E2 ir P4 reikšminga įtaka DNR metilinimo profiliui taip pat nebuvo nustatyta, o histonų modifikacijos ir iRNR raiška buvo reikšmingai pakitusios (Maekawa *et al.*, 2019). Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, kad DNR metilinimas nėra toks svarbus reguliuojantis veiksnys ESL decidualizacijos metu.

Savo tyrimo metu patvirtinome, kad histonų acetilinimo modifikacijos pokyčiai yra svarbesni ESL decidualizacijos metu nei DNR metilinimo pasikeitimai. Analizuojant ESL histonus modifikuojančių veiksnių genų raiškos pokyčius, pademonstravome, kad decidualizuojant ESL *in vitro* HDAC2 iRNR lygis išaugo, šio baltymo kiekybinės analizės metu nustatėme kiekio sumažėjimą. Šis neatitikimas tarp geno raiškos ir baltymo kiekio gali būti paaiškinamas tuo, kad iRNR kiekis dažnai tiesiogiai nekoreliuoja su koduojamo baltymo lygiu (Wegler *et al.*, 2019). Anksčiau atliktas tyrimas įvertino endometriumo audinio mėginius surinktus skirtingais menstruacinio ciklo etapais ir nenustatė HDAC1/3 iRNR kiekių pokyčių, tačiau HDAC2

baltymo lygis buvo nežymiai, bet reikšmingai padidėjęs sekrecinės fazės metu (Krusche *et al.*, 2007). Kito tyrimo metu pademonstruota, kad kultivuojant ESL su E2 (proliferacinė stadija) padidėja HDAC2 kiekis, o E2 ir P4 (sekrecinė stadija) poveikis šio baltymo raišką, kaip ir mūsų atveju, sumažina (Colon-Diaz *et al.*, 2021). Taip pat mūsų tyrimas atskleidė, kad ESL indukuojant decidualizaciją *in vitro* bendras H4hyperAc lygis išauga ir, kaip aprašyta anksčiau, sumažėja histonų deacetilavimo veiksnio HDAC2 kiekis. Šis persitvarkymas yra reikalingas decidualizacijai specifinių diferenciacijos signalinių kelių aktyvavimui. Ankstesniame kitų tyrėjų tyrime taip pat pademonstruota, kad ESL kultivuojant su E4 ir P4 nustatytas padidėjęs bendras histono H4 acetilavimo lygis (Sakai *et al.*, 2003). Taigi mūsų rezultatai papildė žinias apie histonų acetilavimo pokyčių, išskiriant H4hyperAc modifikaciją, svarbą ESL decidualizacijos metu užtikrinant efektyvią endometriumo funkciją.

Kadangi parodėme, kad bendras H4hyperAc lygis padidėja ESL decidualizacijos metu, toliau analizavome, ar šis aktyvaus chromatinio žymens lygio kitimas yra stebimas su decidualizacija susijusių genų srityse. Mes nustatėme reikšmingą H4hyperAc lygio padidėjimą decidualizacijos procesui svarbius transkripcijos veiksnius koduojančių *WNT4*, *HAND2* ir *STAT5A* promotorių srityse. Anksčiau buvo nustatyta, kad kitos histonų acetilavimo modifikacijos H3K27Ac, kuri taip pat yra susijusi su aktyviu chromatinu, lygis padidėja *FOXO1*, *PRL* ir *IGFBP1* promotorių srityse ESL decidualizacijos metu (Jozaki *et al.*, 2019). Taigi su decidualizacija susijusių genų (*WNT4*, *HAND2* ir *STAT5A*) raiškos aktyvavimas yra specifiskai susijęs su H4hyperAc lygio padidėjimu šių genų promotorių srityse ESL decidualizacijos metu.

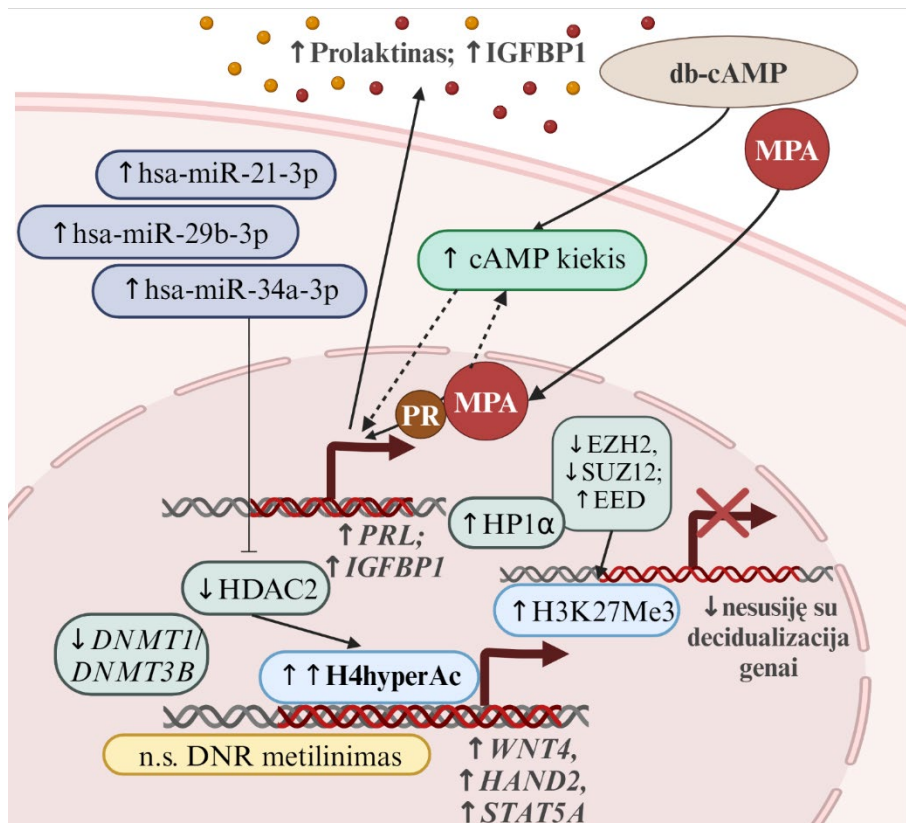
Toliau analizavome histonų metilavimo modifikacijos lygio pokyčius ESL *in vitro* indukuotos decidualizacijos metu. Mūsų tyrimo rezultatai patvirtino, kad tiek EZH2 iRNR, tiek baltymo kiekiai sumažėjo ESL decidualizacijos metu, tačiau nustatėme padidėjusį H3K27Me3 lygį decidualizuotose ESL lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. EZH2 trimetilindamas 27-tą histono H3 lizino liekaną, suformuoja H3K27Me3 modifikaciją, kuri sukelia genų raiškos slopinimą (Mesa *et al.*, 2020). Ankstesnių tyrimų metu buvo pademonstruota, kad EZH2 raiška taip pat sumažėjo *in vitro* ir *in vivo* decidualizacijos metu, atitinkamai sumažėjant ir H3K27Me3 lygiui (Retis-Resendiz *et al.*, 2021). Įprastai, ESL decidualizacijos metu, H3K27Me3 modifikacija su decidualizacija susijusių genų promotorių srityse yra pakeičiama H3K27Ac, kuri yra aktyvaus chromatinio žymė (Kato *et al.* 2018). Mūsų tyrimo metu nustatytas bendras H3K27Me3 lygio padidėjimas, tačiau šie rezultatai neatskleidžia šios modifikacijos pokyčių specifiniuose genomo regionuose,

pvz. su decidualizacija susijusių genų srityse. Neatitikimą tarp EZH2 ir šio veiksnio moduluojančios H3K27Me3 lygio pokyčius galėtų paaiškinti kita studija, kurios metu pademonstruota, kad EZH2 kiekio sumažėjimas neturėjo įtakos bendram H3K27Me3 lygiui, kadangi šios modifikacijos palaikymą užtikrina EZH1 aktyvumas (Grimaldi *et al.*, 2011). Genų raišką slopinančios modifikacijos H3K27Me3 lygio padidėjimas genų, susijusių su ląstelių augimu ir proliferacija, promotorių sekose yra svarbus šių genų užslopinimui, kad ląstelėje įvyktų perėjimas iš proliferacinės į diferenciacinę būseną (Grimaldi *et al.*, 2011). Kita vertus, EZH2 lygio sumažėjimas gali būti svarbus genų raiškai, kurie yra aktyvuojami atsakant į decidualizacijos stimulą. Taigi, ESL decidualizacijai yra būdingas EZH2 raiškos sumažėjimas ir kartu stebimas bendras H3K27Me3 lygio padidėjimas, kuris yra svarbus decidualizacijos metu su diferenciacijos procesu nesusijusių genų raiškos slopinimui.

Galiausiai, analizuodami epigenetinių modifikacijų persitvarkymus ESL decidualizacijos metu, įvertinome pasirinktų reprodukcijos funkcijai svarbių miRNR lygio pokyčius. Mes nustatėme, kad *in vitro* decidualizacijos metu ESL padidėjo hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p ir hsa-miR-34a-3p raiškos lygiai. hsa-miR-21-3p skatina angiogenezę ir fibroblastų reguliaciją žaizdų gijimo proceso metu (Hu *et al.*, 2018). hsa-miR-29b-3p sumažina virkštelės endotelinų ląstelių uždegiminį atsaką, apoptozę ir paskatina šių ląstelių proliferaciją (Tong *et al.*, 2022). hsa-miR-29-3p taikiniai yra DNR metilinimą reguliuojančių veiksnių (DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3) iRNR. hsa-miR-34a-3p potencialus taikinytis yra HDAC2 (miRDB duomenų bazė). Šių miRNR raiškos padidėjimas ESL decidualizacijos metu koreliuoja su mūsų nustatytu epigenetinių veiksnių (DNMT3A, DNMT3B, HDAC2) raiškos slopinimu. Taigi, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p ir hsa-miR-34a-3p lygio padidėjimas ESL decidualizacijos metu yra svarbus užtikrinant endometriumo audinio funkcionavimą, inicijuojant DNR metilinimo ir histonų modifikacijų pokyčius ir taip reguliuojant uždegiminius, angiogeninius ir audinio atsistatymo procesus.

Apibendrinant ESL decidualizacijos metu analizuotus epigenetinės reguliacijos veiksnius, įvertinome DNR metilinimo, histonų modifikacijų ir miRNR lygių pokyčius (4.2 pav.). Nepaisant nustatytos sumažėjusios DNMTazių genų raiškos, nenustatėme DNR metilinimo lygio pokyčių su decidualizacija susijusių genų srityse. Padidėjęs bendras H4hyperAc lygis ir sumažėjęs HDAC2 kiekis, bei H4hyperAc lygio padidėjimas su decidualizacija susijusių genų promotorių sekose, pagrindžia histonų acetilinimo pokyčių aktualumą ESL decidualizacijos metu. Nustatytas padidėjęs ir bendras neaktyvaus chromatinio žymės H3K27Me3 kiekis yra

reikalingas su decidualizacija nesusijusių genų slopinimui. miRNR analizė atskleidė, kad hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p ir hsa-miR-34a-3p yra svarbūs reguliaciniai veiksniai, kurių raiška išauga ESL decidualizacijos metu.



4.2 pav. Epigenetiniai pokyčiai ESL decidualizacijos metu. Įvertinti po indukuotos ESL decidualizacijos nustatyti epigenetiniai pokyčiai įskaitant histonų modifikacijas, DNR metilinimo lygį ir miRNR kiekius. n. s. – nėra skirtumų. Paveikslas sukurtas naudojant Biorender.com.

4.3. hCG įtaka ESL savybėms

Analizavome vieno iš pirmųjų embriono sekretuojamo veiksnio hCG, signalizuojančio endometriui apie embrioną (d'Hauterive *et al.*, 2022), įtaką ESL savybių pokyčiams. Atlikto tyrimo metu pirmiausia nustatėme, kad 10 IU/ml ir 50 IU/ml hCG poveikis neigiamos įtakos ESL metaboliniam aktyvumui ir ląstelių gyvybingumui neturėjo. Didesnės hCG koncentracijos (100 IU/ml) poveikis slopino ląstelių metabolinį aktyvumą. Ankstesnis tyrimas analizavęs hCG įtaką kiaušidžių ląstelėms pademonstravo, kad 0,1 – 10 IU/ml hCG poveikis taip pat neturėjo neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui, o po 100 IU/ml hCG poveikio nustatytas net padidėjęs ląstelių

gyvybingumas (Hirata *et al.*, 2015). Hirata ir kolegos taip pat teigia, kad hCG veikdamas kartu su P4 padidina kiaušidžių ląstelių išgyvenamumą ir to pačio ciklo metu sumažėjus P4 kiekiui gali sukelti ląstelių apoptozę (Hirata *et al.*, 2015). Taigi, hCG įtaka ESL savybėms priklauso nuo naudojamos koncentracijos ir tuometinio ląsteles veikiančio hormoninio fono.

Mūsų tyrimo metu pademonstravome, kad hCG poveikis decidualizacijos žymenų raiškai taip pat priklauso nuo pasirinktos koncentracijos. Nustatėme, kad 10 IU/ml hCG poveikis lėmė didžiausią decidualizacijos žymens PRL raišką ESL. Tačiau skatinamąjį poveikį decidualizacijos procesui nustatėme tik prieš tai decidualizuotose ESL, o naudojamas atskirai hCG poveikis PRL geno raiškai įtakos neturėjo. Šis rezultatas atitinka organizmui būdingą procesą, kadangi endometriumo stroma pradeda decidualizuoti kiekvieno ciklo metu iškart po ovuliacijos, tad tuo metu, ir kai blastocista pasiekia gimdą ir pradeda sekretuoti hCG, ESL jau būna pradėjusios decidualizuotis (Ochoa-Bernal ir Fazleabas, 2020). Taigi šie mūsų rezultatai taip pat patvirtina, kad pats hCG nėra pirminis decidualizacijos induktorius (Kasahara *et al.*, 2001), o jo poveikis papildomai sustiprina jau inicijuotą decidualizacijos procesą.

Teigiama hCG įtaka decidualizacijai taip pat buvo parodyta *in vivo*, pelėms transplantavus žmogaus endometriumo audinio fragmentus ir injekuojant hCG, buvo nustatyti padidėję decidualizacijos paveikti audinio plotai bei *PRL* ir *IGFBP1* raiška (Koch *et al.*, 2018). Anksčiau atliktas kitų mokslininkų tyrimas taip pat patvirtino, kad 10 IU/ml hCG koncentracija buvo pakankama sukeldami viduląstelinio cAMP kiekio padidėjimą ir tolimesnį Erk1/2 fosforilinimo aktyvavimą ESL. 1 IU/ml hCG koncentracija reikšmingos įtakos signalinio kelio aktyvacijai neturėjo (Tapia-Pizarro *et al.*, 2017). Kito tyrimo metu, kuriame teigiama kad hCG vis dėlto nesukelia funkcinio atsako ESL, buvo naudojama 5,82 IU/ml hCG (Mann *et al.*, 2022), tad galimai aktyvinamasis hCG efektas nebuvo stebimas dėl pasirinktos per mažos koncentracijos. Didesnės hCG koncentracijos neigiamą įtaką patvirtino kitas tyrimas, kuriame buvo naudota 500 IU/ml hCG ir nustatyta, kad po šios koncentracijos poveikio buvo užslopinta E2 ir P4 sukelta IGFBP-1 sintezė ir sekrecija (Fleming *et al.*, 2008). Remiantis mūsų gautais rezultatais ir apžvelgtais tyrimais nustatėme, kad skirtingos hCG koncentracijos turi skirtingą įtaką decidualizacijos procesui. Ypač reikšmingas yra 10 IU/ml hCG poveikis, po kurio nustatyta efektyviausiai padidėjusi decidualizacijos žymenų raiška prieš tai jau indukuotose decidualizuoti ESL.

Toliau analizavome hCG ir decidualizacijos įtaką su apoptoze susijusių genų raiškai. Nustatėme, kad hCG poveikis slopina *BAK* raišką, o decidualizacijos poveikis lėmė sumažėjusią *BAX* ir *BCL2* raišką. Bax ir Bak baltymai laikomi apoptozės aktyvatoriais, o Bcl-2 – slopintoju, įprastai šių

veiksnių koncentracija tarpusavyje atvirkščiai koreliuoja (Kulsoom *et al.*, 2018). Šis mūsų nustatytas abiejų su apoptoze susijusių veiksnių raiškos slopinimas gali būti paaiškinamas decidualizacijos metu ženkliai išaugusio hsa-miR-29b-3p kiekio, kuris atpažįsta ir prisijungia tiek prie Bax (Jing *et al.*, 2018), tiek prie Bcl-2 (Pan *et al.*, 2021) iRNR ir nukreipia šias molekules sunaikinimui. Mūsų nustatytas hCG poveikis tik proapoptinio veiksnio *BAK* raiškos sumažėjimui, pagrindžia galimą antiapoptozinį hCG poveikį, kuris taip pat buvo pademonstruotas kiaušidžių ląstelėse, kuomet hCG indukavo antiapoptinio veiksnio Bcl-2 raiškos padidėjimą (Del Canto *et al.*, 2007). Tačiau nepaisant nustatytų su apoptoze susijusių genų raiškos pokyčių, analizuodami ląstelių gyvybingumą nenustatėme nei decidualizacijos, nei hCG neigiamos įtakos gyvų ląstelių skaičiui. Bendrai įvertinus mūsų gautus rezultatus ESL gyvybingumui galima daryti išvadą, kad apoptozę skatinančių ir slopinančių veiksnių genų raiškos slopinimas neturi neigiamos įtakos ESL gyvybingumui decidualizacijos ir poveikio kartu su hCG metu. Apoptozę aktyvuojančio veiksnio Bak geno raiškos slopinimas po hCG poveikio leidžia manyti, kad hCG pasižymi antiapoptoziniu poveikiu ESL.

DNR demetilinimą katalizuojančių TET veiksnių analizės metu nustatėme, kad hCG sukėlė *TET1*, *TET2* ir *TET3* raiškos slopinimą. Šios DNR demetilazės yra svarbios kamieninių ląstelių diferenciacijoje ir indukuojant pluripotentiškumą (Pantier *et al.*, 2019), tačiau nepaisant jų įtakos reguliuojant vaisiaus organų formavimąsi, jos yra svarbios audinių diferenciacijos palaikyme ir po gimimo (Joshi *et al.*, 2022). Nepaisant to, kad mes nenustatėme ESL decidualizacijos įtakos TET veiksnių raiškai, kitas tyrimas pademonstravo, kad po decidualizacijos nustatyta sumažėjusi *TET3* raiška (Roca *et al.*, 2016). *TET3* iRNR yra hsa-miR-29a taikinyš, kurios kiekis, kaip ir mūsų anksčiau pademonstruoto hsa-miR-29b-3p atveju, decidualizacijos metu išauga (Liu *et al.*, 2021). *TET3* baltymo raiškos sumažėjimas patvirtintas ir endometriumo audinio mėginiuose surinktuose proliferacinės ir sekrecinės fazės metu, taip pat ankstyvo nėštumo decidualiniame audinyje, o šio baltymo kiekio padidėjimas siejamas su ankstyvu nėštumo praradimu (Jin *et al.*, 2023). Taigi hCG sukeltas DNR demetilazių raiškos slopinimas galimai yra susijęs su endometriumo audinio diferenciacijos palaikymu.

Su imuniniu atsaku susijusių veiksnių analizė atskleidė, kad hCG poveikis turėjo įtakos *IL6* raiškos slopinimui, o kitų dviejų analizuotų veiksnių raiška *IL1B* ir *IL11* buvo aktyvuota tik po decidualizacijos indukcijos stimulo. IL-6 yra citokinas, kuriam būdinga uždegimą skatinančios savybės. Jis yra susijęs su ESL proliferacijos slopinimu (Li *et al.*, 2017), taip pat padidėjusi šio citokino koncentracija yra nustatoma endometriozės atveju (Kang *et al.*, 2014;

Kolahdouz-Mohammadi *et al.*, 2020). Embriono sekretuojamas hCG lemia padidėjusią, taip pat uždegimą skatinančio veiksnio, LIF koncentraciją endometriume (Hajipour *et al.*, 2021), bet tuo pat metu nustatytas sumažėjęs IL-6 kiekis, taip galimai užtikrinant uždegiminės būsenos balansą (Mourik *et al.*, 2009; Gridelet *et al.*, 2020). IL-1 β yra vienas pagrindinių veiksnių, kontroliuojančių uždegiminį endometriumo atsaką į embrioną, užtikrinant sėkmingą blastocistos implantaciją, tai taip pat svarbus decidualizacijos proceso dalyvis (Halari ir Lala, 2021; Kwon *et al.*, 2023). Padidėjęs IL-11 kiekis nustatomas endometriumo ciklo sekrecinės stadijos metu. Šis interleukinas kontroliuoja gimdos užląstelinę erdvę, reikalingą decidualizacijos procesui, ir taip pat prisideda išlaikant P4 sukeltus morfologinius ir biocheminius decidualizacijai būdingus pokyčius (Basar *et al.*, 2010; Dimitriadis *et al.*, 2010). Tyrimas, kuriuo metu buvo analizuojami citokinių sekrecijos profilio pokyčiai po hCG poveikio, patvirtino IL-6 sumažėjimą, taip pat nustatė, kad IL-1 β kiekis po šio poveikio padidėja (Srivastava *et al.*, 2013). Taigi hCG poveikis, net ir nepriklausomai nuo decidualizacijos, geba slopinti IL-6 raišką ESL, taip reguliuojant endometriumo audinio uždegiminę būseną.

hCG poveikio įtaka taip pat nustatyta su metabolizmu susijusių genų raiškai. Kaip prieš tai pademonstruota, jog didesnės hCG koncentracijos lemia sumažėjusi metabolinį aktyvumą, tai patvirtinome ir genų raiškos lygyje, nustatę kad 50 IU/ml hCG poveikis sumažino *PPARGC1A* raišką, kuri buvo išaugusi ESL decidualizacijos metu. *PPARGC1A* yra vienas iš pagrindinių mitochondrijų biogenezę reguliuojančių veiksnių (Aisyah *et al.*, 2022). Taip pat žinoma, kad *PPARGC1A* yra transkripcijos koaktyvatorius katalizuojantis aktyvią chromatiną žymę H3K27Ac. ESL decidualizacijos metu, cAMP padidina *PPARGC1A* pritraukimą prie *IGFBP1* ir *PRL* promotorių ir stipriklų regionų ir padidina H3K27Ac lygį taip aktyvuojant šių genų raišką (Takagi *et al.*, 2022). Taigi, galimai didesnės hCG koncentracijos poveikio sukeltas *PPARGC1A* raiškos slopinimas yra susijęs su mūsų nustatytu decidualizacijos žymenų raiškos sumažėjimu naudojant didesnes koncentracijas. hCG poveikis taip pat slopino *GPX1* raišką. *GPX1* yra ląstelinis fermentas, pasižymintis antioksidaciniu veikimu ir yra aptinkamas žinduolių citoplazmoje ir mitochondrijose. Nors kaip antioksidantas *GPX1* reguliuoja reaktyvių deguonies formų balansą, tačiau išaugęs *GPX1* kiekis gali sukelti ląstelių funkcijos sutrikimus dėl per didelio reikalingų reaktyvių deguonies formų pašalinimo (Handy *et al.*, 2022). Taigi, hCG didesnės koncentracijos poveikis slopina ląstelių metabolinį aktyvumą, sumažinant mitochondrijų biogenezę palaikančio veiksnio kiekį, ir šis pokytis taip pat prisideda prie decidualizacijos žymenų raiškos sumažėjimo.

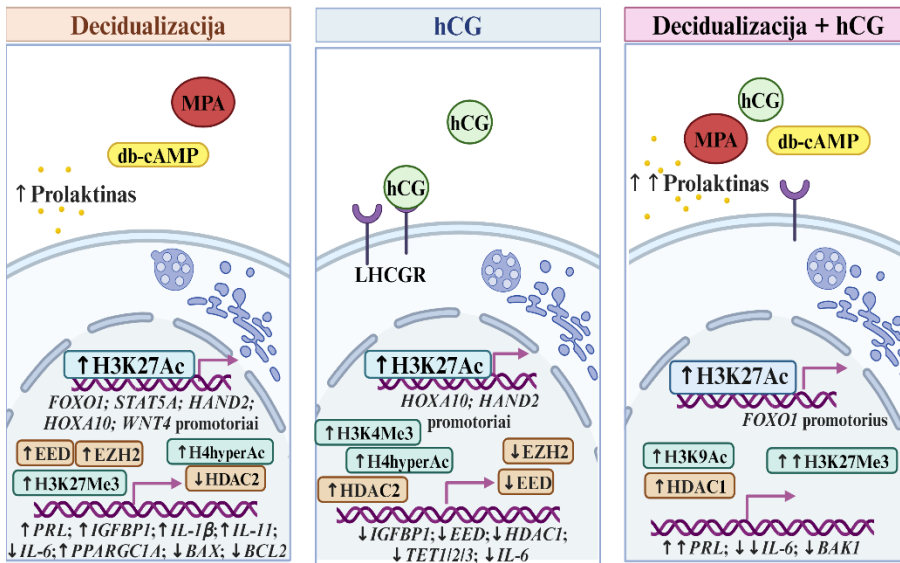
Analizuojant hCG įtaką ESL histonų modifikacijoms ir jas moduluojantiems veiksniams, nustatėme, kad jau po trumpalaikio (6 val.) hCG poveikio padidėja bendras aktyvių histonų modifikacijų H3K27Ac, H3K4Me3 ir H3K9Ac lygis ir histonų deacetilazės, HDAC2, kiekis. Tačiau šių modifikacijų lygiai po 24 val. hCG poveikio trukmės nebesiskiria nuo kontrolės. Patvirtinę, kad po decidualizacijos stimulo padidėja bendras hiperacetilinto histono H4 (H4hyperAc) lygis, nenustatėme hCG poveikio papildomos įtakos šios histonų modifikacijos lygio pokyčiams. Neseniai atliktas tyrimas pademonstravo, kad kiaušidžių ląstelėse trumpalaikis hCG poveikis (1-2 val.) indukuoja fosforilinto HDAC2 kiekio padidėjimą ir tai nulemia viso genomo histonų deacetilimą (Jin *et al.*, 2023). Šis deacetilimas jau po 4 val. yra pakeičiamas suformuojant specifinį histonų acetilinimo profilį, reikalingą ovuliacijai inicijuoti (Jin *et al.*, 2023). To paties tyrimo metu pademonstruota, kad H3K27Ac lygis pakyla genuose, susijusiuose su transliacija, iRNR sinteze, histono H3 acetilimu ir teigiama transkripcijos reguliacija (Jin *et al.*, 2023). Taigi, hCG poveikis geba dinamiškai reguliuoti bendrus histonų acetilinimo pokyčius nulemiant audinių pasikeitimams būdingus ląstelių pokyčius.

Mūsų tyrimų metu taip pat nustatėme, kad ilgesnės trukmės (24 val.) hCG poveikis turėjo papildomą efektą bendram H3K27Me3 lygio padidėjimui, kuris prieš tai jau buvo indukuotas po decidualizacijos stimulo. Taip pat nustatėme PCR2 kompleksą, kuris katalizuoja šią histono modifikaciją, komponentų EZH2 ir EED kiekio padidėjimą. Anksčiau atliktas tyrimas pademonstravo, kad hCG ESL sukeltas H3K27Me3 lygio padidėjimas yra susijęs su chemokinais, kurie į gimdą pritraukia imunines ląsteles, slopinimu, taip suformuojant imunotolerantišką aplinką, reikalingą embriono implantacijai (Silasi *et al.*, 2020). Tad, remiantis mūsų gautais rezultatais galima teigti, jog hCG reguliacija ESL pasireiškia ne tik per histonų acetilinimo, bet ir metilino modifikacijų lygių pokyčius taip aktyvuojant ar slopinant atitinkamų genų raišką, reikalingą endometriumo audinio receptyvumui užtikrinti.

Nustatę bendrus histonų modifikacijų pokyčius, nulemtus hCG signalinio kelio, toliau analizavome, kaip šie pokyčiai pasireiškia specifiniuose genomo vietose. Mūsų rezultatai atskleidė, kad indukavus decidualizaciją padidėjo chromatino aktyvios žymės H3K27Ac lygis su decidualizacija susijusių genų (*FOXO1*, *STAT5A*, *HAND2*, *HOXA10*, *WNT4*) promotorių srityse. Be to, tyrimo metu pademonstravome, kad hCG poveikis nepriklausomai (be decidualizacijos induktorių) sukėlė H3K27Ac padidėjimą *HOXA10* ir *HAND2* promotorių sekose, o *FOXO1* promotoriaus srityje šios aktyvios histono modifikacijos lygis papildomai padidėjo decidualizacijos terpę papildžius

hCG. HOXA10 yra viena iš endometriumo receptyvumą reguliuojančių molekulių (Sahar *et al.*, 2019). Anksčiau buvo pademonstruota, kad hCG injekcija į gimdą sukėlė padidėjusią *HOXA10* geno raišką (Zhu *et al.*, 2020). HOXA10 raiškos padidėjimas taip pat buvo patvirtintas endometriumo audinio gabalėlius inkubuojant su hCG (Fogle *et al.*, 2009). HAND2 kaip ir HOXA10 yra svarbus implantacijos žymuo, kadangi jis geba kontroliuoti estrogeno ir progesterono receptorių balansą, reikalingą užtikrinant sėkmingą embriono implantaciją (Huyen ir Bany, 2011; Sucurovic *et al.*, 2020). FOXO1 yra laikomas ESL decidualizacijos žymeniu, kadangi šis transkripcijos faktorius reguliuoja *PRL* ir *IGFBP1* genų raišką (Adiguzel ir Celik-Ozenci, 2021). Mūsų gauti rezultatai taip pat koreliuoja su tyrimais, kurie vertino hCG poveikį su P4 gamyba susijusio geno srityje ir nustatė, kad po 4 val. hCG poveikio šioje srityje padidėja acetilinto H4 ir H3K4Me3 (aktyvaus chromatino žymės) modifikacijų lygis, tuo pačiu metu šioje srityje sumažėjus H3K9Me3, H3K27Me3 (užslopinto chromatino žymės) ir EZH2 kiekiui (Maekawa *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2013). Tuo pačiu metu hCG poveikis slopino pagrindinio estrogeno sintezėje dalyvaujančio fermento raišką, kuri buvo kontroliuojama sumažėjus šį fermentą koduojančio geno srities acetilintos formos histono H3 ir H4, H3K4Me3 ir H3K9Me3, bei padidėjus H3K27me3 lygiui ir dėl šių pokyčių visumos sumažėjus chromatino prieinamumui šio geno promotoriaus srityje (Lee *et al.*, 2013). Taigi mūsų rezultatai leidžia manyti, kad hCG poveikis ESL yra specifiskai susijęs su implantacija (*HOXA10*, *HAND2*) ir decidualizacija (*FOXO1*) susijusių genų raiškos aktyvavimu per šių genų promotorių srities histonų acetilinimo lygio padidėjimą.

Apibendrinant hCG įtaką ESL nustatėme, kad hCG poveikis priklauso nuo pasirinktos koncentracijos ir apima įvairius molekulinis taikinius, įskaitant histonų modifikacijas ir genų raiškos pokyčius (4.3 pav.). Išskiriant reikšmingiausias nustatytus pokyčius, mes pademonstravome, kad 10 IU/ml hCG poveikis efektyviai padidina decidualizacijos žymens *PRL* raišką prieš tai decidualizuotose ESL, bei slopina *IL6* raišką. Taip pat mes nustatėme, kad hCG sukėlė bendrą H3K27Ac lygio padidėjimą, kuris specifiskai nustatytas ir patvirtintas implantacijos ir decidualizacijos procesų veiksnius koduojančių genų (*HOXA10*, *HAND2* ir *FOXO1*) promotorių srityse.



4.3 pav. Decidualizacijos ir hCG įtaka ESL. Decidualizacijos (db-cAMP, MPA) ir hCG, bei šių poveikių kombinacijos įtakos palygimas analizuojant ESL histonų modifikacijų ir jas reguliuojančius veiksnius lygių, genų raiškos pokyčius ir sekretuojamo PRL kiekius. LHCGR – liuteinizuojančio hormono ir chorioninio gonadotropino receptorius. Paveikslas sukurtas naudojant Biorender.com.

4.4. Decidualizacijos ir hCG poveikio įtaka EV baltymų ir miRNR profiliams

Sėkmingam nėštumui yra būtina tarpląstelinė komunikacija įskaitant endokrininius, parakrininius ir autokrininius veiksnius. EV yra tiesioginis ir dinaminis komunikacijos tarp embriono ir motinos audinių būdas užtikrinant blastocistos vystymąsi, embriono sąlygojamą endometriumo receptyvumo reguliaciją ir trofoblasto invaziją (Hart *et al.*, 2022; Sui *et al.*, 2023). Įrodyta, kad endometriumas sekretuoja EV, kuriuos perneša baltymus, lipidus, RNR ir miRNR į recipientines artimų audinių ląsteles, taip inicijuojant kritinius procesus implantacijos ir placencijos metu (Beal *et al.*, 2023). Taip pat pademonstruota, kad endometriumo epitelio ląstelių sekretuojamos EV yra sėkmingai internalizuojamos blastocistos (Segura-Benitez *et al.*, 2023). EV yra susijusios su epigenetine reguliacija, kadangi epigenetiniai veiksniai yra atsakingi už EV biogenezę ir heterogeniškumą, o EV pernešami veiksniai toliau reguliuoja recipientinių ląstelių epigenomą (Zhou *et al.*, 2024). Savo tyrimo metu išanalizavę decidualizacijos ir vieno pirmųjų embriono signalų hCG įtaką ESL EV baltymų profiliui, nustatėme, kad būtent decidualizacijos signalas sukelia daugiausiai pokyčių, o hCG efektas yra užgožiamas

decidualizacijos sukeliama poveikio. Decidualizacijos poveikis lemia padidėjusį kiekį EV baltymų, susijusių su embriono implantacija, nėštumu, ir su šiais procesais susijusiais endometriumo audinio persitvarkymais įskaitant užląstelinio užpildo, angiogenezės ir imuninio atsako reguliacija. Ankstesni tyrimai taip pat patvirtino, kad endometriumo EV pernešamas turinys reguliuoja audinių persitvarkymą, skatina angiogenezę, antioksidacinį aktyvumą ir imunosupresinę funkciją, taip pat padidina trofoblasto ląstelių migraciją ir invaziją (Fatmouss *et al.*, 2022; Sui *et al.*, 2023). Decidualizuotų ESL EV perneša įvairius baltymus, įskaitant susijusius su ląstelių signalinėmis molekulėmis, augimo ir metaboliniais reguliatoriais, taip pat veiksniais, kontroliuojančius endotelinių ląstelių augimą ir persitvarkymą. Maža to, stromos kilmės EV internalizacija į endotelines ląsteles teigiamai stimuliuoja jų proliferaciją ir lemia padidėjusį kraujagyslių tinklo formavimąsi (Ma *et al.*, 2022). Taigi, ESL decidualizacijos stimulo poveikis yra susijęs su užląstelinės komunikacijos pokyčiais per EV, reguliuojant užląstelinio užpildo, angiogenezės ir imuninio atsako reguliacijos procesus, reikalingus nėštumo pasirengimui.

Savo tyrimo metu nustatėme, kad decidualizacijos poveikis ESL lemia reikšmingai padidėjusį su embriono implantacija ir nėštumu susijusių veiksnių, tokių kaip AGT, FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAM, PAPP, WNT4 kiekį EV. AGT yra angiotenzino pirmtakas, atsakingas už kraujospūdžio, druskų ir skysčių homeostazės reguliavimą, kuris yra ypač svarbus nėštumo metu (Lumbers ir Pringle, 2014). FBLN1 yra užląstelinį užpildą reguliuojantis baltymas intensyviai ekspresuojamas placentos audinyje (Orvik *et al.*, 2021). Sumažėjęs užląstelinio užpildo stabilumą palaikančio FBLN1 kiekis nustatomas savaiminio priešlaikinio gimdymo atvejais lyginant su nekomplikuotais nėštumais (Beernink *et al.*, 2023). IGFBP1 kaip jau minėta anksčiau yra plačiai pripažįstamas decidualizacijos proceso žymuo, kurio pagrindinė funkcija yra IGF prisijungimas, taip reguliuojant šios molekulės bioaktyvumą ir prailginant skilimo pusperiodį. IGFBP1 kiekis nėštumo metu koreliuoja su motinos organizmo jautrumu insulinui, o sumažėjęs kiekis siejamas su gestaciniu diabetu (Hivert *et al.*, 2024). Kito prie IGF prisijungiančio baltymo IGFBP7 sumažėjęs kiekis yra nustatomas pasikartojančio spontaniško nėštumo netekimo atveju ir siejamas su sutrikusiu trofoblasto invazyvumu (Wu *et al.*, 2022). MMP2 yra užląstelinio užpildo proteinazė gebanti suskaidyti želatiną ir I bei IV tipo kolagenus, todėl yra svarbi kraujagyslių tinklo ir gimdos persitvarkymams siekiant užtikrinti sėkmingą nėštumo vystymąsi (Nikolov *et al.*, 2021). STC1 yra pleotropinis hormonas, reguliuojantis įvairias biologines funkcijas, reikalingas palaikyti moters reprodukcinę funkciją. STC1 kiekis gimdoje

padidėja menstruacinio ciklo sekretinės fazės metu ir taip pat jo kiekis yra kritiškas svarbus ankstyvo nėštumo etapu (Bishop *et al.*, 2021). STC1 ir STC2 inhibuoja PAPPA, kuris yra metaloproteinazė, taip pat reguliuojanti IGF bioaktyvumą, suskaidant prie jo prisijungiančius IGFBP baltymus (Conover *et al.*, 2023). PAM baltymas yra atsakingas už peptidų amidinimo modifikaciją, kuri yra reikalinga, kad susintetinti peptidai būtų funkciškai aktyvūs (Kaufmann *et al.*, 2021). WNT4 reguliuoja moters reprodukcinės sistemos vystymąsį ir užtikrina tinkamą funkcionavimą (Li *et al.*, 2013; Pitzer *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Taigi, baltymų, kurie yra svarbūs embriono implantacijos ir tolimesnio nėštumo metu, kiekis padidėja ESL EV po decidualizacijos poveikio, ir šie pokyčiai yra susiję su įvairiais biologiniais procesais įskaitant kraujotakos reguliaciją, užląstelinio užpildo pertvarkymus ir IGF signalo perdavimo kelią.

Savo tyrimo metu nenustatėme hCG ženkliaus poveikio ESL EV baltymų pokyčiams. Skirtingi rezultatai gauti po hCG poveikio prieš tai nedecidualizuotose ir decidualizuotose ESL. Nedecidualizuotų ESL atveju hCG poveikis sumažino su oksidaciniu fosforiliniu ir mitochondrijų biogeneze susijusių baltymų kiekį. Anksčiau buvo pademonstruota, kad po hCG poveikio aktyvuojama reaktyvių deguonies formų gamybą ląstelėse (Aggarwal *et al.*, 2009). hCG įtakos nenustatėme decidualizuotose ESL, kadangi decidualizuotos ESL yra labiau atsparios oksidaciniam stresui nei nedecidualizuotos (Kajihara *et al.*, 2011). Nustatėme, kad hCG poveikis yra susijęs su proteazės **PRTN3** bei chemokino **CXCL12** kiekio padidėjimu ESL sekretuojamose EV. PRTN3 yra serino proteazė veikianči granuliocitų diferenciacijoje ir daugiausia ekspresuojama granuliuotų neutrofilų (Akgun *et al.*, 2020). CXCL12 yra svarbus veiksnys indukuojantis uždegiminę aplinką, kadangi geba aktyvuoti daugelį leukocitų (Janssens *et al.*, 2017). CXCL12 taip pat yra priskiriamas implantacijos žymenų grupei ir patvirtinta, kad jo raiška pakyla po hCG poveikio (Freis *et al.*, 2019). Nėštumo pradžioje endometriumo audinyje yra aktyvuojami uždegiminiai procesai, kurių metu į motinos ir vaisiaus kontakto vietą pritraukiami tiek įgimto imuniteto komponentai, tokie kaip neutrofilai, tiek ir įgyto, T limfocitai, kurie reikalingi embriono implantacijai, trofoblasto invazijai, endometriumo audinio pertvarkymui ir imuninių ląstelių pritaikimui (Bert *et al.*, 2021). Taigi hCG poveikis sukelia padidėjusį kiekį į ESL EV supakuojamų ir sekretuojamų imuninės reguliacijos veiksnių, reguliuojančių tiek neutrofilus tiek ir limfocitus.

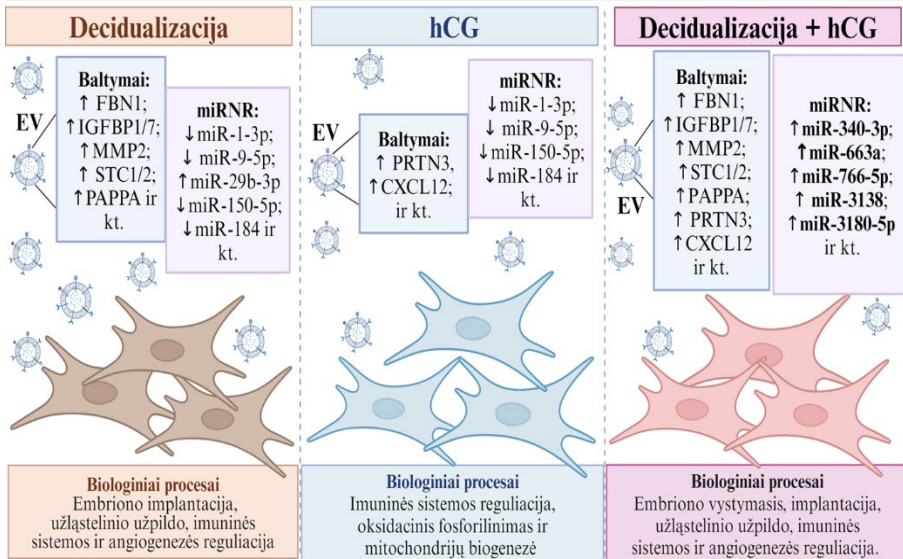
Taip pat įvertinome ir decidualizacijos ir hCG poveikių įtaką ESL sekretuojamų EV miRNR profiliams. Nustatėme, kad didžioji dalis pakitusio lygio miRNR yra unikalios kiekvienam analizuotam poveikiui, o kelios

reikšmingai pakitusio lygio miRNR atsikartojo tarp skirtingų analizuotų poveikių. Tiek po decidualizacijos, tiek ir po hCG poveikio hsa-miR-1-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-150-5p ir hsa-miR-184 raiška sumažėjo lyginant su kontrole. hsa-miR-1-3p kiekis neigiamai koreliuoja su endometriumo storiu ir P4 lygiu implantacinio lango metu, kadangi inhibuoja progersterono receptoriaus raišką (Nothnick, 2022; Dong *et al.*, 2023). Taip pat nustatyta, kad padidėjęs hsa-miR-1-3p kiekis motinos kraujyje susijęs su padidėjusia persileidimo tikimybe (Hrodmadnikova *et al.*, 2023). hsa-miR-9-5p aktyvuoja ESL invazines ir migracines savybes endometriozės atveju (Zheng *et al.*, 2020). Taip pat, preimplantaciniu periodu hsa-miR-9-5p kiekis kraujo plazmoje sumažėja normaliai besivystančio nėštumo atveju (Shen *et al.*, 2024). miR-9-5p slopina estrogeno receptoriaus raišką, taip reguliuojant ląstelių proliferaciją, migraciją ir invaziją (Wang *et al.*, 2021). Padidėjęs miR-150-5p kiekis nustatytas persileidimus patyrusių pacientų kraujyje (Zeng *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2024). Patvirtinta miR-150-5p įtaka placentos ląstelių savybėms susijusioms su migracija, invazija ir angiogeneze, kadangi ši miRNR geba reguliuoti VEGF ir MMP9 raišką (Zeng *et al.*, 2020; Liao *et al.*, 2024). miR-184 padidėjimas taip pat nustatytas pasikartojančiais nėštumo praradimo atvejais (Jairajputi *et al.*, 2021; Patronia *et al.*, 2024) ir tai susieta su šios miRNR įtaka skatinant trofoblastų ląstelių apoptozę (Zhang *et al.*, 2019). Savo tyrimo metu nustatėme, kad decidualizacijos poveikis lėmė padidėjusį EV hsa-miR-29b-3p kiekį, tačiau kuo met decidualizuotos ESL buvo papildomai paveikiamos hCG, šio miRNR raiška sumažėjo. miR-29b-3p kiekio padidėjimas nustatytas pelių pasikartojančio implantacijos nepakankamumo modelyje, ir susietas su neigiama endometriumo angiogenezės reguliacija, inhibuojant VEGFA (Wang ir Chen, 2024). Taip pat, padidėjęs kiekis hsa-miR-29b-3p nustatytas placentos mėginiuose su nėštumu susijusių kraujotakos sutrikimų atvejais (Aharon *et al.*, 2023). Padidėjusi miR-29b raiška iš decidualinio audinio išskirtose MKL sumažina šių ląstelių proliferaciją ir veikdama parakriniškai užslopiną endotelinų ląstelių migracinius pajėgumus ir gebėjimą formuoti vamzdelines struktūras (Xin *et al.*, 2017). Taigi, decidualizacijos ir hCG poveikiai sukelia ESL į EV supakuojamų miRNR, susijusių su nėštumo implantacijos komplikacijomis, kiekio sumažėjimą.

Po decidualizacijos ir hCG, bei šių veiksmų kombinacijos poveikių, ESL EV reikšmingai padidėjusio kiekio miRNR buvo unikalios kiekvienam poveikiui. Decidualizacijos ir hCG poveikio įtaka lyginant tik su decidualizacijos poveikiu, artimiausiai atitinka fiziologinį implantacijos modelį, kuomet atitinkamai pasirengusį (pradėjusi decidualizuoti) endometriumą pasiekia embriono signalas (hCG). Savo tyrimo metu,

nustatėme, kad po decidualizacijos ir hCG poveikio lyginant su tik decidualizacijos poveikiu EV padidėjo hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, hsa-miR-3180-5p ir hsa-miR-4755-5p kiekiai. Pademonstruota, kad EV į kurias supakuojama miR-340-3p padidino žiurkės endometriumo atsistatymą po pažaidos inhibuojant feroptozės procesą (Xiao *et al.*, 2024). Sumažėjęs miR-766-5p kiekis nustatytas pasikartojančio nėštumo praradimo atvejais (Xu *et al.*, 2022). Nustatyta, kad miR-3138 sustiprino atsparumą insulinui žmogaus virkštelės venos endotelinėse ląstelėse netiesiogiai inhibuojant gliukozę pernešančias molekules (Chen *et al.*, 2021). hsa-miR-4755-5p nustatytas efektyviai besivystančiuose blastocistose ir manoma, kad galėtų būti naudojamas, kaip žymuo siekiant identifikuoti gero kokybės blastocistas (Pasquariello *et al.*, 2024). Literatūroje nepavyko aptikti kitų po decidualizacijos ir hCG kombinacinio poveikio EV pakitusio kiekio miRNR įtakos reprodukcinei sistemai. Nepaisant to, pademonstruota šių miRNR svarba kitose organizmo sistemose. Odos ląstelėse atsakingose už plaukų augimą nustatyta, kad miR-3180-5p inhibuoja Bax baltymą ir taip skatina apoptozę (Wei *et al.*, 2023), o dėl hidrodinaminio slėgio šlapimo pūslėje šios miRNR padidėjusi raiška padidina šlapimo pūslės raumenų ląstelių proliferaciją (Sun *et al.*, 2016). miR-663a inhibuoja TGF ir tai sumažina ląstelių migracines savybes bei virsmą iš epitelinių į mezenchimines ląsteles (Qu *et al.*, 2022). Taigi, po decidualizacijos ir hCG poveikio ESL EV padidėjusio kiekio miRNR poveikiai gali būti labai įvairūs, priklausomai nuo aplinkinių sąlygų. Siekiant tiksliai nustatyti šių miRNR įtaką implantacijos procesui endometriumo aplinkoje, būtini tolimesni tyrimai.

Apibendrinant, decidualizacijos, hCG ir jų kombinacijos poveikis ESL EV baltymų ir miRNR kiekio pokyčiams yra įvairialypis (4.4 pav.). Nors tik po decidualizacijos poveikio padidėjo su embriono implantacija ir nėštumu susijusių baltymų (AGT, FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAM, PAPP, WNT4) kiekis ESL EV, hCG specifinis poveikis pasireiškė padidėjusiu su imuninės sistemos reguliacija susijusių baltymų (PRTN3 ir CXCL12) kiekiu. Nustatėme kelis bendrus miRNR (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-184), kurių kiekis sumažėjo po decidualizacijos ir hCG poveikių, o šių miRNR įtaka siejama su reprodukcijos sistemos sutrikimais. hCG poveikis decidualizuotų ląstelių atveju specifiskai sukelia hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138 ir hsa-miR-3180-5p kiekio padidėjimą. Vis dėlto, kiekvienam poveikiui nustatytų unikalių pakitusio kiekio miRNR tiksli įtaka biologiniams procesams išlieka nepatvirtinta ir siekiant nustatyti jų reikšmę implantacijos procesui reikia atlikti tolimesnius tyrimus.



4.4 pav. Decidualizacijos ir hCG įtaka ESL sekretuojamų EV baltymų ir miRNR pokyčiams. Paveikslas sukurtas naudojant Biorender.com.

IŠVADOS

1. Iš pacientų endometriumo mėginių išskirtos ESL pasižymi fibroblastine morfologija, MSL būdinga paviršiaus baltymų (CD44, CD73, CD90, CD105, SSEA4) ir endometriumo kamieniškumo žymenų (CD140b, CD146, SUSD2) raiška, ir gebėjimu diferencijuoti mezodermos kilmės vystymosi kryptimis (adipogenine, osteogenine, chondrogenine) bei efektyviai decidualizuoti.
2. Nustatyta, kad ESL, išskirtų iš endometriumo, kuris buvo užšaldytas ir laikomas skystame azote, mezodermos ląstelių vystymosi kilmei būdingų paviršiaus žymenų raiška ir diferenciacijos potencialo efektyvumas nėra pakitęs. Tačiau iš užšaldyto audinio išskirtose ląstelėse aptikti DNR metilinimo lygio ir šią modifikaciją reguliuojančių veiksnių (DNR metiltransferazės, miR-145-5p) pokyčiai.
3. Po indukuotos *in vitro* decidualizacijos ESL sumažėja DNMTazių raiška, tačiau DNR metilinimo lygis nekinta su decidualizacija susijusių genų srityse. Nustatytas bendras ir specifiskai su decidualizacija susijusių genų (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*) promotorių srityse padidėjęs H4hyperAc lygis ir sumažėjęs HDAC2 kiekis. Patvirtinti išaugę hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p ir hsa-miR-34a-3p kiekiai.
4. hCG poveikis decidualizuotose ESL lemia papildomai padidėjusią decidualizacijos žymens – prolaktino, raišką bei nustatyti sumažėję *IL6* ir *BAK1* raiškos lygiai. Po hCG poveikio stebimas H3K27Ac modifikacijos lygio padidėjimas su decidualizacija (*FOXO1*) ir implantacija (*HOXA10*, *HAND2*) susijusių genų srityse.
5. Po decidualizacijos poveikio padidėja su embriono implantacija ir nėštumu susijusių baltymų (FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAPP) kiekis ESL EV, o hCG poveikis lemia su imuninės sistemos reguliacija susijusių baltymų (PRTN3, CXCL12) kiekio padidėjimą. Po hCG poveikio decidualizuotų ESL EV padidėja hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, hsa-miR-3180-5p kiekis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdallah KS, Makhlof A, Badran E, *et al.* Intrauterine injection of HCG before embryo transfer: a parallel, double-blind randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2021. 43(4):663-9. Doi:10.1016/j.rbmo.2021.06.011
2. Adiguzel D, Celik-Ozenci C. FoxO1 is a cell-specific core transcription factor for endometrial remodeling and homeostasis during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2021. 27(3):570-83. Doi: 10.1093/humupd/dmaa060.
3. Aggarwal A, Misro MM, Maheshwari A, Sehgal N, Nandan D. Adverse effects associated with persistent stimulation of Leydig cells with hCG in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2009. 76(11):1076-83. Doi: 10.1002/mrd.21074.
4. Aghayan HR, Payab M, Mohamadi-Jahani F, Aghayan SS, Larijani B, Arjmand B. GMP-Compliant Production of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2021. 2286:213-25. Doi:10.1007/7651_2020_282
5. Aharon A, Rebibo-Sabbah A, Ahmad RS, Dangot A, Bar-Lev TH, Brenner B, Cohen AH, David CB, Weiner Z, Solt I. Associations of maternal and placental extracellular vesicle miRNA with preeclampsia. *Front Cell Dev Biol*. 2023. 11:1080419. Doi: 10.3389/fcell.2023.1080419.
6. Aisyah R, Sadewa AH, Patria SY, Wahab A. The PPAR γ 1A Is the Gene Responsible for Thrifty Metabolism Related Metabolic Diseases: A Scoping Review. *Genes (Basel)*. 2022. 13(10):1894. Doi: 10.3390/genes13101894.
7. Akgun E, Tuzuner MB, Sahin B, Kilercik M, Kulah C, Cakiroglu HN, Serteser M, Unsal I, Baykal AT. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PloS One*. 2020. 15(10):e0240012. Doi: 10.1371/journal.pone.0240012.
8. Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. 9:117. Doi: 10.3389/fendo.2018.00117.
9. Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J Mol Biol*. 2017. 429(10):1459-75. Doi: 10.1016/j.jmb.2017.02.008.
10. Antebi B, Asher AM, Rodriguez LA 2nd, Moore RK, Mohammadipoor A, Cancio, LC. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *J Transl Med*. 2019. 17(1):297. Doi: 10.1186/s12967-019-2038-5.
11. Ashary N, Laheri S, Modi D. Homeobox genes in endometrium: from development to decidualization. *Int J Dev Biol*. 2020. 64(1-2-3):227-37. Doi: 10.1387/ijdb.190120dm.
12. Auriemma RS, Del Vecchio G, Sciarati R, Pirchio R, Liccardi A, Verde N, *et al.* The Interplay Between Prolactin and Reproductive System: Focus on Uterine Pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020. 11:594370. Doi: 10.3389/fendo.2020.594370.

13. Bahroudi Z, Zarnaghi MR, Izadpanah M, Abedelahi A, Niknafs B, Nasrabadi HT, Seghinsara AM. Review of ovarian tissue cryopreservation techniques for fertility preservation. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2022. 51(2):102290. Doi: 10.1016/j.jogoh.2021.102290.
14. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther*. 2020. 11(1):540. Doi: 10.1186/s13287-020-02054-2.
15. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011. 21(3):381-95. Doi: 10.1038/cr.2011.22.
16. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schonnes DE, Wang Z, *et al*. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007. 129(4):823-37. Doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009.
17. Basar M, Yen CF, Buchwalder LF, Murk W, Huang SJ, Godlewski K, *et al*. Preeclampsia-related increase of interleukin-11 expression in human decidual cells. *Reproduction*. 2010. 140(4):605-12. Doi: 10.1530/REP-10-0263.
18. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)*. 2020. 9(1):21. Doi: 10.3390/biology9010021.
19. Beal JR, Ma Q, Bagchi IC, Bagchi MK. Role of Endometrial Extracellular Vesicles in Mediating Cell-to-Cell Communication in the Uterus: A Review. *Cells*. 2023. 12(22):2584. Doi: 10.3390/cells12222584.
20. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, *et al*. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp*. 2017. 122:55224. Doi:10.3791/55224.
21. Beernink RHJ, Schuitemaker JHN, Zwertbroek EF, Scherjon SA, Cremers TIFH. Early pregnancy biomarker discovery study for spontaneous preterm birth. *Placenta*. 2023. 139:112-9. Doi: 10.1016/j.placenta.2023.06.011.
22. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007. 128(4):669-81. Doi: 10.1016/j.cell.2007.01.033.
23. Bert S, Ward EJ, Nadkarni S. Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. *Immunology*. 2021. 164(4):665-76. Doi: 10.1111/imm.13392.
24. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. 2015. 18(5): 422-36. Doi: 10.1089/rej.2014.1656.
25. Bielfeld AP, Pour SJ, Poschmann G, Stühler K, Krüssel JS, Baston-Büst DM. A Proteome Approach Reveals Differences between Fertile Women and Patients with Repeated Implantation Failure on Endometrial Level Does hCG Render the 114ota ct114n114mo f RIF Patients? *Int J Mol Sci*. 2019. 20(2):425. Doi: 10.3390/ijms20020425.
26. Bishop A, Cartwright JE, Whitley GS. Stanniocalcin-1 in the female reproductive system and pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2021. 27(6):1098-14. Doi: 10.1093/humupd/dmab028.

27. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, *et al.* Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021. 19(1):56. Doi: 10.1186/s12915-021-00976-8.
28. Bourdieu A, Calvo E, Rao CV, Akoum A. Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation. *PLoS One.* 2013. 8(5):e64829. Doi:10.1371/journal.pone.0064829.
29. Bui BN, Boretto M, Kobayashi H, van Hoesel M, Steba GS, van Hoogenhuijze N, *et al.* Organoids can be established reliably from cryopreserved biopsy catheter-derived endometrial tissue of infertile women. *Reprod. Biomed. Online.* 2020. 41(3):465–73. Doi: 10.1016/j.rbmo.2020.03.019.
30. Canosa S, Maggiulli R, Cimadomo D, Innocenti F, Fabozzi G, Gennarelli G, *et al.* Cryostorage management of reproductive cells and tissues in ART: status, needs, opportunities and potential new challenges. *Reprod. Biomed. Online.* 2023. 47(3):103252. Doi: 10.1016/j.rbmo.2023.06.007.
31. Chan RWS, Li TQ, Zhang SS, Fang Y, Xu JW. The perivascular niche of endometrial mesenchymal stromal/stem-like cells. *Reprod Dev Med* 2022. 6(4):208–14. Doi: 10.1097/RD9.0000000000000038.
32. Chen HS, Hsu CY, Chang YC, Chuang HY, Long CY, Hsieh TH, Tsai EM. Benzyl butyl phthalate decreases myogenic differentiation of endometrial mesenchymal stem/stromal cells through miR-137-mediated regulation of PITX2. *Sci Rep.* 2017. 7(1):186. Doi: 10.1038/s41598-017-00286-6.
33. Chen J, Liu X, Hu Y, Chen X, Tan S. Cryopreservation of tissues and organs: present, bottlenecks, and future. *Front Vet Sci.* 2023. 10:1201794. Doi: 10.3389/fvets.2023.1201794.
34. Chen Y, Lin D, Shi C, Guo L, Liu L, Chen L, Li T, Liu Y, Zheng C, Chi X, Meng C, Xue Y. MiR-3138 deteriorates the insulin resistance of HUVECs via KSR2/AMPK/GLUT4 signaling pathway. *Cell Cycle.* 2021. 20(4):353-68. doi: 10.1080/15384101.2020.1870335.
35. Chen Y ir Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research.* 2020. 48(D1):D127-31.
36. Cheung VC, Peng CY, Marinić M, Sakabe NJ, Aneas I, Lynch VJ, *et al.* Pluripotent stem cell-derived endometrial stromal fibroblasts in a cyclic, hormone-responsive, coculture model of human decidua. *Cell Rep.* 2021. 35(7):109138. Doi: 10.1016/j.celrep.2021.109138.
37. Cho H, Okada H, Tsuzuki T, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterin-induced heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 is associated with fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril.* 2013. 99(1):248-55. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.056.
38. Chumduri C, Turco MY. Organoids of the female reproductive tract. *J Mol Med (Berl).* 2021. 99(4):531-53. Doi: 10.1007/s00109-020-02028-0.

39. Colón-Díaz M, Báez-Vega P, García M, Ruiz A, Monteiro JB, Fourquet J, *et al.* HDAC1 and HDAC2 are differentially expressed in endometriosis. *Reprod Sci.* 2012. 19(5):483-92. Doi: 10.1177/1933719111432870.
40. Conover CA, Oxvig C. The Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) Story. *Endocr Rev.* 2023. 44(6):1012-28. Doi: 10.1210/edrv/bnad017.
41. Cousins FL, O DF, Gargett CE. Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018. 50:27-38. Doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011.
42. De Sousa KP, Rossi I, Abdullahi M, Ramirez MI, Stratton D, Inal JM. Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2023. 15(1):e1835. Doi: 10.1002/wnan.1835.
43. Del Canto F, Sierralta W, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd, Devoto L. Features of natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist-induced corpus luteum regression and effects of in vivo human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007. 92(11):4436-43. Doi: 10.1210/jc.2007-0125.
44. d'Hauterive SP, Close R, Gridelet V, Mawet M, Nisolle M, Geenen V. Human Chorionic Gonadotropin and Early Embryogenesis: Review. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(3):1380. Doi:10.3390/ijms23031380.
45. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int J Dev Biol.* 2010. 54(2-3):313-22. Doi: 10.1387/ijdb.082772ed.
46. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019. 8(7):727. Doi: 10.3390/cells8070727.
47. Dong J, Wang L, Xing Y, Qian J, He X, Wu J, Zhou J, Hai L, Wang J, Yang H, Huang J, Gou X, Ju Y, Wang X, He Y, Su D, Kong L, Liang B, Wang X. Dynamic peripheral blood microRNA expression landscape during the peri-implantation stage in women with successful pregnancy achieved by single frozen-thawed blastocyst transfer. *Hum Reprod Open.* 2023. 2023(4):hoad034. Doi: 10.1093/hropen/hoad034.
48. Dong X, Weng Z. The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics.* 2013. 5(2):113-6. Doi: 10.2217/epi.13.13.
49. Duan W, Lopez MJ. Effects of enzyme and cryoprotectant concentrations on yield of equine adipose-derived multipotent stromal cells. *Am J Vet Res.* 2018. 79(10), 1100-12. Doi: 10.2460/ajvr.79.10.1100.
50. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009. 27(5):351-7. Doi: 10.1055/s-0029-1237423.
51. Ekanayake DL, Małopolska MM, Schwarz T, Tuz R, Bartlewski PM. The roles and expression of HOXA/Hoxa10 gene: A prospective marker of mammalian female fertility? *Reprod Biol.* 2022. 22(2):100647. Doi: 10.1016/j.repbio.2022.100647.

52. El Cury-Silva T, Nunes MEG, Casalechi M, Comim FV, Rodrigues JK, Reis FM. Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. *Cryobiology*. 2021. 103:7-14. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.08.001.
53. Emera D, Romero R, Wagner G. The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *Bioessays*. 2012. 34(1):26-35. Doi: 10.1002/bies.201100099.
54. Estella C, Herrer I, Atkinson SP, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C. Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion. *PLoS One*. 2012. 7(1):e30508. Doi: 10.1371/journal.pone.0030508.
55. Evans J, Salamonsen LA, Winship A, Menkhorst E, Nie G, Gargett CE, Dimitriadis E. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease. *Prog Rev Endocrinol*. 2016. 12(11):654-67. Doi: 10.1038/nrendo.2016.116.
56. Evans J, Salamonsen LA. Too much of a good thing? Experimental evidence suggests prolonged exposure to hCG is detrimental to endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 2013. 28(6):1610-19. Doi:10.1093/humrep/det055
57. Falk M, Falková I, Kopečná O, Bačíková A, Pagáčová E, Šimek D, *et al*. Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Sci Rep*. 2018. 8(1):14694. Doi:10.1038/s41598-018-32939-5.
58. Fatmou M, Rai A, Poh QH, Salamonsen LA, Greening DW. Endometrial small extracellular vesicles regulate human trophoblastic cell invasion by reprogramming the phosphoproteome landscape. *Front Cell Dev Biol*. 2022. 10:1078096. Doi: 10.3389/fcell.2022.1078096.
59. Fitzgerald HC, Schust DJ, Spencer TE. In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women's health. *Biol Reprod*. 2021. 104(2):282-93. Doi: 10.1093/biolre/iaaa183.
60. Fleming SD, Fazleabas AT, Bell SC. Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 by insulin in the baboon (*Papio anubis*) endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008. 6:6. Doi: 10.1186/1477-7827-6-6.
61. Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P, Zygumnt M. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril*. 2008. 90(4 Suppl):1390-5. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.023.
62. Fogle RH, Li A, Paulson RJ. Modulation of HOXA10 and other markers of endometrial receptivity by age and human chorionic gonadotropin in an endometrial explant model. *Fertil Steril*. 2010. 93(4):1255-9. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.11.002.
63. Fox JM, Wiggins RC, Moore JWJ, Brewer C, Hunter B, Andrew AC, Martin F. Methodology for reliable and reproducible cryopreservation of human cervical tissue. *Cryobiology*. 2017. 77:14-8. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.06.004.

64. Freis A, Germeyer A, Jauckus J, Capp E, Strowitzki T, Zorn M, Machado Weber A. Endometrial expression of receptivity markers subject to ovulation induction agents. *Arch Gynecol Obstet*. 2019. 300(6):1741-50. Doi: 10.1007/s00404-019-05346-y.
65. Friedman JR, Dibenedetto JR, West M, Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol Biol Cell*. 2013. 24(7):1030-40. Doi:10.1091/mbc.E12-10-0733.
66. Fu X, Li Y, Zhang Z, Wang B, Wei R, Chu C, *et al*. Emerging role of miRNAs, lncRNAs, and circRNAs in pregnancy-associated diseases. *Chin Med J (Engl)*. 2023. 136(11):1300-10. Doi: 10.1097/CM9.0000000000002595.
67. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, *et al*. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. 114(40):E8468-77. Doi: 10.1073/pnas.1706546114.
68. Gastal GDA, Aguiar FLN, Alves BG, Alves KA, de Tarso SGS, Ishak GM, *et al*. Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. *Theriogenology*. 2017. 97:139-47. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.029.
69. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol*. 2003. 178:357-72.
70. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014. 35(6):851-905. Doi: 10.1210/er.2014-1045.
71. Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Fardiyazar Z, Pashaei-Asl F, Rahmati-Yamchi M, Khodadadi K, Pashaiasl M. Human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) expressing p21 and cyclin D1 genes retain excellent viability after freezing with (dimethyl sulfoxide) DMSO. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019. 19(1):43-51. Doi: 10.17305/bjbms.2018.2912.
72. Goharitaban S, Abedelahi A, Hamdi K, Khazaei M, Esmacilivand M, Niknafs B. Role of endometrial microRNAs in repeated implantation failure (mini-review). *Front Cell Dev Biol*. 2022. 10:936173. Doi: 10.3389/fcell.2022.936173.
73. Gook DA, Edgar DH. Cryopreservation of female reproductive potential. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019. 55:23-36. Doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.08.005.
74. Gridelet V, Perrier d'Hauterive S, Polese B, Foidart JM, Nisolle M, Geenen V. Human Chorionic Gonadotrophin: New Pleiotropic Functions for an „Old“ Hormone During Pregnancy. *Front Immunol*. 2020. 11:343. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00343.
75. Grimaldi G, Christian M, Steel JH, Henriët P, Poutanen M, Brosens JJ. Down-regulation of the histone methyltransferase EZH2 contributes to the epigenetic programming of decidualizing human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol*. 2011. 25:1892. Doi: 10.1210/ME.2011-1139.

76. Gu Y, Li T, Ding Y, Sun L, Tu T, Zhu W, *et al.* Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. *Mol Med Rep.* 2016. 13(6): 5207-15. Doi: 10.3892/mmr.2016.5169.
77. Gujral P, Mahajan V, Lissaman AC, Ponnampalam AP. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020. 18(1):84. Doi: 10.1186/s12958-020-00637-5.
78. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016. 14(1):143. Doi: 10.1186/s12967-016-0893-x.
79. Gunther V, Allahqoli L, Deenadayal-Mettler A, *et al.* Molecular Determinants of Uterine Receptivity: Comparison of Successful Implantation, Recurrent Miscarriage, and Recurrent Implantation Failure. *Int J Mol Sci.* 2023. 24(24):17616. Doi:10.3390/ijms242417616.
80. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021. 19(1):47. Doi:10.1186/s12964-021-00730-1.
81. Hajipour H, Farzadi L, Roshangar L, Latifi Z, Kahroba H, Shahnazi V, *et al.* A human chorionic gonadotropin (hCG) delivery platform using engineered uterine exosomes to improve endometrial receptivity. *Life Sci.* 2021. 275:119351. Doi: 10.1016/j.lfs.2021.119351.
82. Halari CD, Renaud SJ, Lala PK. Molecular mechanisms in IL-1 β -mediated decorin production by decidual cells. *Mol Hum Reprod.* 2021. 27(12):gaab068. Doi: 10.1093/molehr/gaab068.
83. Hart AR, Khan NLA, Dissanayake K, Godakumara K, Andronowska A, Eapen S, *et al.* The Extracellular Vesicles Proteome of Endometrial Cells Simulating the Receptive Menstrual Phase Differs from That of Endometrial Cells Simulating the Non-Receptive Menstrual Phase. *Biomolecules.* 2023. 13(2):279. Doi: 10.3390/biom13020279.
84. Hart AR, Khan NLA, Godakumara K, Dissanayake K, Piibor J, Muhandiram S, *et al.* The role of extracellular vesicles in endometrial receptivity and their potential in reproductive therapeutics and diagnosis. *Reprod Biol.* 2022. 22(2):100645. Doi: 10.1016/j.repbio.2022.100645.
85. He A, Powell S, Kyle M, Rose M, Masmila E, Estrada V, *et al.* Cryopreservation of Viable Human Tissues: Renewable Resource for Viable Tissue, Cell Lines, and Organoid Development. *Biopreserv Biobank.* 2020. 18(3):222–7. Doi: 10.1089/bio.2019.0062.
86. He F, Li L, Fan R, Wang X, Chen X, Xu Y. Extracellular Vesicles: An Emerging Regenerative Treatment for Oral Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021. 9:669011. Doi: 10.3389/fcell.2021.669011.
87. Heidari-Khoei H, Esfandiari F, Moini A, Yari S, Saber M, Ghaffari Novin, *et al.* Derivation of hormone-responsive human endometrial organoids and stromal cells from cryopreserved biopsies. *Exp. Cell Res.* 2022. 417(1):113205. Doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113205.
88. Heusermann W, Hean J, Trojer D, Steib E, von Bueren S, Graff-Meyer A, Genoud C, *et al.* Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots,

- traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol.* 2016. 213(2):173-84. doi: 10.1083/jcb.201506084.
89. Hirata R, Hojo T, Sano M, Hayashi N, Okuda K. Potential role of hCG in apoptosis of human luteinized granulosa cells. *J Reprod Dev.* 2015. 61(1):67-73. Doi: 10.1262/jrd.2014-115.
 90. Hivert MF, White F, Allard C, James K, Majid S, Aguet F, Ardlie KG, Florez JC, Edlow AG, Bouchard L, Jacques PÉ, Karumanchi SA, Powe CE. Placental IGFBP1 levels during early pregnancy and the risk of insulin resistance and gestational diabetes. *Pric Med.* 2024. 30(6):1689-95. Doi: 10.1038/s41591-024-02936-5. Epub 2024 Apr 16. PMID: 38627562; PMCID: PMC11186792.
 91. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer.* 2018. 18(1):47. Doi:10.1186/s12885-017-3958-1.
 92. Hou W, Shi G, Cai B, Ding C, Song J, Zhang X, Xu Y. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before fresh embryo 120ota ct120n120m IVF and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2018. 298(6):1061-69. Doi:10.1007/s00404-018-4923-1.
 93. Houshdaran S, Oke AB, Fung JC, Vo KC, Nezhat C, Giudice LC. Steroid hormones regulate genome-wide epigenetic programming and gene transcription in human endometrial cells with marked aberrancies in endometriosis. *PloS Genet.* 2020. 16(6):e1008601. Doi: 10.1371/journal.pgen.1008601.
 94. Hromadnikova I, Kotlabova K, Krofta L. First-Trimester Screening for Miscarriage or Stillbirth-Prediction Model Based on MicroRNA Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2023. 24(12):10137. Doi: 10.3390/ijms241210137.
 95. Hu Y, Rao SS, Wang ZX, Cao J, Tan YJ, Luo J, *et al.* Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics.* 2018. 8(1):169-84. Doi: 10.7150/thno.21234.
 96. Hughes SM, Ferre AL, Yandura SE, Shetler C, Baker CAR, *et al.* Cryopreservation of human mucosal tissues. *PloS one.* 2018. 13(7):e0200653. Doi: 10.1371/journal.pone.0200653.
 97. Huyen DV, Bany BM. Evidence for a conserved function of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 (Hand2) in mouse and human decidualization. *Reproduction.* 2011. 142:353–68.
 98. Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, *et al.* DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod.* 2009. 24(5):1126-32. Doi: 10.1093/humrep/dep015.
 99. Yang J, Wang L, Ma J, Diao L, Chen J, Cheng Y, Yang J, Li L. Endometrial proteomic profile of patients with repeated implantation failure. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023. 14:1144393. Doi: 10.3389/fendo.2023.1144393.
 100. Idelevich A, Vilella F. Mother and Embryo Cross-Communication. *Genes (Basel).* 2020. 11(4):376. Doi:10.3390/genes11040376.

101. Inoue F, Sone K, Toyohara Y, Takahashi Y, Kukita A, Hara A, *et al.* Targeting Epigenetic Regulators for Endometrial Cancer Therapy: Its Molecular Biology and Potential Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2021. 22(5):2305. Doi: 10.3390/ijms22052305.
102. Yuhao Chen ir Xiaowei Wang. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research.* 2020. 48(D1):D127-D131.
103. Jahanbakhsh J, Farid Mojtahedi M, Moradi N, Fadaei R, Tehranian A, Rostami R, *et al.* Circulating and Endometrial Profiles of miR-145, miR-155-5p, miR-224, MPP-5, and PECAM-1 Expression in Patients with Repeated Implantation Failure: A Case Control Study. *Cell J.* 2023. 25(6):427-36. Doi: 10.22074/cellj.2023.1988609.1218.
104. Jahanshahi M, Aleyasin A, Aghahosseini M, Najafian A, Shabani Nashtaei M, Hosseinimousa S. The effect of intrauterine hCG injection before embryo 121ota ct121n121m pregnancy rate in frozen embryo transfer cycles. *Ann Med Surg (Lond).* 2022. 79:104091. Doi:10.1016/j.amsu.2022.104091.
105. Jain V, Chodankar RR, Maybin JA, Critchley HOD. Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health. *Prie Rev Endocrinol.* 2022. 18(5):290-308. Doi: 10.1038/s41574-021-00629-4.
106. Jairajpuri DS, Malalla ZH, Mahmood N, Khan F, Almawi WY. Differentially expressed circulating microRNAs associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Gene.* 2021. 768:145334. Doi: 10.1016/j.gene.2020.145334.
107. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, *et al.* Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017. 6(1):12-8. Doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001.
108. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(4):299-311. Doi: 10.1038/cmi.2017.107.
109. Jin J, Ren P, Li X, Zhang Y, Yang W, Ma Y, *et al.* Ovulatory signal-triggered chromatin remodeling in ovarian granulosa cells by HDAC2 phosphorylation activation-mediated histone deacetylation. *Epigenetics Chromatin.* 2023. 16(1):11. Doi: 10.1186/s13072-023-00485-8.
110. Jin M, Ji J, Chen X, Zhou Y, Wang D, Liu A. The emerging role of TET enzymes in the immune microenvironment at the maternal-fetal interface during decidualization and early pregnancy. *Front Immunol.* 2023. 13:1066599. Doi: 10.3389/fimmu.2022.1066599.
111. Jing X, Yang J, Jiang L, Chen J, Wang H. MicroRNA-29b Regulates the Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathway by Targeting Bax in Doxorubicin Cardiotoxicity. *Cell Physiol Biochem.* 2018. 48(2):692-704. Doi: 10.1159/000491896.
112. Joshi AD. New Insights Into Physiological and Pathophysiological Functions of Stanniocalcin 2. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020. 11:172. Doi: 10.3389/fendo.2020.00172.

113. Joshi K, Liu S, Breslin S J P, Zhang J. Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2022. 79(7):363. Doi: 10.1007/s00018-022-04396-x.
114. Jozaki K, Tamura I, Takagi H, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, *et al*. Glucose regulates the histone acetylation of gene promoters in decidualizing stromal cells. *Reproduction*. 2019. 157:457–64. Doi: 10.1530/REP-18-0393.
115. Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, *et al*. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci*. 2014. 21(3):372-80. Doi: 10.1177/1933719113497280.
116. Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. *Placenta*. 2011. 32(8):592-7. Doi: 10.1016/j.placenta.2011.05.002.
117. Kang YJ, Jeung IC, Park A, Park YJ, Jung H, Kim TD, *et al*. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal 122ota ct122 patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum Reprod*. 2014. 29(10):2176-89. Doi: 10.1093/humrep/deu172.
118. Kang YJ, Lees M, Matthews LC, Kimber SJ, Forbes K, Aplin JD. MiR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R. *J Cell Sci*. 2015. 128(4):804-14. Doi: 10.1242/jcs.164004.
119. Kasahara K, Takakura K, Takebayashi K, Kimura F, Nakanishi K, Noda Y. The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001. 86(3):1281-6. Doi: 10.1210/jcem.86.3.7281.
120. Katagiri Y, Jwa SC, Kuwahara A, Iwasa T, Ono M, Kato K, *et al*. Assisted reproductive technology in Japan: A summary report for 2020 by the ethics Committee of the Japan Society of obstetrics and gynecology. *Reprod Med Biol*. 2023. 22(1):e12494. Doi: 10.1002/rmb2.12494.
121. Katoh N, Kuroda K, Tomikawa J, Ogata-Kawata H, Ozaki R, Ochiai A, *et al*. Reciprocal changes of H3K27ac and H3K27me3 at the promoter regions of the critical genes for endometrial decidualization. *Epigenomics*. 2018. 10:1243–57. doi: 10.2217/EPI-2018-0006.
122. Kaufmann P, Bergmann A, Melander O. Novel insights into peptide amidation and amidating activity in the human circulation. *Sci Rep*. 2021. 11(1):15791. Doi: 10.1038/s41598-021-95305-y.
123. Kelleher AM, DeMayo FJ, Spencer TE. Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocr Rev*. 2019. 40(5):1424-45. Doi: 10.1210/er.2018-00281.
124. Koch Y, Wimberger P, Grümmer R. Human chorionic gonadotropin induces decidualization of ectopic human endometrium more effectively than forskolin in an in-vivo endometriosis model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018. 243(11):953-62. Doi: 10.1177/1535370218782658.

125. Kolahdouz-Mohammadi R, Shidfar F, Khodaverdi S, Arablou T, Heidari S, Rashidi N, Delbandi AA. Resveratrol treatment reduces expression of MCP-1, IL-6, IL-8 and RANTES in endometriotic stromal cells. *J Cell Mol Med*. 2021. 25(2):1116-27. Doi: 10.1111/jcmm.16178.
126. Kolanska K, Bendifallah S, Canlorbe G, Mekinian A, Touboul C, Aractingi S, *et al*. Role of miRNAs in Normal Endometrium and in Endometrial Disorders: Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2021. 10(16):3457. Doi: 10.3390/jcm10163457.
127. Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM, Alfer J. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum Reprod*. 2007. 22(11):2956-66. Doi: 10.1093/humrep/dem241.
128. Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, Memon Z, Ahmed N, Hasnain SN. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag Res*. 2018. 10:403-16. Doi: 10.2147/CMAR.S154608.
129. Kwon MJ, Kim JH, Kim KJ, Ko EJ, Lee JY, Ryu CS, *et al*. Genetic Association between Inflammatory-Related Polymorphism in STAT3, IL-1 β , IL-6, TNF- α and Idiopathic Recurrent Implantation Failure. *Genes (Basel)*. 2023. 14(8):1588. Doi: 10.3390/genes14081588.
130. Lee D, Lee YG, Won J, Hong SH, Kim JH, Kang YJ. Effects of intrauterine human chorionic gonadotropin administration on endometrial receptivity and embryo implantation. *Life Sci*. 2022. 311(Pt A):121154. Doi:10.1016/j.lfs.2022.121154.
131. Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, *et al*. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology*. 2013. 154(1):458-70. Doi: 10.1210/en.2012-1610.
132. Li M, Feng C, Gu X, He Q, Wei F. Effect of cryopreservation on proliferation and differentiation of periodontal ligament stem cell sheets. *Stem Cell Res Ther*. 2017. 8(1):77. Doi: 10.1186/s13287-017-0530-5.
133. Li Q, Kannan A, Das A, Demayo FJ, Hornsby PJ, Young SL, Taylor RN, Bagchi MK, Bagchi IC. WNT4 acts downstream of BMP2 and functions via β -catenin signaling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology*. 2013. 154(1):446-57. Doi: 10.1210/en.2012-1585.
134. Li R, Wang TY, Shelp-Peck E, Wu SP, DeMayo FJ. The single-cell 123ota ct123 cultured human endometrial stromal cells. *F S Sci*. 2022. 3(4):349-66. Doi: 10.1016/j.xfss.2022.09.001.
135. Li S, Fu X, Wu T, Yang L, Hu C, Wu R. Role of Interleukin-6 and Its Receptor in Endometriosis. *Med Sci Monit*. 2017. 23:3801-7. Doi: 10.12659/msm.905226.
136. Liao W, Deng X, Chen G, Yang J, Li Y, Li L, Zhong L, Tao G, Hou J, Li M, Ding C. MiR-150-5p contributes to unexplained recurrent spontaneous abortion by targeting VEGFA and downregulating the PI3K/AKT/mTOR signaling

- pathway. *J Assist Reprod Genet.* 2024. 41(1):63-77. Doi: 10.1007/s10815-023-02959-w.
137. Liu A, Jin M, Xie L, Jing M, Zhou Y, Tang M, *et al.* Loss of miR-29a impairs decidualization of endometrial stromal cells by TET3 mediated demethylation of *Coll1A1* promoter. *iScience.* 2021. 24(9):103065. Doi: 10.1016/j.isci.2021.103065.
 138. Liu H, Huang X, Mor G, Liao A. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cell Mol Life Sci.* 2020. 77(11):2091-101. Doi: 10.1007/s00018-019-03395-9.
 139. Liu YJ, Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Commun Signal.* 2023. 21(1):77. Doi: 10.1186/s12964-023-01103-6.
 140. Logan PC, Ponnampalam AP, Steiner M, Mitchell MD. Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2013. 19(5):302-12. Doi: 10.1093/molehr/gas062.
 141. Loke H, Rainczuk K, Dimitriadis E. MicroRNA Biogenesis Machinery Is Dysregulated in the 124ota ct124n124mo f Infertile Women Suggesting a Role in Receptivity and Infertility. *J Histochem Cytochem.* 2019. 67(8):589-99. Doi: 10.1369/0022155419854064.
 142. Lu H, Cassis LA, Kooi CW, Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens Res.* 2016. 39(7):492-500. Doi: 10.1038/hr.2016.17.
 143. Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014. 306(2):R91-101. Doi: 10.1152/ajpregu.00034.2013.
 144. Ma Q, Beal JR, Bhurke A, Kannan A, Yu J, Taylor RN, *et al.* Extracellular vesicles secreted by human uterine stromal cells regulate decidualization, angiogenesis, and trophoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022. 119(38):e2200252119. Doi: 10.1073/pnas.2200252119.
 145. Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, *et al.* Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res.* 2016. 9:15. Doi: 10.1186/s13048-016-0225-z.
 146. Maekawa R, Tamura I, Shinagawa M, Mihara Y, Sato S, Okada M, *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells. *BMC Genomics.* 2019. 20:324. Doi: 10.1186/s12864-019-5695-0.
 147. Mahajan V, Osavlyuk D, Logan PC, Amirapu S, Ponnampalam AP. Expression and steroid hormone regulation of TETs and DNMTs in human endometrium. *Reproduction.* 2020. 160(2):247-57. Doi: 10.1530/REP-19-0562.
 148. Mak IY, Brosens JJ, Christian M, Hills FA, Chamley L, Regan L, White JO. Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in

- vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002. 87(6):2581-8. Doi: 10.1210/jcem.87.6.8576.
149. Makrigiannakis A, Vrekoussis T, Zoumakis E, Kalantaridou SN, Jeschke U. The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *Int J Mol Sci.* 2017. 18(6):1305. Doi: 10.3390/ijms18061305.
 150. Mann ON, Kong CS, Lucas ES, Brosens JJ, Hanyaloglu AC, Brighton PJ. Expression and function of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor in human endometrial stromal cells. *Sci Rep.* 2022. 12(1):8624. Doi: 10.1038/s41598-022-12495-9.
 151. Mann ON, Kong CS, Lucas ES, Brosens JJ, Hanyaloglu AC, Brighton PJ. Expression and function of the luteinizing hormone choriogonadotropin receptor in human endometrial stromal cells. *Sci Rep.* 2022. 12(1):8624. Doi:10.1038/s41598-022-12495-9.
 152. Mansouri-Kivaj N, Nazari A, Esfandiari F, Shekari F, Ghaffari M, Pakzad M, Baharvand H. Homogenous subpopulation of human mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles restore function of endometrium in an experimental rat model of Asherman syndrome. *Stem Cell Res Ther.* 2023. 14(1):61. Doi: 10.1186/s13287-023-03279-7.
 153. Marakhova I, Domnina A, Shatrova A, Borodkina A, Burova E, Pugovkina N, *et al.* Proliferation-related changes in K⁺ content in human mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2019. 9(1):346. Doi: 10.1038/s41598-018-36922-y.
 154. Matsumoto H, Sakai K, Iwashita M. Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via alpha5beta1 integrin. *Mol Hum Reprod.* 2008. 14(8):485-9. Doi: 10.1093/molehr/gan038.
 155. Mesa AM, Rosenfeld CS, Tuteja G, Medrano TI, Cooke PS. The Roles of the Histone Protein Modifier EZH2 in the Uterus and Placenta. *Epigenomes.* 2020. 4(3):20. Doi: 10.3390/epigenomes4030020.
 156. Michalski SA, Chadchan SB, Jungheim ES, Kommagani R. Isolation of Human Endometrial Stromal Cells for In Vitro Decidualization. *J Vis Exp.* 2018. 139:57684. Doi: 10.3791/57684.
 157. Miyamoto T, Furusawa C, Kaneko K. Pluripotency, Differentiation, and Reprogramming: A Gene Expression Dynamics Model with Epigenetic Feedback Regulation. *PLoS Comput Biol.* 2015. 11(8):e1004476. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1004476.
 158. Mol BW, Tjon-Kon-Fat R, Kamphuis E, van Wely M. Unexplained infertility: Is it over-diagnosed and over-treated? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018. 53:20-9. Doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.09.006.
 159. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013. 38(1):23-38. Doi: 10.1038/npp.2012.112.
 160. Mori M, Bogdan A, Balassa T, Csabai T, Szekeres-Bartho J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol.* 2016. 38(6):635-49. Doi:10.1007/s00281-016-0574-0.
 161. Mortlock S, Restuadi R, Levien R, Girling JE, Holdsworth-Carson SJ, Healey M, *et al.* Genetic regulation of methylation in human endometrium and blood

- and gene targets for reproductive diseases. *Clin Epigenetics*. 2019. 11(1):49. Doi: 10.1186/s13148-019-0648-7.
162. Mumusoglu S, Polat M, Ozbek IY, Bozdog G, Papanikolaou EG, Esteves SC, *et al*. Preparation of the Endometrium for Frozen Embryo Transfer: A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. 12:688237. Doi:10.3389/fendo.2021.688237.
 163. Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2010. 16(5):297-310. Doi: 10.1093/molehr/gaq010.
 164. Murata H, Tanaka S, Tsuzuki-Nakao T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, *et al*. The transcription factor HAND2 up-regulates transcription of the IL15 gene in human endometrial stromal cells. *J. Biol. Chem*. 2020. 295:9596–605. Doi: 10.1074/jbc.RA120.012753.
 165. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *Int J Mol Sci*. 2020. 21(11):4092. Doi: 10.3390/ijms21114092.
 166. Nikolov A, Popovski N. Role of Gelatinases MMP-2 and MMP-9 in Healthy and Complicated Pregnancy and Their Future Potential as Preeclampsia Biomarkers. *Diagnostics (Basel)*. 2021. 11(3):480. Doi: 10.3390/diagnostics11030480.
 167. Nothnick WB. MicroRNAs and Progesterone Receptor Signaling in Endometriosis Pathophysiology. *Cells*. 2022. 11(7):1096. Doi: 10.3390/cells11071096.
 168. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. 9:402. Doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
 169. Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. *Int J Mol Sci*. 2020. 21(6):1973. Doi: 10.3390/ijms21061973.
 170. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol*. 2018. 17(3):220-7. Doi: 10.1002/rmb2.12088.
 171. Ombelet W, Martens G, Bruckers L. Pregnant after assisted reproduction: a risk pregnancy is born! 18-years perinatal outcome results from a population-based registry in Flanders, Belgium. *Facts Views Vis Obgyn*. 2016. 8(4):193-204.
 172. Orvik AB, Andersen MR, Pedersen L, Ritz C, Stender S, Szecsi PB. Plasma fibulin-1 levels during pregnancy and delivery: a longitudinal observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2021. 21(1):629. Doi: 10.1186/s12884-021-04110-y.
 173. Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. *Hum Reprod Update*. 2019. 25(1):114-33. Doi: 10.1093/humupd/dmy035.
 174. Pan D, Du Y, Li R, Shen A, Liu X, Li C, Hu B. miR-29b-3p Increases Radiosensitivity in Stemness Cancer Cells via Modulating Oncogenes Axis. *Front Cell Dev Biol*. 2021. 9:741074. Doi: 10.3389/fcell.2021.741074.

175. Pantier R, Tatar T, Colby D, Chambers I. Endogenous epitope-tagging of Tet1, Tet2 and Tet3 identifies TET2 as a naïve pluripotency marker. *Life Sci Alliance*. 2019. 2(5):e201900516. Doi: 10.26508/lsa.201900516.
176. Park BW, Jang SJ, Byun JH, Kang YH, Choi MJ, Park WU, Lee WJ, Rho GJ. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017. 11(2):489-500. Doi: 10.1002/term.1945.
177. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhning HJ, Evangelista M, *et al*. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008. 26(2):300-11. Doi:10.1634/stemcells.2007-0594.
178. Parveen N, Dhawan S. DNA Methylation Patterning and the Regulation of Beta Cell Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. 12:651258. Doi: 10.3389/fendo.2021.651258.
179. Pasaulinė sveikatos organizacija. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. 2023. Ženeva. Prieiga per internetą: <https://www.who.int/publications/i/item/978920068315>.
180. Pasquariello R, Pennarossa G, Arcuri S, Fernandez-Fuertes B, Lonergan P, Brevini TAL, Gandolfi F. Sperm fertilizing ability in vitro influences bovine blastocyst miRNA content. *Theriogenology*. 2024. 222:1-9. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.03.016.
181. Pathare ADS, Hinduja I. Aberrant DNA methylation profiling affecting the endometrial receptivity in recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 2020. 83(1):e13196. Doi: 10.1111/aji.13196.
182. Patronia MM, Potiris A, Mavrogianni D, Drakaki E, Karampitsakos T, Machairoudias P, Topis S, Zikopoulos A, Vrachnis D, Moustakli E, Skentou C, Domali E, Vrachnis N, Drakakis P, Stavros S. The Expression of microRNAs and Their Involvement in Recurrent Pregnancy Loss. *J Clin Med*. 2024. 13(12):3361. Doi: 10.3390/jcm13123361.
183. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016. 1:15004. Doi: 10.1038/sigtrans.2015.4.
184. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014. 9(1):3-12. Doi: 10.4161/epi.27473.
185. Pitzer LM, Moroney MR, Nokoff NJ, Sikora MJ. WNT4 Balances Development vs Disease in Gynecologic Tissues and Women's Health. *Endocrinology*. 2021. 162(7):bqab093. Doi: 10.1210/endo/bqab093.
186. Polese B, Gridelet V, Araklioti E, Martens H, Perrier d'Hauterive S, Geenen V. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014. 5:106. Doi: 10.3389/fendo.2014.00106.
187. Prakash K, Fournier D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems*. 2018. 164:49-59. Doi: 10.1016/j.biosystems.2017.11.005.

188. Qian K, Hu L, Chen H, Li H, Liu N, Li Y, *et al.* Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology*. 2009. 150(10):4734-43. Doi: 10.1210/en.2008-1629.
189. Qu P, Shao ZA, Wang B, He JP, Zhang YN, Wei WJ, Hua JR, Zhou H, Lu D, Ding N, Wang JF. MiR-663a Inhibits Radiation-Induced Epithelium-to-Mesenchymal Transition by Targeting TGF- β 1. *Biomed Environ Sci*. 2022. 35(5):437-47. Doi: 10.3967/bes2022.059.
190. Queckbörner S, Syk Lundberg E, Gemzell-Danielsson K, Davies LC. Endometrial stromal cells exhibit a distinct phenotypic and immunomodulatory profile. *Stem Cell Res Ther*. 2020. 11(1):15. Doi: 10.1186/s13287-019-1496-2.
191. Reed BG, Carr BR. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. *Endotext* [Internet]. 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>.
192. Retis-Resendiz AM, Gonz'alez-García IN, Le'on-Ju'arez M, Camacho-Arroyo I, Cerb'on M, V'azquez-Martínez ER. The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clin. Epigenetics*. 2021. 13:116. Doi:10.1186/s13148-021-01103-8.
193. Riboldi M, Nazir I, Jara B, Argandoña F, Valencia C, Serafini PC, *et al.* Human endometrial stromal cells inhibit the pro-angiogenic stimulus of hCG in vitro. *Reproduction*. 2020. 160(5):673-84. Doi: 10.1530/REP-19-0559.
194. Rytönen KT, Erkenbrack EM, Poutanen M, Elo LL, Pavlicev M, Wagner GP. Decidualization of human endometrial stromal fibroblast is a multiphasic process involving distinct transcriptional programs. *Reprod. Sci*. 2019. 26:323–36.
195. Rytönen KT, Erkenbrack EM, Poutanen M, Elo LL, Pavlicev M, Wagner GP. Decidualization of Human Endometrial Stromal Fibroblasts is a Multiphasic Process Involving Distinct Transcriptional Programs. *Reprod Sci*. 2019. 26(3):323-36. Doi: 10.1177/1933719118802056.
196. Roca FJ, Loomans HA, Wittman AT, Creighton CJ, Hawkins SM. Ten-Eleven Translocation Genes are Downregulated in Endometriosis. *Curr Mol Med*. 2016. 16(3):288-98. Doi: 10.2174/1566524016666160225153844.
197. Ruiz-Magaña MJ, Llorca T, Martínez-Aguilar R, Abadía-Molina AC, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG. Stromal cells of the endometrium and decidua: in search of a name and an identity†. *Biol Reprod*. 2022. 107(5):1166-76. Doi: 10.1093/biolre/iaoc158.
198. Saare M, Modhukur V, Suhorutshenko M, Rajashekar B, Rekker K, Sõritsa D, *et al.* The influence of menstrual cycle and endometriosis on endometrial methylome. *Clin Epigenetics*. 2016. 8:2. Doi: 10.1186/s13148-015-0168-z.
199. Saare M, Rekker K, Laisk-Podar T, Rahmioglu N, Zondervan K, Salumets A, *et al.* Challenges in endometriosis miRNA studies – From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017. 1863(9):2282-92. Doi: 10.1016/j.bbadis.2017.06.018.
200. Sacchi S, Sena P, Degli Esposti C, Lui J, La Marca A. Evidence for expression and functionality of FSH and LH/hCG receptors in human endometrium. *J Assist Reprod Genet*. 2018. 35(9):1703-12. Doi: 10.1007/s10815-018-1248-8.

201. Sadeghi MR. Unexplained infertility, the controversial matter in management of infertile couples. *J Reprod Infertil*. 2015. 16(1):1-2.
202. Sahar N, Mujihartini N, Pudjianto DA, Pradhita AD, Thuffi R, Kusmardi K. Increased Progesterone on the Day of Administration of hCG in Controlled Ovarian Hyperstimulation Affects the Expression of HOXA10 in Primates' Endometrial Receptivity. *Biomedicines*. 2019. 7(4):83. Doi: 10.3390/biomedicines7040083.
203. Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, *et al*. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Biol. Chem*. 2003. 278:16675–82. Doi:10.1074/jbc.M211715200_
204. Salker MS, Nautiyal J, Steel JH, Webster Z, Sućurović S, Nicou M, *et al*. Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolongs uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. *PloS One*. 2012. 7(12):e52252. Doi: 10.1371/journal.pone.0052252.
205. Schug S, Baunacke A, Goeckenjan M, Horn LC, Pretzsch G, Zimmermann G, Alexander H. Endometrial human chorionic gonadotropin (hCG) expression is a marker for adequate secretory transformation of the endometrium. *Arch Gynecol Obstet*. 2019. 299(6):1727-36. Doi: 10.1007/s00404-019-05130-y.
206. Segura-Benítez M, Bas-Rivas A, Juárez-Barber E, Carbajo-García MC, Faus A, De Los Santos MJ, Pellicer A, Ferrero H. Human blastocysts uptake extracellular vesicles secreted by endometrial cells containing miRNAs related to implantation. *Hum Reprod*. 2023 Aug 1;38(8):1547-1559. Doi: 10.1093/humrep/dead138.
207. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007. 76:75-100. Doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114.
208. Shayevitch R, Askayo D, Keydar I, Ast G. The importance of DNA methylation of exons on alternative splicing. *RNA*. 2018. 24(10):1351-62. Doi: 10.1261/rna.064865.117.
209. Shen L, Zeng H, Fu Y, Ma W, Guo X, Luo G, Hua R, Wang X, Shi X, Wu B, Luo C, Quan S. Specific plasma microRNA profiles could be potential non-invasive biomarkers for biochemical pregnancy loss following embryo transfer. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2024. 24(1):351. Doi: 10.1186/s12884-024-06488-x.
210. Shiotani M, Matsumoto Y, Okamoto E, Yamada S, Mizusawa Y, Furuhashi K, *et al*. Is human chorionic gonadotropin supplementation beneficial for frozen and thawed embryo transfer in estrogen/progesterone replacement cycles?: A randomized clinical trial. *Reprod Med Biol*. 2017. 16(2):166-9. Doi:10.1002/rmb2.12023.
211. Shivakumar SB, Bharti D, Jang SJ, Hwang SC, Park JK, Shin JK, *et al*. Cryopreservation of Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells Following Controlled Rate Freezing Protocol Using Different Cryoprotectants; A Comparative Study. *Int J Stem Cells*. 2015. 8(2):155-69. Doi: 10.15283/ijsc.2015.8.2.155.

212. Silasi M, You Y, Simpson S, Kaislasuo J, Pal L, Guller S, *et al.* Human Chorionic Gonadotropin modulates CXCL10 Expression through Histone Methylation in human decidua. *Sci Rep.* 2020. 10(1):5785. Doi: 10.1038/s41598-020-62593-9.
213. Soares MJ, Varberg KM, Iqbal K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. *Biol Reprod.* 2018. 99(1):196-211. Doi: 10.1093/biolre/iy049.
214. Song YT, Liu PC, Tan J, Zou CY, Li QJ, Li-Ling J, Xie HQ. Stem cell-based therapy for ameliorating intrauterine adhesion and endometrium injury. *Stem Cell Res Ther.* 2021. 12(1):556. Doi: 10.1186/s13287-021-02620-2.
215. Sparovec GT, Markert UR, Reif P, Schoell W, Moser G, Feichtinger J, *et al.* The fate of human SUSD2+ endometrial mesenchymal stem cells during decidualization. *Stem Cell Res.* 2022. 60:102671. Doi: 10.1016/j.scr.2022.102671.
216. Srivastava A, Sengupta J, Kriplani A, Roy KK, Ghosh D. Profiles of cytokines secreted by isolated human endometrial cells under the influence of chorionic gonadotropin during the window of embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013. 11:116. Doi: 10.1186/1477-7827-11-116.
217. Stahl PD, Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2019. 34(3):169-77. Doi: 10.1152/physiol.00045.2018.
218. Strug MR, Su R, Young JE, Dodds WG, Shavell VI, Díaz-Gimeno P, *et al.* Intrauterine human chorionic gonadotropin infusion in oocyte donors promotes endometrial synchrony and induction of early decidual markers for stromal survival: a randomized clinical trial. *Hum Reprod.* 2016. 31(7):1552-61. Doi: 10.1093/humrep/dew080. Epub 2016 Apr 26.
219. Sucurovic S, Nikolic T, Brosens JJ, Mulac-Jericevic B. Analysis of heart and neural crest derivatives-expressed protein 2 (HAND2)-progesterone interactions in peri-implantation endometrium†. *Biol Reprod.* 2020. 102(5):1111-21. Doi: 10.1093/biolre/iaaa013.
220. Sugimoto Y, Yamazaki Y, Moriyama K, Sugimoto T, Kumazawa K, Baba K, *et al.* Differentiation, and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation — Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. *Regen Ther.* 2021. 18:363-71. Doi: 10.1016/j.reth.2020.01.006.
221. Sui C, Liao Z, Bai J, Hu D, Yue J, Yang S. Current knowledge on the role of extracellular vesicles in endometrial receptivity. *Eur J Med Res.* 2023. 28(1):471. Doi: 10.1186/s40001-023-01459-y.
222. Sun C, Groom KM, Oyston C, Chamley LW, Clark AR, James JL. The placenta in fetal growth restriction: What is going wrong?. *Placenta.* 2020. 96:10-8. Doi:10.1016/j.placenta.2020.05.003.
223. Sun Y, Luo DY, Zhu YC, Zhou L, Yang TX, Tang C, Shen H, Wang KJ. MiR-3180-5p promotes proliferation in human bladder smooth muscle cell by

- targeting PODN under hydrodynamic pressure. *Sci Rep.* 2016. 6:33042. Doi: 10.1038/srep33042.
224. Szamatowicz M, Szamatowicz J. Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Adv Med Sci.* 2020. 65(1):93-96. Doi: 10.1016/j.advms.2019.12.008.
 225. Tabeeva G, Silachev D, Vishnyakova P, Asaturova A, Fatkhudinov T, Smetnik A, Dumanovskaya M. The Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Endometrial Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2023. 24(11):9431. Doi: 10.3390/ijms24119431.
 226. Takagi H, Tamura I, Fujimura T, Doi-Tanaka Y, Shirafuta Y, Mihara Y, *et al.* Transcriptional coactivator PGC-1 α contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP β and p300. *J Biol Chem.* 2022. 298(5):101874. Doi: 10.1016/j.jbc.2022.101874.
 227. Tamrakar SR, Bastakoti R. Determinants of Infertility in Couples. *J Nepal Health Res Counc.* 2019. 17(1):85-9. Doi: 10.33314/jnhrc.1827.
 228. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, *et al.* Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2014. 28(10):1656-69. Doi: 10.1210/me.2014-1117.
 229. Tamura I, Shiroshita A, Fujimura T, Tanaka-Doi Y, Shirafuta Y, Maekawa R, *et al.* Genome-wide analysis of histone modifications that underlie the dynamic changes in gene expression during decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2023. 29(7):gaad019. Doi: 10.1093/molehr/gaad019.
 230. Tan JZ, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2014. 35(2):161-74. Doi: 10.1038/aps.2013.161.
 231. Tapia-Pizarro A, Archiles S, Argandoña F, Valencia C, Zavaleta K, Cecilia Johnson M, *et al.* hCG activates Epac-Erk1/2 signaling regulating Progesterone Receptor expression and function in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2017. 23(6):393-405. Doi: 10.1093/molehr/gax015.
 232. Tapia-Pizarro A, Argandoña F, Palomino WA, Devoto L. Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro. *Hum Reprod.* 2013. 28(8):2215-27. Doi: 10.1093/humrep/det136.
 233. Tavakol S, Azedi F, Hoveizi E, Ai J, Joghataei MT. Human Endometrial Stem Cell Isolation from Endometrium and Menstrual Blood. *Bio Protoc.* 2018. 8(2):e2693. Doi: 10.21769/BioProtoc.2693.
 234. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018. 7(1):1535750. Doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
 235. Thompson RE, Johnson AK, Prado TM, Premanandan C, Brown ME, Whitlock BK, Pukazhenthil BS. Dimethyl sulfoxide maintains structure and function of

- cryopreserved equine endometrial explants. *Cryobiology*. 2019. 91:90–6. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.10.006.
236. Tochigi H, Kajihara T, Mizuno Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kamei Y, *et al*. Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. *Sci Rep*. 2017. 7:40001. Doi: 10.1038/srep40001.
237. Tomari H, Kawamura T, Asanoma K, Egashira K, Kawamura K, Honjo K, *et al*. Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity. *Biol Reprod*. 2020. 103(1):104-13. Doi: 10.1093/biolre/iaaa044.
238. Tong Y, Zhou Z, Tang J, Feng Q. MiR-29b-3p Inhibits the Inflammation Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Regulating SEC23A. *Biochem Genet*. 2022. 60(6):2000-14. Doi: 10.1007/s10528-022-10194-8.
239. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Prie Rev Mol Cell Biol*. 2019. 20(1):5-20. Doi: 10.1038/s41580-018-0059-1.
240. Twal WO, Czirok A, Hegedus B, Knaak C, Chintalapudi MR, Okagawa H, Sugi Y, Argraves WS. Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J Cell Sci*. 2001. 114(Pt 24):4587-98. Doi: 10.1242/jcs.114.24.4587.
241. Ujvari D, Jakson I, Babayeva S, Salamon D, Rethi B, Gidlöf S, Hirschberg AL. Dysregulation of In Vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells by Insulin via Transcriptional Inhibition of Forkhead Box Protein O1. *PloS One*. 2017. 12(1):e0171004. Doi: 10.1371/journal.pone.0171004.
242. van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol*. 2009. 85(1):4-19. Doi: 10.1189/jlb.0708395.
243. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018. 62:2-10. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
244. Vasquez YM, Mazur EC, Li X, Kommagani R, Jiang L, Chen R, *et al*. FOXO1 is required for binding of PRIE on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization. *Mol Endocrinol*. 2015. 29(3):421-33. Doi: 10.1210/me.2014-1292.
245. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, *et al*. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*. 2019. 9(1):4641. Doi: 10.1038/s41598-019-40660-0.
246. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, *et al*. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytherapy*. 2019. 21(10):1019-24. Doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
247. Wadhwa L, Rani A. Impact of Intrauterine Administration of Human Chorionic Gonadotropin before Intrauterine Insemination in Infertile Women: A

- Randomized Controlled Trial. *J Hum Reprod Sci.* 2021. 14(2):156-61. Doi: 10.4103/jhrs.jhrs_196_20.
248. Wang A, Chen P. Comprehensive analysis of circRNA-miRNA-mRNA network related to angiogenesis in recurrent implantation failure. *BMC Med Genomics.* 2024. 17(1):193. Doi: 10.1186/s12920-024-01944-1.
249. Wang L, Cui M, Cheng D, Qu F, Yu J, Wei Y, Cheng L, Wu X, Liu X. miR-9-5p facilitates hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion by targeting ESR1. *Mol Cell Biochem.* 2021. 476(2):575-83. Doi: 10.1007/s11010-020-03927-z.
250. Wang L, Li Y. MiR-29b-3p affects growth and biological functions of human extravillous trophoblast cells by regulating bradykinin B2 receptor. *Arch Med Sci.* 2020. 18(2):499-522. Doi: 10.5114/aoms.2019.91512.
251. Wang W, Vilella F, Alama P, Moreno I, Mignardi M, Isakova A, *et al.* Single-cell transcriptomic 133ota ct133 the human endometrium during the menstrual cycle. *Nat Med.* 2020. 26: 1644-53. Doi: 10.1038/s41591-020-1040-z.
252. Wegler C, Olander M, Wisniewski JR, Lundquist P, Zettl K, Åsberg A, *et al.* Global variability analysis of mRNA and protein concentrations across and within human tissues. *NAR Genom Bioinform.* 2019. 2(1):lqz010. Doi: 10.1093/nargab/lqz010.
253. Wei H, Yang S, Yi T, Xu X, Liu C, Shen C, Guo Y, Li Q, Jin P. CircAGK regulates high dihydrotestosterone-induced apoptosis in DPCs through the miR-3180-5p/BAX axis. *FASEB J.* 2023. 37(2):e22728. Doi: 10.1096/fj.202200849R.
254. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas E, Blenkiron C, Bussolati B, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024. 13(2):e12404. Doi:10.1002/jev2.12404.
255. Wyns C, De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Motrenko T, Smeenk J, *et al.* ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open.* 2022. 2022(3):hoac022. Doi: 10.1093/hropen/hoac022.
256. World Health Organization. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. Geneva. 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
257. Wu D, Kimura F, Zheng L, Ishida M, Niwa Y, Hirata K, *et al.* Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017. 15(1):16. Doi: 10.1186/s12958-017-0233-x.
258. Wu YL, Lin ZJ, Li CC, Lin X, Shan SK, Guo B, *et al.* Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduct Target Ther.* 2023. 8(1):98. Doi:10.1038/s41392-023-01333-7.
259. Wu PL, Zhu JW, Zeng C, Li X, Xue Q, Yang HX. IGFBP7 enhances trophoblast invasion via IGF-1R/c-Jun signaling in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reproduction.* 2022. 164(5):231-41. Doi: 10.1530/REP-21-0501. PMID: 35900339.

260. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Prie Rev Genet.* 2017. 18(9):517-34. Doi: 10.1038/nrg.2017.33.
261. Xiao B, Zhu Y, Liu M, Chen M, Huang C, Xu D, Wang F, Sun S, Huang J, Sun N, Yang F. miR-340-3p-modified bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit ferroptosis through METTL3-mediated m6A modification of HMOX1 to promote recovery of injured rat uterus. *Stem Cell Res Ther.* 2024. 15(1):224. doi: 10.1186/s13287-024-03846-6.
262. Xin G, Du J, Liu MY, Xu YP. Upregulation of MiR-29b contributes to mesenchymal stem cell dysfunction in patients with severe preeclampsia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017. 10(10):10243-51.
263. Xu N, Zhou X, Shi W, Ye M, Cao X, Chen S, Xu C. Integrative analysis of circulating microRNAs and the placental transcriptome in recurrent pregnancy loss. *Front Physiol.* 2022. 13:893744. Doi: 10.3389/fphys.2022.893744.
264. Xu S, Li J, Chen X, Liu B. In Vitro Study on the Regulation of Annexin IV and VEGF by hCG in the Human Endometrium. *Biochem Res Int.* 2020. 2020:8892930. Doi:10.1155/2020/8892930.
265. Xue G, Ren Z, Chen Y, Zhu J, Du Y, Pan D, *et al.*. A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation. *Cancer Lett.* 2015. 361(1):121-7. Doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.046.
266. Zegers-Hochschild F, Dickens BM, Dughman-Manzur S. Human rights to in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013. 123(1):86-9. Doi: 10.1016/j.ijgo.2013.07.001.
267. Zeng H, Fu Y, Shen L, Quan S. MicroRNA signatures in plasma and plasma exosome during window of implantation for implantation failure following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021. (1):180. Doi: 10.1186/s12958-021-00855-5.
268. Zeng Y, Wei L, Lali MS, Chen Y, Yu J, Feng L. miR-150-5p mediates extravillous trophoblast cell migration and angiogenesis functions by regulating VEGF and MMP9. *Placenta.* 2020. 93:94-100. Doi: 10.1016/j.placenta.2020.02.019.
269. Zhang Y, Zhou J, Li MQ, Xu J, Zhang JP, Jin LP. MicroRNA-184 promotes apoptosis of trophoblast cells via targeting WIG1 and induces early spontaneous abortion. *Cell Death Dis.* 2019. 10(3):223. Doi: 10.1038/s41419-019-1443-2.
270. Zhang Q, Pan Y, Ji J, Xu Y, Zhang Q, Qin L. Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review. *Cell Death Discov.* 2021. 7(1):287. Doi: 10.1038/s41420-021-00668-w.
271. Zhang S, Pei M, Li Z, Li H, Liu Y, Li J. Double-negative feedback interaction between DNA methyltransferase 3A and microRNA-145 in the Warburg effect of ovarian cancer cells. *Cancer Sci.* 2018. 109(9): 2734-45. Doi: 10.1111/cas.13734.
272. Zhang S, Zeng N, Alowayed N, Singh Y, Cheng A, Lang F, Salker, M.S. Downregulation of endometrial mesenchymal marker SUSD2 causes cell

- senescence and cell death in endometrial carcinoma cells. *PloS One*. 2017. 12(8): e0183681. Doi: 10.1371/journal.pone.0183681.
273. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep*. 2015. 16(11):1467-81. Doi: 10.15252/embr.201540945.
274. Zheng J, Shao S, Dai C, Guan S, Chen H. miR-9-5p promotes the invasion and migration of endometrial stromal cells in endometriosis patients through the SIRT1/NF- κ B pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020. 13(7):1859-66.
275. Zhou H, Hu S, Yan W. Extracellular vesicles as modifiers of epigenomic profiles. *Trends Genet*. 2024. 40(9):797-809. Doi: 10.1016/j.tig.2024.05.005.
276. Zhu M, Yi S, Huang X, Meng J, Sun H, Zhou J. Human chorionic gonadotropin improves endometrial receptivity by increasing the expression of homeobox A10. *Mol Hum Reprod*. 2020. 26(6):413-24. Doi:10.1093/molehr/gaaa026
277. Zlatska AV, Rodnichenko AE, Gubar OS, Zubov DO, Novikova SN, Vasyliiev RG. Endometrial stromal cells: isolation, expansion, morphological and functional properties. *Exp Oncol*. 2017. 39(3):197-202.
278. Zubrzycka A, Zubrzycki M, Perdas E, Zubrzycka M. Genetic, Epigenetic, and Steroidogenic Modulation Mechanisms in Endometriosis. *J Clin Med*. 2020. 9(5):1309. Doi: 10.3390/jcm9051309.

SUMMARY

List of Abbreviations Used in Summary

AGT – Angiotensinogen;
ChIP – Chromatin Immunoprecipitation;
CXCL12 – C-X-C motif chemokine 12;
DMSO – Dimethyl Sulfoxide;
ESC – Endometrial Stromal Cells;
EV – Extracellular Vesicles;
FBLN1 – Fibulin 1;
FBS – Fetal Bovine Serum;
FOXO1 – Forkhead Box O1;
HAND2 – Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2;
hCG – human Chorionic Gonadotropin;
HOXA10 – Homebox A10;
IGFBP1/7 – Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1/7;
ISCT – International Society for Cell & Gene Therapy
MeDIP – Methylated DNA immunoprecipitation;
MMP2 – Matrix Metalloproteinase-2;
MPA – Medroxyprogesterone Acetate;
MSC – Mesenchymal Stromal cells;
PAM – Peptidyl-glycine alpha-Amidating Monooxygenase;
PAPP – Pregnancy-Associated Plasma Protein A;
PBS – Phosphate Buffered Saline;
PRTN3 – Proteinase 3;
STAT5A – Signal Transducer and Activator of Transcription A;
STC1/2 – Stanniocalcin-1/2;
WNT4 – Wnt family member 4.

INTRODUCTION

Infertility affects about 10-15 % of fertile-age couples worldwide (Gerrits *et al.*, 2017). Frequencies of female and male factors contributing to infertility are almost equal (Borghet *et al.*, 2018). However, the causes of about 14 % of infertility cases have not been detected yet (Tamrakar and Bastakoti, 2019). Diagnosis of infertility besides that triggers psychological, emotional, social, and even financial difficulties, also challenge the main rights of human being including the choice to have descendants (Zegers-Hochschild *et al.*, 2013). The most applicable treatments for unexplained infertility are insemination into the uterus and *in vitro* fertilization (Mol *et al.*, 2018). Despite these treatments increasing the chances of a successful pregnancy, however, they are not targeting specific mechanisms that have provoked infertility, and the pregnancy rate after these procedures remains low (Ombelet *et al.*, 2016; Wyns *et al.*, 2022). Successful embryo implantation depends not only on the quality of the embryo but also on the inner uterus lining endometrium preparation state (Yang *et al.*, 2023). Each menstrual cycle endometrium undergoes drastic structural and functional changes regulated by female sex hormones to prepare the suitable basis for embryo implantation and following pregnancy development. The menstrual cycle can be divided into three phases: menstruation, the proliferation phase, which concurs with follicles maturation in the ovaries, and after ovulation starting secretory phase. The endometrium is receptive very limited time of a few days during the secretory stage of the menstrual cycle. Therefore for successful implantation is very important precision interaction between the embryo and the accordingly prepared endometrium. One of the main changes in endometrium preparation is tissue differentiation called decidualization. During decidualization, endometrial stromal fibroblasts differentiate into specific round secretive cells, and immune cells are attracted to the tissue, thus forming a nutritive and immunotolerance environment for embryo implantation and placenta development (Okada *et al.*, 2018). Meanwhile, ineffective and disturbed endometrial tissue decidualization is associated with pregnancy disorders including infertility, miscarriage, premature birth, repeated implantation failure, and uterus and placenta disorders (Wu *et al.*, 2017; Garrido-Gomez *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2022). Intensive gene expression changes observed during decidualization are regulated by steroid hormones and other molecular as well as epigenetic factors (Liu *et al.*, 2020, Ng *et al.*, 2020). Epigenetic describes inheritable gene expression changes, which do not affect DNA sequence and is involved in fundamental cellular process regulation (Al About *et al.*, 2023). Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation,

histone post-translational modifications, and noncoding RNA, are responsible for precise decidualization process regulation. Epigenetic modulators through the endometrial cycle proliferative phase activate the expression of genes regulating transcription activation, endometrium tissue growth, and angiogenesis. Meanwhile, during the secretive phase, is induced gene expression associated with response to hormones, insulin signaling pathway, decidualization, and embryo implantation (Retis-Resendiz *et al.*, 2021). Epigenetic changes as well could be involved in the pathogenesis of endometrium diseases, such as endometrial cancer, and endometriosis (Zubrzycka *et al.*, 2020; Inoue *et al.*, 2021). Therefore, assessment of epigenetic regulation during endometrial decidualization could help to improve knowledge and detect endometrial targets that impact fertility and endometrial-associated disorders.

After fertilization, the developing embryo reaches the uterus and starts to secret factors that finalise the preparation of the endometrium to successfully admit embryo implantation. One of the first embryo secreted 138ota ct138n human chorionic gonadotropin (hCG) (d'Hauterive *et al.*, 2022). hCG regulates endometrium tissue angiogenesis (Xu *et al.*, 2020), synthesis of extracellular matrix (Tapia-Pizaro *et al.*, 2017; Riboldi *et al.*, 2020), immunoregulation (Bourdiec *et al.*, 2013), decidualization (Koch *et al.*, 2018), and implantation (Makrigiannakis *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2020) processes. During pre-implantation period alterations in molecular communication between maternal tissues and embryo could lead to pregnancy related complications, including miscarriage and recurrent implantation failure (Idelevich and Vilella, 2020; Gunther *et al.*, 2023).

Working with biological materials in research and clinic laboratories is important to be able to maintain them viable for a prolonged time. Typically, biological samples are stored at very low temperatures, which leads to a drastic decrease in the level of cellular biological and chemical reactions (Jang *et al.*, 2017). Tissue cryopreservation is a widely used procedure, especially in reproductive medicine where it is used for reproductive systems samples (gametes, embryos, ovarian tissues) storage (Canosa *et al.*, 2023). That ensures the long-term viable biological samples accessibility. Recently published researches have not confirmed the negative impact of cryopreservation on the viability of tissues (Fox *et al.*, 2017; Heidari-Khoei *et al.*, 2022). However impact of the cryopreservation process on cellular processes still raises questions, so further research involving an investigation of molecular, genetic, and epigenetic mechanisms, should be performed.

Studying the epigenetic mechanisms involved in endometrial decidualization could enhance our comprehension of the molecular regulation

of endometrial function. Additionally, examining the interplay between embryo-secreted signals like hCG and endometrial decidualization could unveil potential targets for addressing implantation disorders. Lastly, assessing the impact of tissue cryopreservation would provide insights and recommendations regarding the applicability of stromal cells isolated from such tissues for therapeutic applications.

The aim of this study – To evaluate the alterations of epigenetics and other molecular factors in endometrial stromal cells during decidualization.

The main tasks

1. To characterise patients-derived endometrial stromal cells (ESC) according to their morphology, profile of surface markers, and mesenchymal differentiation potential.
2. To evaluate cryopreservation of endometrial tissues' impact from such tissues' isolated mesenchymal stromal cells' molecular and epigenetic (gene expression, miRNA and DNR methylation level) changes.
3. To evaluate general epigenetic changes (epigenetic modulators expression, histone post-translation modifications, DNA methylation, and miRNA level) during induced ESC decidualization. To determine histone modification H4hyperAc and DNA methylation level changes specifically in decidualization-associated gene regions.
4. To identify embryo-secreting factor hCG's impact on ESC properties including metabolic activity and viability, expression of genes associated with decidualization, epigenetic regulation, metabolism, apoptosis, immunoregulation, implantation, and histone modification changes). To determine histone modification H3K27Ac level changes specifically in decidualization-associated gene regions.
5. To analyze changes in the protein and miRNA profiles of EVs secreted by ESCs following induced decidualization and the impact of hCG.

Scientific novelty

In this work, we analyzed ESCs isolated from patients' endometrial biopsies. After confirmation, that isolated ESC corresponds to mesenchymal stromal cells' characteristics and is able to efficiently decidualize, further we investigated epigenetic changes during induced ESC decidualization. First time in this work we demonstrated that with ESC decidualization associated general histone H4 hyperacetylation modification increase is specific enriches

in decidualization-associated genes (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*) promoter regions, while DNA methylation in these regions was already low before decidualization induction.

During this work, we also compared molecular and epigenetic changes between mesenchymal stromal cells (MSC) isolated from fresh and cryopreserved reproductive system tissues. Based on the results of this investigation, we concluded that cryopreservation did not have a significant negative impact on isolated cells' miRNA and DNA methylation level changes.

In this work, we were the first to evaluate the impact of induced decidualization and one of the earliest embryo-secreted factors, hCG, on ESC properties. We concluded that the effect of hCG on ESC is concentration-dependent and targets various molecular pathways, including histone modifications and gene expression changes. Most importantly, we demonstrated that *in vitro* treatment with 10 IU/ml hCG increased the expression of the decidualization marker PRL in previously decidualized ESCs and inhibited the expression of the anti-inflammatory interleukin IL-6 gene. Additionally, we observed that hCG treatment led to a general increase in the H3K27Ac modification level, specifically enriched in the promoter regions of genes associated with implantation and decidualization processes, such as *HOXA10*, *HAND2*, and *FOXO1*.

Furthermore, we assessed the impact of decidualization and hCG on ESC-secreted EV protein and miRNA profile changes. After decidualization, ESC-derived EVs were enriched with proteins associated with embryo implantation and pregnancy (*AGT*, *FBLN1*, *IGFBP1*, *IGFBP7*, *MMP2*, *STC1/2*, *PAM*, *PAPPA*, *WNT4*), while hCG treatment led to an increase in immune response-related proteins (*PRTN3*, *CXCL12*). Analyzing ESC EV miRNA profiles, we identified several commonly downregulated miRNAs after both treatments (*hsa-miR-1-3p*, *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-150-5p*, *hsa-miR-184*), which may be linked to reproductive dysfunction. Additionally, we demonstrated that hCG treatment specifically increased the levels of *hsa-miR-663a*, *hsa-miR-766-5p*, *hsa-miR-2180-5p*, and *hsa-miR-4755-5p* in previously decidualized ESCs.

All our results contribute to existing knowledge about the importance of epigenetic regulation for ESC decidualization and can help to identify endometrial targets for infertility treatment solutions. Assessment of MSC properties isolated from fresh and cryopreserved tissues allows us to evaluate the impact and safety of reproductive tissue long-term storage at very low temperatures.

Statements to be defended

- The increase of histone H4 hyperacetylation, rather than alterations in DNA methylation within promoter regions of decidualization-associated genes, serves as the mechanism for activating ESC decidualization.
- Cryopreservation of reproductive tissues does not adversely affect the mesenchymal stromal cells and enables long-term storage of tissues at low temperatures, allowing for subsequent isolation of MSCs without notable molecular alterations.
- hCG treatment activates ESC decidualization and implantation-related factors by regulating histone modifications. hCG specifically influences changes in miRNA in decidualized ESC EVs.

METHODS

Tissue collection and cryopreservation

Human endometrial tissues were collected from patients undergoing assisted reproductive procedures at the Vilnius University Hospital Santaros Klinikos Obstetrics and Gynaecology Center Santaros Fertility Center with informed consent for participation in the research. For this research Ethical permission No. 158200-18/7-1049-550 was confirmed.

Before cryopreservation, tissues were minced by a scalper into 2-3 mm² pieces, and transferred into cryo vials with cryopreservation media consisting of 90 % fetal bovine serum (FBS)) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA). Cryovials with tissues were kept at -80 °C overnight, after that samples were transferred into liquid nitrogen dewar (-196 °C). After a defined period, samples from liquid nitrogen were transferred into a +37 °C water bath for 3 min. Further stromal cells, DNA, RNA, or proteins were isolated from such tissues the same as described further in non-cryopreserved tissue cases.

Stromal cells isolation, cultivation, and evaluation of proliferation metabolic activity, and differentiation efficiency

ESC were extracted as described before (Tavakol *et al.*, 2018). ESCs were cultivated in a growth medium consisting of DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), 10 % FBS, and 50 µg/ml primocin (Invivogen, USA) solution, at the 37 °C, 5 % CO₂ environment. For proliferation efficiency cells were calculated by staining with Trypan Blue, and for determination of metabolic activity MTT test (Sigma-Aldrich, USA) was applied. ESC were induced to differentiate into adipogenic, osteogenic, myogenic, neurogenic, and chondrogenic lineages using appropriate induction protocol and results were confirmed by staining suitable dyes (Navakauskienė *et al.*, 2023).

ESC treatments with decidualization inducers and hCG

For ESC decidualization induction a growth media was replaced into decidualization media consisting of RPMI (without phenol) (Hyclone Laboratories, USA), 2 % charcoal-treated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA), and decidualization inducers: 0,5 mM db-cAMP (Sellechem, USA), and 1 µM medroxyprogesterone acetate (MPA) (Cayman Chemical Company, USA).

Decidualization efficiency was determined in 6, 24h, and 3 and 6 days time-points. Additionally, hCG impact for ESC was analysed using 10, 50, and 100 IU/ml hCG. This experiment 143ota ct143 explained in Table No.1. Induction media is decidualization media without decidualization inducers.

Table No.1. Experiment setup of hCG treatment

Sample	Preinduction (2 days)	Until sample collection for analysis (additionally 6 or 24 hours)
Control	Induction media	Induction media
hCG	Induction media	Induction media + hCG
Decidua	Decidualization media	Decidualization media
Decidua + hCG	Decidualization media	Decidualization media + hCG

Flow cytometry

Stromal cells were characterized according to their surface marker expression. Cells were incubated with appropriate antibodies and analysed using flow cytometer *Guava® easyCyte* (Luminex, USA) with software *InCyte™ 2.2.2*. Results were analysed using software *Flowing Software 2.5.1*. (Turku Bioscience, Finland).

Isolation of DNA and RNA

DNA and RNA were extracted from samples using the commercial kit *Quick-DNA/RNA™ Miniprep* (Zymo Research, USA) according to manufacturers instructions. The concentration and purity of extracted nucleic acids were determined using the spectrophotometer *NanoPhotometer™* (Implen, Germany).

Reverse Transcription and qPCR

Up to 1 µg RNA was taken for reverse transcription reaction using *SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit* (Bioline, USA) or *LunaSript® RT SuperMix Kit* (New England Biolabs, USA). qPCR analysis performed with *SensiFAST™ SYBR® No-ROX kit* (Bioline, JAV) or *Luna® Universal qPCR Master Mix* (New England Biolabs, JAV) using Real-Time PCR thermocycler *RotorGene 6000 system* (Corbett Life Science, QIAGEN, Germany) and software *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7*. Quantities of mRNA were

normalized according to *GAPDH* or a geometric average of *GAPDH* and *RPL13A*. Relative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Untreated (control) and treated ESCs' secretion of IGFBP-1 and prolactin proteins levels were quantified using *IGFBP-1 ELISA kit* (Mediagnost, Germany), and *Prolactin ELISA kit* (Biovendor – Laboratorni medicina a.s., Czech) according to the manufacturer's instructions. The total levels of proteins in analysed samples were determined using *Bradford Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol. Quantification of the ELISA tests was determined using a spectrophotometer *Infinite® M200 Pro plate reader* (Tecan, Switzerland).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and qPCR

ChIP analysis was performed using the commercial kit *Zymo-Spin ChIP Kit* (Zymo Research, USA) according to the manufacturer's instructions with slight modifications as described in Žukauskaite *et al.*, (2023). In short, cells were crosslinked in the cell culture flasks before detachment. Samples were sonicated using *Bioruptor® Pico* (Diagenode, Belgium) performing 3 cycles ON 30s, OFF 30s. Further chromatin fragments were incubated for 24h at 4 °C with antibodies against H4hyperAc, H4K27Ac (Merck Millipore, USA), or IgG (Advansta, USA). Immunoprecipitated DNA levels were determined by performing qPCR as described in Section „Reverse Transcription and qPCR“.

Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) and qPCR analysis

Isolated DNA of analysed samples were sonicated using *Bioruptor® Pico* (Diagenode, Belgium). For sonicated 2 µg DNA was taken and performed 7 cycles ON 15 s, OFF 90s. 320 ng sonicated DNA was incubated with 0,8 µl 1mg/1ml antibody against 5-methylcytosine (Eurogentec, Belgium), and *ZymoMag Protein A* magnetic beads (Zymo Research, USA) for 1h at 37 °C while rotating. Immunoprecipitated DNA levels were determined by performing qPCR as described above.

Western Blot

Cells for Western Blot analysis were lysed and proteins were detected as described earlier (Savickienė *et al.*, 2015). Shortly, cells were lysed by using

SDS lysis buffer, and then proteins were fractionated in gradient 7,5–15 % SDS-PAGE gel using Tris-glycin buffer. After that proteins were transferred on the PVDF membrane. Further membranes were incubated with primary and secondary antibodies including washing steps in between. For protein detection, Horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako, Denmark; Advansta, USA) were used and chemiluminescence was detected using *WesterBright™* kit (Advansta, USA) and signal was measured in transilluminator *ChemiDoc™ XRS+ System* using software *Image Lab* (BIO-RAD, USA). For quantitation of results, the software *ImageJ* (National Institutes of Health, USA) was applied.

miRNA analysis

For miRNA expression analysis the commercial kit *Taqman™ MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions was used. Analysed miRNAs: hsa-miR29b-3p, hsa-miR145-5p, hsa-miR125b-5p, hsa-miR21-5p, hsa-miR34a-3p. For reverse transcription *Taqman™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* was used, and for qPCR *TaqMan™ Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems, USA). Levels of detected miRNA were normalized according to RNU48. Relative miRNA expression was calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method.

EV collection, characterization, protein and RNA isolation

For EV collection experiments, FBS was excluded from growing media. EV isolation was performed by performing differential centrifugation steps for the condition media of treated cells. It included 300 g 10 min, 2000 g 10 min, 20 000 g 30 min, 100 000 g 70 min. All centrifugation steps were handled at 4 °C using ultracentrifuge *Optima XE Ultracentrifuge* (Beckman, USA) with rotor *Type 70 TI*. After the last ultracentrifugation step, collected EV were washed by suspending in PBS and repetitively centrifugated at 100 000 g for 70 min. After the wash step, EV were suspended in PBS and kept at -80 °C until further use. For EV characterization, Western Blot was performed as described above. EV size and amount distribution analysis was performed using the nanoparticles tracking device *NanoSight LM10-HS* (Nanosight, UK). RNA from collected EV was extracted using *TRIzol™* reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions.

Determination of proteins in EV by Mass Spectrometry

Protein detection in extracellular vesicles (EVs) was performed by the Proteomics Department at Bristol University. Initially, peptides from various samples were labeled using Tandem Mass Tags (TMT) and then pooled for subsequent analysis. The labeled peptides were fractionated using high pH reversed-phase chromatography and analyzed via mass spectrometry. The data were aligned with the human UniProt database (<https://www.uniprot.org/>), and protein grouping was identified using PD2.4 software (Thermo Fisher Scientific, USA). The protein amounts in each sample were normalized based on the total protein content and log-transformed. Comparisons between groups were made using the unpaired t-test, with p-values determined by the Benjamini-Hochberg method.

Small RNA sequencing of EV

Small RNA sequencing and bioinformatic analysis were performed by *Novogene Co* (UK). Sequencing were conducted by using the *Illumina* sequencing platform SE50 (Illumina, USA). *Bowtie* software was used for small RNA alignment with referent sequences. Potential targets of miRNA were identified using *miRanda*. Differentially expressed miRNA comparisons between samples were conducted using *DEGseq R package*. Changes were considered significant if p value < 0,05, while change > 1,3. *Gene Ontology* (GO) analysis was used for differentially expressed miRNAs target gene evaluation, while the KEGG database was used to evaluate targeted genes functional information.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc). Results are represented as means with standard deviations, or medians with interquartile range, unless there is specified otherwise in the description of the figure. Mann-Whitney test was to compare differences between unpaired samples, o Wilcoxon for paired samples. The selected statistically significant level (α) is 0,05. *p value < 0,05; **p value < 0,01; ***p value < 0,001.

RESULTS

Our results revealed that isolated stromal cells from endometrial tissues, exhibit high expression of mesenchymal (CD73, CD90, CD105) as well as endometrial stemness (CD140b, CD146, SUSD2, SSEA4) markers. Moreover, we confirmed that ESC have a broader than mesenchymal (adipogenic, osteogenic, chondrogenic) differentiation potential, including by being able to differentiate into the neurogenic lineage. Furthermore, we analysed decidualization inducers db-cAMP and MPA efficiency for ESC decidualization induction separately and in complex, and found out, that despite db-cAMP successfully leading to ESC decidualization induction, by detecting an increase in expression of decidualization markers, prolactin, and IGFBP1, however, the combination of both inducers has the highest effect and was chosen for following analyses.

We analysed how endometrium tissue cryopreservation affects from such tissue' isolated stromal cells properties, including changes in epigenetic regulation. Despite the detected decrease in the proliferation efficiency of Cryo ESC in the later passages and decrease in the levels of SUSD2, from cryopreserved and thawed tissue isolated stromal cells remain very similar surface proteins expression, proliferation, and differentiation efficiency potency properties comparing to from non-cryopreserved tissue isolated cells.

Next, we analysed, how endometrium tissue cryopreservation affects, gene expression changes, and found that after such manipulations, there is an increase in the expression levels of OCT4, NANOG (pluripotency markers), DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (DNA demethylation), SRC1, and SUZ12 (histone modifications). However, we did not observe any changes in the analysed histone modifications and protein levels of this modification catalysing factors. Moreover, by analysing DNA methylation changes in specific genomic regions, despite observed tendencies of DNA methylation decreases in cryopreserved endometrial tissues and from such tissues isolated ESC comparing to their native compartments, there is not enough evidence, to answer if these changes have a functional role in gene expression regulation. Finally, we analysed tissue impact of cryopreservation on miRNA levels and found that in cryopreserved endometrial tissue and isolated cells, there is a significant decrease in the levels of hsa-miR-145-5p. Moreover, comparing endometrium-isolated stromal cells, we observed the tendency, that cryopreservation treatment leads to an decrease in the levels of hsa-miR-145-5p.

Further, we analysed the changes in the epigenetic regulation of ESC after decidualization induction. Our results revealed, that decidualization stimulus downregulated *DNMT1*, *DNMT3B*, and *EZH2* expression. After prolonged exposure to decidualization stimulus (after 6 days), the increase in *HDAC2* and *SRC-1* expression levels was detected. Also, we demonstrated the increased level of H4hyperAc and H3K27Me3 histone modifications in decidualised ESC lysates compared to untreated control. Meanwhile, protein analysis confirmed that HDAC2, EZH2, SUZ12, and BMI1 levels were decreased during the ongoing decidualization process (after 24 and 72 hours), where the level of HP1 α increased. As well, we detected an increase in the expression levels of hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p, and hsa-miR-34a-3p after induced ESC decidualization.

We analyzed and confirmed, that increase in H4hyperAc level is specifically enriched in decidualization-associated genes (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*) promoter regions. DNA methylation levels in these gene promoter sites were very low even before the decidualization induction stimulus and did not differ after. Our results demonstrated that certain gene promoter regions' histone acetylation increase, but not the DNA methylation changes, during induced ESC decidualization may be an activating mechanism of decidualization.

In the next part of the experiments, we evaluated hCG's impact on ESC properties and found that different concentrations of hCG (10-100 IU/mL) do not have a negative impact on ESC metabolic activity and viability. However, we observed that hCG impact on the ESC decidualization process is dose-dependently, and only 10 IU/mL has the highest increase in decidualization marker, but only, in previously decidualised ESC, while 50 IU/mL hCG treatment led to a lower increase. Further, we analysed hCG impact on epigenetic factors in previously non-decidualised and decidualised ESC, and found, that hCG treatment leads to a decrease in the expression of *EED*, *HDAC1*, and *TET1/2/3*. By analysing other with processes, such as inflammatory regulation, metabolic activity, and apoptosis, associated genes, we also detected, that hCG treatment inhibits *IL6*, *GPXI*, *TXN*, and *BAK1* expression.

For further experiments, we chose only 10 IU/mL hCG treatment, and by analysing this concentration impact on protein levels of histone modifications, found that in the shorter treatment of hCG, H3K27Ac, H3K9Ac, and H3K4Me3 levels were increased. Moreover, in the prolonged treatment of hCG, we observed increase in the level of H3K27Me3. In addition, to observed histone modification changes, we detected that hCG treatment inhibits EED levels, while the level of HDAC2 is slightly increased. As we

observed, hCG treatment impacts the increase of global H3K27Ac modification level, we further analysed how this modification differs in specific genome regions. Results of our analysis revealed, that hCG treatment led to a significant additional increase in H3K27Ac levels in *FOXO1* promoter of previously decidualised ESC. Moreover, we observed the tendencies, that this modification levels also increase in the *HAND2* and *HOXA10* promoter regions after the treatment with hCG.

We also demonstrated that the effects of decidualization and hCG treatments on ESC EV protein and miRNA profiles are diverse. Decidualization induction led to an increase in ESC EV levels of proteins associated with embryo implantation and pregnancy (AGT, FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAM, PAPP, WNT4). In contrast, the specific effect of hCG was an increase in proteins related to immune regulation (PRTN3 and CXCL12). Additionally, we observed that several miRNAs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-184) were commonly downregulated in ESC EVs following both decidualization and hCG treatments. Notably, hCG treatment of previously decidualized ESCs specifically resulted in an increase in miRNAs such as hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, and hsa-miR-3180-5p. In summary, our findings reveal that decidualization and hCG treatments lead to diverse alterations in ESC EV protein and miRNA profiles, with decidualization primarily enhancing proteins linked to embryo implantation and pregnancy, while hCG specifically upregulates immune-regulatory proteins and distinct miRNAs in previously decidualized ESCs.

DISCUSSION

Human reproductive function relies on the state of endometrial preparation, which is cyclically regulated by female sex hormones secreted by the ovaries. (Mumusoglu *et al.*, 2021; Ng *et al.*, 2020). Throughout the menstrual cycle, the endometrium undergoes significant structural and functional changes, which are orchestrated by epigenetic factors that appropriately activate or inhibit decidualization-associated genes. (Liu *et al.*, 2020; Munro *et al.*, 2010). In our study, we evaluated alterations in epigenetic factors in ESCs, focusing on histone modifications, DNA methylation, and miRNA expression levels. We found that the increase of histone H4 hyperacetylation, rather than DNA methylation, correlates with decidualization process. Additionally, we observed that hCG treatment induces epigenetic changes in ESCs, including increased enrichment of another active chromatin mark, H3K27Ac, in regions associated with decidualization genes. Furthermore, our investigation revealed that stromal cells isolated from cryopreserved reproductive tissues exhibit minimal differences compared to those from non-cryopreserved tissues, suggesting that cryopreservation does not significantly affect stromal cell properties.

Initially, it is essential to work with stromal cells derived from patient samples to characterize them adequately. In our study, ESC from patient samples met the criteria set by the International Society for Cellular Therapy (ISCT), allowing them to be classified as MSCs. (Queckborner *et al.*, 2020; Beeravolu *et al.*, 2017; Zlatska *et al.*, 2017). After analyzing ESCs, we confirmed that these cells exhibit a specific profile of mesenchymal cell surface markers, fibroblast morphology, and multipotent differentiation potential. Additionally, the expression of endometrial stemness markers was confirmed in ESCs, and these cells demonstrated successful decidualization in the presence of decidualization inducers.

To investigate the impact of tissue cryopreservation on reproductive tissues and stromal cells isolated from such tissues, we compared the cellular, molecular, and epigenetic properties of cells isolated from non-cryopreserved (Native) and cryopreserved (Cryo) tissues. Our study revealed that stromal cells isolated from both Native and Cryo tissues exhibit similar characteristics, except for certain differences observed in later passages (>10), such as decreased ESC proliferation efficiency and a lower abundance of SUSD2+ cells in Cryo ESCs compared to Native ESCs. It is well-documented that cell proliferation efficiency decreases in later passages due to accumulated reactive oxygen species-induced cellular senescence (Gu *et al.*, 2016) or ion exchange alterations (Marakhova *et al.*, 2019). The literature presents

conflicting results regarding the impact of cryopreservation on cell proliferation efficiency, with some studies not reporting any changes (Li *et al.*, 2017; Bahsoun *et al.*, 2020; Sugimoto *et al.*, 2021), while one study confirmed decreased MSC proliferation potential after cryopreservation (Antebi *et al.*, 2019). Notably, the only significant decrease in cell surface markers observed in the Cryo ESC group was SUSD2. It has been demonstrated that a decrease in SUSD2 expression induces cellular senescence (Zhang *et al.*, 2017). Based on these findings, it can be concluded that endometrial tissue cryopreservation accelerates ESC senescence processes, leading to decreased proliferation efficiency in later passages.

Furthermore, we analyzed the impact of tissue cryopreservation on epigenetic regulation changes. Our study did not detect any significant changes in histone modification levels. However, we observed alterations in the gene expression of DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) following endometrium tissue cryopreservation. Additionally, we noted a tendency towards decreased DNA methylation levels in some genome regions of ESCs isolated from Cryo tissue. Although these observed changes were not statistically significant, there is insufficient evidence to predict their functional role. It is plausible that cryopreservation-induced reactive oxygen species dysbalance and oxidative stress could contribute to hypermethylation of promoter sites and whole genome hypomethylation (Reyes Palomares *et al.*, 2022). Additionally, we observed a decrease in the level of hsa-miR-145-5p in cryopreserved tissue. Increased levels of hsa-miR-145 have been associated with recurrent implantation failure and infertility induced by endometriosis (Saare *et al.*, 2017; Jahanbakhsh *et al.*, 2023). Furthermore, miR-145 directly inhibits the expression of DNMT3A (Zhang *et al.*, 2018) and DNMT3B (Xue *et al.*, 2015). Therefore, our observed decrease in hsa-miR-145-5p expression correlates with the observed increase in DNA methyltransferases after endometrium tissue cryopreservation. The observed changes in DNA methyltransferases, DNA methylation and miRNA levels underscore the necessity for further studies to elucidate their impact.

By analyzing changes in epigenetic factors during ESC decidualization, we initially examined the level of DNA methylation. Our findings revealed a decrease in the expression of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B following ESC-induced decidualization. This decrease in DNMTase expression aligns with previous observations in the endometrium during the secretory phase (Yamagata *et al.*, 2009) and in vitro ESC decidualization (Logan *et al.*, 2013). Despite the observed changes in DNMTase gene expression levels, we did not detect significant alterations in the DNA methylation levels of decidualization-associated genes' regions during

induced ESC decidualization. A previous comprehensive analysis of genome-wide DNA methylation revealed that culturing ESCs in media supplemented with E2 and P4 did not result in changes in DNA methylation profiles, although histone modifications and mRNA expression were altered (Maekawa *et al.*, 2019). Based on these findings, it appears that changes in DNA methylation may not be a significant regulator of ESC decidualization.

In our study, we confirmed that changes in histone acetylation levels are more significant during ESC decidualization compared to DNA methylation. We observed that following ESC decidualization induction, there was an increase in the global level of hyperacetylated histone H4 (H4hyperAc) modification, accompanied by a decrease in the level of histone deacetylase enzyme (HDAC2). These alterations play a crucial role in activating signaling pathways specific to decidualization-associated differentiation. Previous studies have also reported similar findings, demonstrating that culturing ESCs with E2 and P4 leads to an increase in the global level of histone H4 acetylation (Sakai *et al.*, 2003). Additionally, comparisons of endometrial tissue samples collected from different menstrual cycle phases have shown no significant changes in HDAC 1-3 mRNA levels, but a slight increase in HDAC2 protein levels during the secretory phase (Krusche *et al.*, 2007). Furthermore, *in vitro* studies have indicated that the amount of HDAC2 increases when ESCs are cultured with E2 (proliferation phase) but decreases when cultured with E2 and P4 (secretory phase), consistent with our observations (Colon-Diaz *et al.*, 2021). Therefore, our results contribute to a better understanding of histone acetylation changes, highlighting the importance of H4hyperAc modification in ensuring efficient endometrial function.

Having established an increase in H4hyperAc modification levels during ESC decidualization, we proceeded to analyze the specific changes of this active chromatin 152ota ct152n regions associated with decidualization-related genes. Our analysis revealed a significant elevation in the level of H4hyperAc modification at the promoter sites of key transcription factors involved in the decidualization process, including *WNT4*, *HAND2*, and *STAT5A*. Previous research has shown a similar increase in another histone acetylation modification, H3K27Ac, which is also linked to active chromatin, at promoter sites of genes such as *FOXO1*, *PRL*, and *IGFBP1* in ESCs during decidualization (Jozaki *et al.*, 2019). Thus, the activation of decidualization-associated gene expression during ESC decidualization appears to be specifically associated with the enrichment of H4hyperAc modification in the promoter regions of these genes.

In the second part of our experiment, we investigated the impact of hCG, one of the earliest factors secreted by the embryo to signal the endometrium about its presence (d'Hauterive *et al.*, 2022), on ESCs. Our findings revealed that the effect of hCG treatment on the ESC decidualization process is dose-dependent. Specifically, we observed that treatment with 10 IU/ml of hCG resulted in the highest expression of the decidualization marker prolactin in ESCs, whereas higher concentrations had a lower impact. Importantly, we found that the positive effect of hCG on the decidualization process was observed only in ESCs that had been previously decidualized; hCG treatment alone did not induce decidualization marker expression. These results mirror the physiological process observed *in vivo*, where endometrial stroma begins to decidualize every month after ovulation, and by the time the blastocyst reaches the uterus and begins to secrete hCG, ESCs have already initiated the decidualization process (Ochoa-Bernal and Fazleabas, 2020). Thus, our findings suggest that hCG does not act as a direct inducer of decidualization but enhances the ongoing decidualization process.

We then investigated the impact of hCG treatment on histone modifications and the enzymes responsible for catalyzing these modifications in ESCs. Our analysis revealed an increase in the levels of H3K27Ac, H3K4Me3, and H3K9Ac, as well as HDAC2, following hCG treatment. A recent study conducted in ovarian cells showed that short-term hCG treatment (1-2 hours) led to an increase in phosphorylated HDAC2 levels, resulting in genome-wide histone deacetylation (Jin *et al.*, 2023). This deacetylation was diminished after 4 hours, leading to the formation of a specific histone acetylation profile required for the initiation of ovulation. Furthermore, it was demonstrated that the level of H3K27Ac modification increased in genes associated with translation, mRNA synthesis, histone H3 acetylation, and positive transcription regulation (Jin *et al.*, 2023). These findings suggest that the impact of hCG treatment on histone acetylation changes may influence tissue-specific alterations.

In our study, we demonstrated that decidualization increased the levels of ESC EV proteins associated with embryo implantation and pregnancy. FBLN1, an extracellular protein, is highly expressed in placental tissue (Orvik *et al.*, 2021). AGT, the precursor of angiotensin, plays a crucial role in regulating blood flow, salt, and fluid homeostasis, especially during pregnancy (Lumbers and Pringle, 2014). IGFBP1 is a well-established marker of decidualization, primarily functioning by binding to insulin-like growth factor (IGF) and modulating its bioactivity. IGFBP1 levels during pregnancy correlate with maternal insulin sensitivity (Hivert *et al.*, 2024). A decrease in another IGF-binding protein, IGFBP7, has been linked to recurrent

spontaneous pregnancy loss and impaired trophoblast invasiveness (Wu *et al.*, 2022). MMP2 is an extracellular matrix protease essential for angiogenesis and uterine remodeling during pregnancy (Nikolov *et al.*, 2021). STC1 is a pleiotropic hormone that regulates several biological processes critical for female reproductive function (Bishop *et al.*, 2021). WNT4 is involved in the development and functioning of the female reproductive system (Pitzer *et al.*, 2021). Overall, the increased presence of these proteins in ESC EVs after decidualization is linked to blood flow regulation, extracellular matrix remodeling, and IGF signaling.

After decidualization and hCG treatments, the differentially expressed miRNAs in ESC EVs were unique to each treatment. We demonstrated that hCG treatment of decidualized cells led to increased levels of hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, and hsa-miR-3180-5p. In a previous study, miR-340-3p was shown to enhance uterine reconstruction in rats by inhibiting ferroptosis (Xiao *et al.*, 2024). miR-663a inhibits tumor growth factor and reduces cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition (Qu *et al.*, 2022). A decrease in miR-766-5p levels has been associated with recurrent pregnancy loss (Xu *et al.*, 2022). miR-3138 has been shown to increase insulin resistance by inhibiting glucose transporter activity (Chen *et al.*, 2021), while miR-3180-5p promotes apoptosis by inhibiting Bax in skin cells (Wei *et al.*, 2023). Thus, the increased levels of these miRNAs in ESC EVs after decidualization and hCG treatment may be involved in various biological processes depending on the context. Further studies are needed to clarify the direct role of these miRNAs in implantation.

CONCLUSIONS

1. Endometrial stromal cells derived from patients exhibit specific surface markers characteristic of mesenchymal stromal cells (CD73, CD90, CD105) as well as markers indicative of endometrial stemness (CD140b, CD146, SUSD2, SSEA4). These cells demonstrate the capacity to differentiate into mesodermal lineages (adipogenic, osteogenic, chondrogenic), and can efficiently undergo decidualization.
2. ESCs isolated from cryopreserved endometrium remain MSC surface markers expression and differential potential efficiency. However, in cryopreserved tissue isolated ESCs detected changes in the level of DNA methylation and its modulating factors (DNA methyltransferases, miR-145-5p).
3. Decidualization of endometrial stromal cells resulted in the downregulation of DNMTase gene expression, while DNA methylation levels remained unchanged in regions associated with decidualization genes. Additionally, a decrease in HDAC2 levels was confirmed, accompanied by an increase in global and site-specific histone modification H4 hyperacetylation enriched in the promotor regions of genes (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*) associated with decidualization. Furthermore, induction of decidualization led to elevated levels of hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29b-3p, and hsa-miR-34a-3p.
4. Treatment with hCG activates the decidualization process in endometrial stromal cells in a dose-dependent manner without compromising their metabolic activity or viability. Following hCG treatment, changes in gene expression of *IL6* and *BAK* were observed. Specifically, hCG treatment enhances the levels of histone modification H3K27Ac in regions associated with decidualization (*FOXO1*) and implantation (*HOXA10*, *HAND2*) processes.
5. Following decidualization induction, ESC EV exhibit an increase in proteins associated with embryo implantation and pregnancy (FBLN1, IGFBP1, IGFBP7, MMP2, STC1/2, PAPPA), while hCG treatment specifically elevates proteins related to immune system regulation (PRTN2, CXCL12). Additionally, hCG treatment in previously decidualized ESC EVs leads to an increased level of miRNAs such as hsa-miR-340-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-766-5p, hsa-miR-3138, and hsa-miR-3180-5p.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. **Deimantė Žukauskaitė**, Aida Vitkevičienė, Akvilė Žlibinaitė, Raminta Baušytė, Diana Ramašauskaitė, Rūta Navakauskienė; Histone H4 hyperacetylation but not DNA methylation regulates the expression of decidualization-associated genes during induced human endometrial stromal cells decidualization; International Journal of Biochemistry and Cell Biology; 2023; 156:106362; doi: 10.1016/j.biocel.2023.106362.
Poveikio veiksnys (impact factor): 4,0, Q2.
2. **Deimantė Žukauskaitė**, Aistė Zentelytė, Erika Girniūtė, Rūta Navakauskienė. The outcome of tissue cryopreservation on cellular, molecular and epigenetic characteristics of endometrial tissue and stromal cells. Reproductive BioMedicine Online. 2024; 49(2):103990 doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.103990
Poveikio veiksnys (impact factor): 4,0, Q1.
3. **Deimantė Žukauskaitė**, Erika Girniūtė, Rūta Navakauskienė. Evaluation of embryo and endometrium communication through hCG impact on ESC decidualization and changes in epigenetics and extracellular vesicles cargo. Publikacija rengiama.

PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE DISERTACIJOS TEMA

1. **Deimantė Žukauskaitė**, Rūta Navakauskienė. The impact of different inducers for endometrial stromal cells in vitro decidualization. FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies. 2022-06-15 – 2022-06-17, Talinas, Estija
2. **Deimantė Žukauskaitė**, Veronika V. Borutinskaitė, Tetiana Bukreieva, Giedrė Skliutė, Elvina Valatkaitė, Aistė Zentelyte, Lina Piešiniene, Volodymyr Shablii, Rūta Navakauskienė. Assessment of cryopreserved placenta derived mesenchymal stromal cells characteristics International Conference of Life Science The COINS. 2023-04-24 – 2023-04-26. Vilnius, Lithuania.
3. **Deimantė Žukauskaitė**, Erika Girniūtė, Rūta Navakauskienė. Effects of human chorionic gonadotropin on endometrial stromal cells decidualization. International Conference for Students of Physics and Natural Sciences "OPEN READINGS 2023". 2023-04-18 -2023-04-21. Vilnius, Lithuania.
4. Erika Girniūtė, **Deimantė Žukauskaitė**, Rūta Navakauskienė. The Role of human chorionic gonatropin in epigenetic regulation of endometrial stromal cells decidualization. International Conference of Life Science The COINS. 2024-04-15 – 2024-04-18. Vilnius, Lithuania

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė: Deimantė Žukauskaitė

Išsilavinimas:

- 2019 – 2023: Biochemijos mokslo krypties doktorantūra; Vilniaus universitetas, Lietuva
- 2017 – 2019: Molekulinės biologijos magistras; Vilniaus universitetas, Lietuva
- 2013 – 2017: Medicininės ir veterinarinės genetikos bakalauras; Lietuvos Sveikatos Mokslų universitetas, Lietuva

Darbo patirtis:

- 2021 – dabar: Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva
- 2020 – 2021: Mokslo darbuotoja; UAB ThermoFisher Scientific Baltics, Lietuva
- 2018 – 2019: Jaunesnioji mokslo darbuotoja; UAB ThermoFisher Scientific Baltics, Lietuva

Dalyvavimas moksliniuose projektuose:

- „Inovatyvių terapijų ir prognostinių įrankių, skirtų chemoterapijai atsparios ūminės mieloleukemijos gydymui, sukūrimas“ Nr. S-SEN-250-2
- „Pažangios technologijos inovatyviam nevaisingumo gydymui“ Nr.01.2.2-MITA-K-702-12-0004
- „EMBL partnerystės institucija“ Nr.01.2.2-CPVA-V-716-01-0001.

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Rūtai Navakauskienei už suteiktą galimybę studijuoti doktorantūrą ir atlikti mokslinius tyrimus Ląstelės molekulinės biologijos skyriuje. Taip pat labai norėčiau padėkoti Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus esamiems ir buvusiems kolegoms už palaikymą ir visokeriopą pagalbą. Ypatingai ačiū dr. Aistei Zentelytei, dr. Giedrei Valiulienei, dr. Aidai Vitkevičienei, dr. Veronikai V. Borutinskaitei, Giedrei Skliutei ir Elvinai Valatkaitei. Esu dėkinga bakalauro studijų studentėms Erikai Girmiūtei ir Akvilei Žlibinaitei, kurios savo darbais svariai prisidėjo prie šioje disertacijoje aptariamų rezultatų.

PRIEDAI

Priedas Nr. 1. Antikūnai naudoti tėkmės citometrijoje.

Antikūnas	Izotipas	Fluoroforas	Katalogo numeris	Gamintojas
anti-CD31	IgG1, κ	Alexa Fluor 488®	303110	Biolegend, JAV
anti-CD146	IgG1, κ	Alexa Fluor 488®	361016	
Izotipinė kontrolė	IgG1, κ	Alexa Fluor 488®	400132	
anti-CD34	IgG2a, κ	FITC	343604	
Izotipinė kontrolė	IgG2a	FITC	400210	
anti-CD105	IgG1, κ	FITC	323203	
anti-CD73	IgG1, κ	FITC	344015	
Izotipinė kontrolė	IgG1	FITC	400109	
anti-SUSD2	IgG1, κ	APC	327408	
anti-SSEA4	IgG3, κ	APC	330420	
Izotipinė kontrolė	IgG1	APC	400122	
HLA-ABC	IgG2a, κ	Alexa Fluor 488®	311415	
HLA-DR	IgG2a, κ	Alexa Fluor 488®	307656	
Izotipinė kontrolė	IgG2a, κ	Alexa Fluor 488®	400233	
anti-CD166	IgG1, κ	PE	343903	
Izotipinė kontrolė	IgG1	PE	400111	
anti-CD90	IgG1, κ	APC	1A-652-T100	
anti-CD117	IgG1, κ	APC	1A-586-T100	
anti-CD140b	IgG1	APC	1A-590-T100	
Izotipinė kontrolė	IgG1	APC	1A-632-C100	
anti-CD44	IgG2b	FITC	1F-221-T100	
Izotipinė kontrolė	IgG2b, κ	FITC	1P-692-C100	

Priedas Nr. 2. Pradmenys naudoti AT-kPGR analizėje.

Genas	Pradmenų sekos
<i>GAPDH</i>	F' AGTCCCTGCCCACTCAG R' TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG
<i>RPL13A</i>	F' GTTGATGCCTTCACAGCGTA R' AGATGGCGGAGGTGCAG
<i>DNMT1</i>	F' ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA R' GTTGCAGCTCTCTGTGAACACTGTGG

Priedas Nr. 2. Tęsinys

Genas	Pradmenų sekos
<i>DNMT3A</i>	F' CAGCGTCACACAGAAGCATATCC R' GGTCCCTCACTTTGCTGAACTTGG
<i>DNMT3B</i>	F' GACTGGAACGTGCGCCTGCAGGCC R' GAAGCGACGTACTTTTCTACCTTT
<i>HDAC1</i>	F' CAAGCTCCACATCAGTCCTTCC R' TGCGGCAGCATTCTAAGGTT
<i>HDAC2</i>	F' AGTCAACGAGGCGGCAAAA R' TCGGATTCTATGAGGCTTCA
<i>HDAC3</i>	F' CCGAAATGTTGCCCGCTGCTG R' AGGTGCATGGTTCAGCATCTT
<i>HMX3</i>	F' GCCCATCCTCTACCACGAGA R' GTGCGAGTAGTAGACGGGGT
<i>MSX1</i>	F' CCACTCGGTGTCAAAGTGGGA R' GAAGGGGACACTTTGGGCTT
<i>MSX2</i>	F' CCGCCAAGACATATGAGCCC R' GGAGAACTCTGCACGCTCTG
<i>PPARGC1A</i>	F' GCAATTGAAGAGCGCCGTGTGA R' CTGTCTCCATCATCCCGCAGAT
<i>BAX</i>	F' TGCCTCAGGATGCGTCCACCAA R' CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG
<i>BAK1</i>	F' TCATCGGGGACGACATCAAC R' CAAACAGGCTGGTGGCAATC
<i>BCL2</i>	F' CGGAGGCTGGGATGCCTTTG R' TTTGGGGCAGGCATGTTGAC
<i>GPX1</i>	F' CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG R' GAGGGACGCCACATTCTCG
<i>SRC1</i>	F' CATGGTCAGGCAAAAACCTT R' GCTTGCCGATTTTGGTGTAT
<i>EHMT2</i>	F' GGAGGAAGCTGAACTCAGGAGG R' GACTGAAGTCATCACCCACCAC
<i>PCAF</i>	F' CGAATCGCCGTGAAGAAAGC R' CTTGCAGGCGGAGTACACT
<i>SUZ12</i>	F' AGGCTGACCACGAGCTTTTC R' GGTGCTATGAGATCCGAGTTC

Priedas Nr. 2. Tęsinys

Genas	Pradmenų sekos
<i>EED</i>	F' GTGACGAGAACAGCAATCCAG R' TATCAGGGCGTTCAGTGTTTG
<i>PRL</i>	F' TGACCCTTCGAGACCTGTTTG R' CTTGCTCCTTGTCTTCGGG
<i>IGFBP1</i>	F' TTTTACCTGCCAAACTGCAACA R' CCCATTCCAAGGGTAGACGC
<i>IL1B</i>	F' AGATGATAAGCCCACTCTACAG R' ACATTCAGCACAGGACTCTC
<i>IL6</i>	F' ACAGCCACTCACCTCTTCAG R' CCATCTTTTTTCAGCCATCTTT
<i>IL11</i>	F' ATGAACTGTGTTTGCCGCCT R' GGAATCCAGGTTGTGGTCC
<i>FOXO1</i>	F' TCGTCATAATCTGTCCCTACACA R' CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA
<i>WNT4</i>	F' AGGAGGAGACGTGCGAGAAA R' CGAGTCCATGACTTCCAGGT
<i>OCT4</i>	F' ACATGTGTAAGCTGCGGC R' GTTGTGCATAGTCGCTGCTTG
<i>NANOG</i>	F' AGATGCCTCACACGGAGACT R' GTTTGCCTTTGGGACTGGTG
<i>STAT5A</i>	F' CCACGCAGCTCCAGAAAACA R' CGGACCAGCCTCTGTTCATT
<i>HOXA10</i>	F' CAACTGGCTCACGGCAAAGA R' TTCAGTTTCATCCTGCGGTTT
<i>HAND2</i>	F' ATGAGTCTGGTAGGTGGTTTTCC R' CATACTCGGGGCTGTAGGACA
<i>TET1</i>	F' TTCGTCACTGCCAACCTTAG R' ATGCCTCTTTCCTGCGGTG
<i>TET2</i>	F' CCCTTCTCCGATGCTTTCTG R' TGGGTTATGCTTGAGGTGTTT
<i>TET3</i>	F' TCCAGCAACTCCTAGAACTGAG R' AGGCCGCTTGAATACTGACTG

Priedas Nr. 3. Pradmenys naudoti ChIP-kPGR ir MeDIP-kPGR analizėse

Genominė sritis	Pradmenų sekos
<i>WNT4</i> promotorius	F' TCCTCCAATCACAGCGTCT R' GTGGGAATCCGAAACCTCGC
<i>WNT4</i> egzonas	F' AACTGCTCCACACTCGACTC R' TGCTCACGAGCGTCTCATTT
<i>HAND2</i> promotorius	F' TGAGGAGGTAGCCAATCCTG R' AGGGCCGCTCGGGTTAATA
<i>HAND2</i> egzonas	F' CAGCTACATCGCCTACCTCA R' TCTCCTCTTTCACGTCGGTC
<i>FOXO1</i> promotorius	F' GCTCTGCTGCTCCGTAGTAA R' TCTCTCGCCTTCTCAGTGT
<i>FOXO1</i> egzonas	F' TGGAGTACATTTTCGCCCTCG R' AGTAGAGGCCATCTTTGCGG
<i>HOXA10</i> promotorius	F' ATGTGGTCGTAAACCCGTCC R' CAGCCCCTGCTATTGAGAT
<i>HOXA10</i> egzonas	F' AAGAGTGGTCGGAAGAAGCG R' GACGCTGCGGCTAATCTCTA
<i>STAT5A</i> promotorius	F' GGGGCGCTGGCTAGTTTAT R' AAACCTCAACCCTGACGGAGG
<i>STAT5A</i> egzonas	F' CACCCGCAAGTAATTGTGCC R' TGGATGCAAGGACAAAGCGG
<i>GAPDH</i> promotorius	F' TACTAGCGGTTTTACGGGCG R' GGCTGCGGGCTCAATTTATAG
<i>H19</i>	F' GAGCCGCACCAGATCTTCAG R' TTGGTGGAACACACTGTGATCA

Priedas Nr. 4. Antikūnai naudoti *Western Blot* analizei.

Antikūnas	Šaltinis	Katalogo numeris	Gamintojas
anti-β-aktinas	ožka	ab8229	Abcam, JK
anti-GAPDH	pelė	ab8245	
anti-BMI1	pelė	05-637	Milipore, JAV
anti-H3	triušis	06-755	
anti-H3K4Me3	triušis	05-745R	
anti-H3K9Me3	triušis	07-442	
anti-H3K27Me3	triušis	07-449	
anti-H4	triušis	07-108	
anti-H4hyperAc	triušis	06-946	
anti-HP1a	pelė	05-689	
anti-EED	pelė	MA5-16314	Thermo Fisher Scientific, JAV
anti-EZH2	triušis	PA5-29129	
anti-H3K27Ac	triušis	8173	Cell Signalling Technology, JAV
anti-H3K9Ac	triušis	9649	
anti-HDAC1	triušis	2062	
anti-HDAC2	triušis	2540	
anti-SUZ12	triušis	3737	
anti-H4K16Ac	triušis	07-329	Upstate cell signaling solutions, JAV

Priedas Nr. 5. Antikūnai naudoti *Western Blot* analizei EV charakterizavimo metu.

Antikūnas	Šaltinis	Katalogo numeris	Gamintojas
anti-TSG101	triušis	ab125011	Abcam, JK
anti-Alix	triušis	ab88388	
anti-Calnexin	triušis	ab22595	
anti-HSP70	triušis	AF1663-SP	R & D Systems, JAV
anti-Annexin V	ožka	AF399-SP	
anti-CD9	pelė	MAB25292-SP	
anti-CD81	pelė	NB100-65805SS	Novus Biologicals, JAV
anti-Cytochrome C	pelė	NB100-56503SS	
Anti-GM130	triušis	NBP2-53420SS	

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.