https://doi.org/10.15388/vu.thesis.722
https://orcid.org/0009-0004-4183-1895

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Raminta Baušytė

Žmogaus endometriumo kilmės mezenchiminių kamieninių / stromos ląstelių charakteristikos ir jų terapijos galimybių tyrimai vaisingumo sutrikimų *in vivo* modeliuose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2018–2024 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute.
Disertacija tarpkryptinė, rengta Biochemijos (N 004) ir Medicinos (M 001) mokslo krypčių sandūroje.

Mokslinius tyrimus rėmė Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra (MITA) pagal tarptautinės programos „Eureka“ finansuojamą projektą „Pažangios technologijos inovatyviam nevaisingumo gydymui“, Nr. 01.2.2-MITA-K-702-12-0004, 2021-2023.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).
Mokslinė konsultantė – prof. dr. Diana Ramašauskaitė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:
Pirmininkas (-ė) – prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N004).
Nariai:
prof. dr. Daiva Baltriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N004),
prof. dr. Gediminas Čepinskas (Kritinių ligų tyrimo institutas, Kanada, gamtos mokslai, biochemija – N004),
prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M001),
doc. dr. Jolita Zakarevičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. sausio mėn. 31 d. 13:00 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje.
Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10527, Vilnius, Lietuva.
Tel. nr. +370 5 223 44 16; el. paštas info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: *https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius*

https://doi.org/10.15388/vu.thesis.722
https://orcid.org/0009-0004-4183-1895

VILNIUS UNIVERSITY

Raminta Baušytė

Characterization of Human Endometrium-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Therapeutic Application in *In Vivo* Models of Fertility Disorders

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2018 and 2024 at Vilnius University Life Sciences Center, the Institute of Biochemistry.
The dissertation is interdisciplinary at the interface between Biochemistry (N 004) and Medicine (M 001) scientific fields.

The research was supported by the Agency for Science, Innovation and Technology (Lith. Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra, MITA) under the project "Advanced technologies for innovative treatment of infertility" funded by the international program "Eureka", No 01.2.2-MITA-K-702-12-0004, 2021-2023.

Academic Supervisor – Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).
Academic Consultant – Prof. Dr. Diana Ramašauskaitė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

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

Chairman – Prof. Dr. Edita Sužiedėlienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N004).
Members:
Prof. Dr. Daiva Baltriukienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N004),
Prof. Dr. Gediminas Čepinskas (Center for Critical Illness Research, Canada, Natural Sciences, Biochemistry – N004),
Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M001),
Assoc. Prof. Jolita Zakarevičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1:00 p.m. on January 31st, 2025 in Room R-401 of Vilnius University Life Sciences Center.
Address: Saulėtekio av. 7, LT-10527, Vilnius, Lithuania.
Tel. +370 5 223 44 16; e-mail: info@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: *www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendoriu*

TURINYS

SANTRUMPOS 8

ĮVADAS 13

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ 16

1. LITERATŪROS APŽVALGA 18

1.1. Vaisingumo sutrikimų aktualumas 18

1.2. Nevaisingumo apibrėžimas 19

1.3. Vaisingumo sutrikimų statistika 19

1.4. Nevaisingumo priežastys 20

1.5. Vidinis gimdos sienelės sluoksnis – endometriumas 21

1.6. Moters mėnesinių ciklas 24

1.7. Blastocistos stadijos embriono implantacija endometriume 26

1.7.1. Decidualizacija 26

1.7.2. Endometriumo receptyvumas 31

1.8. Medicininė pagalba su endometriumo receptyvumu susijusio nevaisingumo atveju 32

1.9. Mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės 33

1.9.1. Bendrųjų savybių apžvalga 33

1.9.2. Ne endometriumo kilmės MKL vaidmuo koreguojant endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus .. 34

1.9.3. Endometriumo kilmės MKL vaidmuo koreguojant endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus .. 40

1.10. Endometriumo pažaida 43

2. MEDŽIAGOS IR METODAI 46

2.1. Bendroji informacija 46

2.2. Endometriumo audinio ėminių surinkimas 49

2.3. Mėnesinių kraujo ėminių surinkimas 49

2.4. Endometriumo kilmės MKL išskyrimas ir kultivavimas 50

2.5. Endometriumo kilmės MKL charakteristikų vertinimas 53

2.6. Endometriumo kilmės MKL diferenciacija 54

2.7. Genų raiškos vertinimas RT-kPGR metodu 55
2.8. Baltymų išskyrimas ir imunoanalizė *Western blot* metodu 56
2.9. Baltymų nustatymas ir imunofermentinė analizė *ELISA* metodu . 56
2.10. Endometriumo kilmės MKL terapinio poveikio vertinimas *in vivo* tyrime 57
2.10.1. Bendroji informacija 57
2.10.2. Pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, grupė 58
2.10.3. Pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, grupė 61
2.11. Su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės savijautos vertinimas 62
2.12. Statistinė duomenų analizė 63
3. REZULTATAI 64
3.1. Endometriumo kilmės MKL charakterizavimas 64
3.2. Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi įvertinimas 66
3.2.1. Ląstelių morfologija 67
3.2.2. Su decidualizacija susijusių genų raiškos analizė 68
3.2.3. Baltymų PRL ir IGFBP1 koncentracijos pokyčiai 73
3.3. Kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių genų raiškos rezultatai 73
3.4. Angiogenezę reguliuojančių genų raiškos įvertinimas 76
3.5. Ląstelės ciklo ir epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų santykinio lygio analizė 78
3.6. *In vivo* tyrimo rezultatų apžvalga 82
3.6.1. Fibrozės išplitimo įvertinimas pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, grupėje 83
3.6.2. Fibrozės išplitimo analizė pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, grupėje 86
3.6.3. Pelių patelių gimdos rago kitų histologinių pokyčių įvertinimas 87
3.6.4. Savaiminio pastojimo analizė 91

3.6.5. Fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose svarbių genų raiškos pokyčiai 94
3.7. Su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės savijautos ir pastojimo rezultatų sąsajos genų raiškos lygmeniu 96
REZULTATŲ APTARIMAS 102
IŠVADOS 120
REKOMENDACIJOS / ATEITIES TYRIMAI 122
SUMMARY 123
LITERATŪROS SĄRAŠAS 154
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 188
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS 189
PADĖKA 190
GYVENIMO APRAŠYMAS 193

SANTRUMPOS

APC – alofikocianinas (*angl. allophycocyanin*)

Bax – Bcl-2 susijęs X-baltymas (*angl. BCL-2-associated X protein*)

bPR – ląstelės branduolio progesterono receptorius (*angl. nuclear progesterone receptor, nPR*)

BSA – jaučio serumo albuminas (*angl. bovine serum albumin*)

cAMP – ciklinio adenozino monofosfatas *(angl. cyclic adenosine monophosphate*)

CDK – nuo ciklinų priklausoma kinazė (*angl. cyclin-dependent kinase*)

CEBPβ – CCAAT stipriklį surišantis baltymas beta (*angl. CCAAT-enhancer-binding protein beta*)

Che pelių patelių grupė – *in vivo* tyrimo pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, grupė (*angl. the group of female mice affected by chemotherapy, the Che female mice group*)

Che-EndMKL pelių patelių grupė – *in vivo* tyrimo pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija, grupė (*angl. the group of female mice affected by chemotherapy and received EndMSCs-based therapy, the Che-EndMSCs female mice group*)

COX-2 – ciklooksigenazė-2 (*angl. cyclooxygenase-2*)

CRE – cAMP atsako elementas (*angl. cAMP response element*)

CREB – cAMP atsako elementą surišantis baltymas (*angl. cAMP response element-binding protein*)

CRH – kortikotropiną atpalaiduojantis hormonas (*angl. corticotropin-releasing hormone*)

DKK1 – su *Dickkopf* susijęs baltymas 1 (*angl. Dickkopf-related protein 1*)

DMEM/F-12 – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė / mitybinis mišinys F-12 (*angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*)

E2 – 17 beta-estradiolis (*angl. 17 beta-estradiol*)

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis (*angl. ethylenediaminetetraacetic acid*)

Eed – PcG embrioninis ektodermos vystymosi baltymas (*angl. PcG protein embryonic ectoderm development*)

EndMKL – endometriumo kilmės mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės, išskirtos iš endometriumo audinio ėminių (*angl. endometrium-derived MSCs, isolated from samples of endometrial tissue, EndMSCs*)

ER – estrogenų receptorius (*angl. estrogen receptor*)

Ezh2 – *zeste* homologo 2 stipriklis (*angl. enhancer of zeste homolog 2*)

FAF – fibroblastų augimo faktorius (*angl. fibroblast-growth factor, FGF*)

FBS – fetalinis jaučio serumas (*angl. fetal bovine serum*)

FITC – fluoresceino izotiocianatas (*angl. fluorescein isothiocyanate*)

FOXO1 – *Forkhead box* šeimos baltymas O1 (*angl. Forkhead box protein O1*)

FSH – folikulus stimuliuojantis hormonas (*angl. follicle-stimulating hormone*)

GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas (*angl. green fluorescent protein*)

GnRH – gonadotropinus atpalaiduojantis hormonas (*angl. gonadotropin-releasing hormone*)

HDAC1 – histono deacetilazė 1 (*angl. histone deacetylase 1*)

HAD skalė – nerimo ir depresijos sutrikimų vertinimo skalė (*angl. the Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS*)

HAD-D poskalė – HAD skalės dalis, skirta depresijos simptomų vertinimui (*angl. the HADS Depression subscale, HAD-D subscale*)

HAD-N poskalė – HAD skalės dalis, skirta nerimo simptomų vertinimui (*angl. the HADS Anxiety subscale, HAD-A subscale*)

HAND2 – širdies ir nervų keteros dariniais išreikštas baltymas 2 (*angl. heart and neural crest derivatives expressed protein 2*)

HE – hematoksilinas ir eozinas (*angl. hematoxylin and eosin*)

HOXA10 – *Homeobox* baltymas Hox-A10 (*angl. Homeobox protein Hox-A10*)

HRP – krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*)

ICSI – intracitoplazminė spermatozoido injekcija (*angl. intracytoplasmic sperm injection*)

IGF1 – į insuliną panašus augimo faktorius 1 (*angl. insulin-like growth factor 1*)

IGFBP1 – į insuliną panašus augimo faktorių surišantis baltymas 1 (*angl. insulin-like growth factor-binding protein 1*)

Ig – imunoglobulinas (*angl. imunoglobulin*)

IL – interleukinas (*angl. interleukin*)

In vivo – procesas (bandymas, tyrimas), atliekamas arba stebimas gyvame organizme

In vitro – procesas (bandymas, tyrimas), atliekamas arba stebimas ne organizme, bet dirbant sistemoje (pavyzdžiui, mėgintuvėlyje)

IVF – pagalbinis apvaisinimas ne moters kūne savaiminio apvaisinimo būdu (*angl. in vitro fertilization*)

kDNR – kopijinė DNR arba komplementari DNR (*angl. complimentary DNA, cDNA*)

LH – liuteinizuojantis hormonas (*angl. luteinizing hormone*)

LIF – leukemiją slopinantis faktorius (*angl. leukemia inhibitory factor*)

MAPK – mitogenu aktyvuota baltymų kinazė (*angl. mitogen-activated protein kinase*)

Mech pelių patelių grupė – *in vivo* tyrimo pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, grupė (*angl. the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected, the Mech female mice group*)

Mech-EndMKL pelių patelių grupė – *in vivo* tyrimo pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija, grupė (*angl. the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected and received EndMSCs-based therapy, the Mech-EndMSCs female mice group*)

MenMKL – endometriumo kilmės mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės, išskirtos iš mėnesinių kraujo ėminių (*angl. endometrium-derived MSCs, isolated from samples of menstrual blood, MenMSCs*)

MKL – mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės (*angl. mesenchymal stem/stromal cells, MSCs*)

MMP – matricos metaloproteinazės (*angl. matrix metalloproteinases*)

MPA – medroksiprogesterono acetatas (angl. *medroxyprogesterone acetate*)

mPR – ląstelės membranos progesterono receptorius (*angl. membrane progesterone receptor*)

NK ląstelės – ląstelės žudikės, natūralieji kileriai (*angl. natural killer cells, NK cells*)

P4 – progesteronas (*angl. progesteron*)

PBS – buferinis druskos tirpalas (*angl. phosphate-buffered saline*)

PcG – *Polycomb* grupė (*angl. Polycomb-group*)

PDL – populiacijos dvigubėjimo lygis (*angl. population doubling level*)

PFA – paraformaldehidas (*angl. paraformaldehyde*)

PKA – proteino kinazė A (*angl. protein kinase A*)

PMN – polimorfonuklearai (*angl. polymorfonuclear cells, PMNs*)

PR – progesterono receptorius (*angl. progesterone receptor*)

PRC1, PRC2 – *Polycomb* represinis kompleksas 1, kompleksas 2 (*angl. Polycomb repressive complex 1, complex 2*)

PRE – progesterono atsako elementas (*angl. progesterone response element*)

PRL – prolaktinas (*angl. prolactin*)

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija (*angl. the World Health Organization, WHO*)

SD – standartinis nuokrypis (*angl. standart deviation*)

SDS – natrio dodecilsulfatas (*angl. sodium dodecyl sulfate*)

STAT – signalo keitiklis ir transkripcijos aktyvatorius (*angl. signal transducer and activator of transcription*)

Suz12 – *zeste* homologo 12 slopiklis (*angl. suppresor of zeste 12*)

ŠP ląstelės – šoninės populiacijos ląstelės (*angl. side population cells*)

TLTD – Tarptautinė ląstelių terapijos draugija (*angl. the International Society for Cellular Therapy, ISCT*)

TNF-α – naviko nekrozės faktorius alfa (*angl. tumor necrosis factor-αlpha*)

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius (*angl. vascular endothelial growth factor*)

VMVT – Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba (angl. *the State Food and Veterinary Service, SFVS*)

VU GMC – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras (*angl. Vilnius University Life Sciences Center, VU LSC*)

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos (*angl. Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, VUH SK*)

žCG – žmogaus chorioninis gonadotropinas (*angl. human chorionic gonadotropin, hCG)*

ŽLA-DR – žmogaus leukocitų II klasės antigenas DR (*angl. human leukocyte antigen-DR, HLA-DR*)

ĮVADAS

Nevaisingumas – reikšminga sveikatos problema pasauliniu mastu. Naujausiais Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, apytikriai vienas iš šešių reprodukcinio amžiaus asmenų visame pasaulyje bent kartą gyvenime yra susidūręs su tam tikrais vaisingumo sutrikimais (World Health Organization, 2023). Tai yra ne tik lytinės ir reprodukcinės sveikatos patologija, bet ir psichologiniu požiūriu sudėtinga būklė, galinti pakenkti individo savijautai, veikloms, santykiams su aplinka ir būti lydima stigmatizacijos patirties. PSO nevaisingumą įvardija kaip penktą iš pagrindinių globalinių jaunų asmenų negalių (Deshpande & Gupta, 2019).

Pastojimas yra vienas sudėtingiausių ir mažiausiai ištirtų nėštumo laikotarpio etapų, kuriame ypač svarbų vaidmenį atlieka blastocistos stadijos embriono (blastocista – 5–6-ių dienų amžiaus embrionas) implantacija endometriume. Šis unikalus biologinis reiškinys susideda iš kelių pakopų. Pirmiausia, išorinės blastocistos ląstelės – trofoblastai prisitvirtina prie vidinio gimdos gleivinės sluoksnio, gimdos gleivinės – endometriumo paviršiaus, palaipsniui į jį įsiskverbia ir galiausiai suformuoja kraujagyslių tinklą su pamatiniu endometriumo sluoksniu, sudarydami pagrindą placentai susiformuoti (Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020).

Sėkminga embriono implantacijos endometriume eiga yra gerai organizuotų procesų, apimančių endokrininės ir imuninės sistemos veikimą, ląstelių adheziją, invaziją bei migraciją, ir genų bei juos reguliuojančių veiksnių sąveikos bendras rezultatas, kartu išliekant ir individualios kiekvieno iš jų raiškos svarbai. Ypač pabrėžtina – blastocistos stadijos embriono kokybinių rodiklių, endometriumo decidualizacijos ir receptyvumo bei embriono ir endometriumo sinchronijos įtaka (Gellersen & Brosens, 2014; Shaodi *et al.*, 2020).

Analizuojant dar giliau reikia pasakyti, kad nors ilgą laiką didžiausia reikšmė buvo skiriama blastocistos kokybiniams rodikliams, naujausi preimplantacinių genetinių tyrimų rezultatų parodė, kad pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo metu perkėlus euploidinę blastocistą (euploidinė blastocista – blastocista, turinti normalų chromosomų skaičių), pastojimo tikimybė yra tik apie 50 proc. (Craciunas *et al.*, 2019; Casper, 2020). Taigi, šie duomenys ne tik patvirtino, kad su vaisingumu susiję endometriumo morfologijos ir molekuliniai pokyčiai vis dar nėra iki galo aiškūs, bet ir paskatino naujo požiūrio formavimąsi, intensyvesnius endometriumo charakteristikos bei vaidmens tyrimus reprodukcinės medicinos kontekste. Kartu sutarus, kad patologiniai anatominiai ir (arba) funkciniai endometriumo kitimai blastocistos implantacijos jame metu

reikšmingai lemia arba bent prisideda prie vaisingumo sutrikimų ir nepalankių nėštumo baigčių, itin svarbi tapo laiku atlikta ir efektyvi jų korekcija.

Iki šiol pagrindiniai aptariamų klinikinių situacijų medicininiai sprendimai, atsižvelgiant į jas sukėlusias priežastis, taikomas gydymo metodikas ir rekomendacijas, asmens ir (arba) poros reprodukcinius lūkesčius, finansines galimybes, sutikimą bei įstatyminį teisinį reguliavimą, yra medikamentų, vitaminų ir maisto papildų skyrimas, specialių invazinių procedūrų atlikimas, chirurginis gydymas, pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūros, surogacija ir sveikos gyvensenos formavimas, neretai šias priemones derinant tarpusavyje (AAGL Practice Report, 2017; Santamaria *et al.*, 2020; Makrigiannakis *et al.*, 2021). Apibendrinant, atrodytų, kad turima nemažai įvairių galimybių, tačiau jas lydi gausi medicinos specialistų ir pacientų kritika: kai kurie gydymo metodai yra siejami su dideliu asmeninių finansų poreikiu, daliai asmenų ir (arba) porų jie yra nepriimtini dėl pasaulėžiūros bei įsitikinimų, rezultatai – ganėtinai išsibarstę, išlieka rizikų ir komplikacijų tikimybė. Galiausiai, dažnu atveju tai nesprendžia fundamentinių klausimų, susijusių su nevaisingumo išsivystymu bei nepalankiomis nėštumo baigtimis. Atsižvelgiant į šias priežastis, nuolat ieškoma efektyvesnių ir priimtinesnių medicinos pagalbos galimybių.

Teigiami kamieninių ląstelių terapijos rezultatai kaulų čiulpų transplantacijos, odos ir akių ligų atvejais, ortopedijos ir traumatologijos srityje paskatino pradėti tyrimus dėl galimybių ją taikyti endometriumo patologijos sukeltiems vaisingumo sutrikimams gydyti. Daugiausia dėmesio dėl aukšto daugiakryptės diferenciacijos, savaiminio atsinaujinimo, ilgalaikės proliferacijos ir parakrininio aktyvumo potencialo, imunomoduliuojančio veikimo bei etinių dilemų sulaukia mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės (MKL).

Šiuo metu labiausiai žinomi ir geriausiai ištirti MKL šaltiniai yra kaulų čiulpai, riebalinis audinys, virkštelės kraujas ir placenta, tačiau vykstant sparčiai mokslo pažangai vis daugiau tyrimų rezultatų rodo, kad endometriumo kilmės MKL galėtų būti daug žadantis tiek endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo korekcijos, tiek apskritai autologinės regeneracinės medicinos šaltinis (Abuwala & Tal, 2021). Ypač daug dėmesio skiriama šio tipo MKL išskyrimui iš mėnesinių kraujo ėminių, charakterizavimo ir panaudojimo tyrimams dėl galimybės santykinai lengvai, mažomis sąnaudomis surinkti didelius ląstelių kiekius, kartu išvengiant invazinių procedūrų. Visgi, prieš endometriumo kilmės MKL terapiją diegiant į rutininę vaisingumo sutrikimų korekcijos klinikinę praktiką, išlieka būtinybė atsakyti į tokius reikšmingus klausimus, kaip jų heterogeninės ir

imunogeninės savybės, galimybė diferencijuoti, proliferuoti ir išlaikyti genominį bei epigenetinį stabilumą.

Darbo tikslas – įvertinti žmogaus endometriumo kilmės MKL molekulines savybes ir jų terapijos galimybes vaisingumo sutrikimų *in vivo* modeliuose.

Darbo uždaviniai:

1. atrinkti moteris pagal suformuotus kriterijus, kurių endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminiai bus teikiami endometriumo kilmės MKL išskirti ir toliau analizuoti;
2. charakterizuoti iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtas ląsteles pagal standartizuotus MKL apibrėžimo kriterijus;
3. įvertinti ir palyginti iš skirtingų šaltinių išskirtų endometriumo kilmės MKL – EndMKL ir MenMKL proliferacijos ir diferenciacijos decidualine kryptimi potencialą;
4. ištirti endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi vykstančius genų raiškos, epigenetinio modifikavimo ir baltymų santykinio lygio pokyčius;
5. nustatyti endometriumo kilmės MKL terapijos poveikį endometriumui, blastocistos stadijos embriono implantacijai endometriume ir nėštumo vystymuisi skirtinguose endometriumo patologijos *in vivo* modeliuose;
6. įvertinti su nevaisingumu susiduriančių moterų psichologinės sveikatos įtaką vaisingumo sutrikimams ir joms atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų rezultatams genų raiškos lygmeniu.

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

MKL naudojimas endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo ir kitų vaisingumo sutrikimų etiopatogenezės moksliniuose tyrimuose, jų terapijos taikymo galimybių analizė tampa vis dažnesnėmis kryptimis, tačiau dar kelia daug iššūkių, stokojama tyrimų nuoseklumo ir rezultatų aiškumo. Ypač tai aktualu kalbant apie vieną kol kas mažiausiai ištirtų MKL tipų – endometriumo kilmės MKL.

Doktorantūros studijų metu atliktuose eksperimentiniuose darbuose endometriumo kilmės MKL charakteristika ir terapinės savybės buvo tirtos vadovaujantis daugiadalykiu požiūriu, pažingsniui nuo pradinio etapo – moters endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių, kaip galimų MKL šaltinių, surinkimo iki galutinio etapo – išskirtų bei identifikuotų endometriumo kilmės MKL panaudojimo endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo korekcijai *in vivo* modeliuose. Tai yra pirmasis tokio pobūdžio mokslinių tyrimų ciklas Lietuvoje. Kartu pažymėtina, kad gauti rezultatai bei suformuotos įžvalgos papildo ir tarptautinių mokslinių tyrimų duomenis.

Pirma, atliktų mokslinių tyrimų rezultatai išsklaido tarptautinėje ir nacionalinėje erdvėse vis pasirodydavusias abejones dėl endometriumo pažaidos (*angl. endometrial scratching*) metodo naudojimo endometriumo kilmės MKL išskyrimui skirtiems ėminiams paimti, patvirtinant, kad šios ląstelės yra išsidėsčiusios ir funkciniame endometriumo sluoksnyje. Antra, turimomis žiniomis, tai yra pirmasis tyrimas Lietuvoje, kurio metu įrodyta, kad iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės pasižymi 2006 m. Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos (TLTD) pasiūlytais standartizuotais MKL apibrėžimo kriterijais (Dominici *et al.*, 2006). Abiems atvejais patvirtina, kad moterų, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas, ir moterų, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų, endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminiai yra tinkami endometriumo kilmės MKL išskyrimui ir tolesnei analizei. Trečia, atlikti moksliniai tyrimai leidžia papildyti žinias apie tokias pagrindines endometriumo kilmės MKL savybes, kaip proliferacijos ir diferenciacijos potencialas, genominis ir epigenetinis stabilumas, heterogeniškumas bei imunogeninis poveikis. Ketvirta, suformuotas naujas šios srities tyrimų modelis, sujungiantis endometriumo morfologinių pokyčių, genų raiškos bei savaiminio nėštumo užsimezgimo galimybių vertinimą skirtinguose endometriumo patologijos *in vivo* modeliuose, priklausomai nuo endometriumo kilmės MKL terapijos skyrimo, o gauti rezultatai sudaro prielaidas šių ląstelių klinikiniams tyrimams atitinkamame kontekste. Penkta, atlikto žvalgomojo mokslinio tyrimo rezultatai pateikia tendencijas, kad

neigiami moterų psichologinai išgyvenimai (nerimas) galėtų būti ne tik nevaisingumo pasekmė, bet ir priežastinis vaisingumo sutrikimų išsivystymo bei pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų rezultatų veiksnys.

Apibendrinant, atliktų mokslinių tyrimų rezultatai patvirtina endometriumo kilmės MKL – endometriumo kilmės mezenchiminių kamieninių / stromos ląstelių, išskirtų iš endometriumo audinio ėminių (EndMKL), ir endometriumo kilmės mezenchiminių kamieninių / stromos ląstelių, išskirtų iš mėnesinių kraujo ėminių (MenMKL), – terapijos taikymo potencialą koreguoti endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus, šių ląstelių naudojimą kituose eksperimentiniuose nevaisingumo srities modeliuose ir sudaro pagrindą kurti naujus biotechnologijos sprendimus bei vystyti ankstesniuosius. Ne mažiau svarbu paminėti, kad doktorantūros studijų metais taip pat buvo išryškintas nevaisingumo problemos įvairialypiškumas ir daugiadalykės specialistų komandos bendradarbiavimo būtinybė siekiant optimalių vaisingumo sutrikimų diagnostikos bei gydymo rezultatų.

Ginamieji teiginiai:

1. Endometriumo pažaida ir mėnesinių kraujo surinkimas yra metodologiškai tinkamos procedūros paimti ėminius, skirtus endometriumo kilmės MKL išskirti.
2. EndMKL ir MenMKL atitinka standartizuotus MKL apibrėžimo kriterijus.
3. EndMKL ir MenMKL pasižymi panašiu ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos decidualine kryptimi potencialu.
4. Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi metu vykstantys genų, siejamų su decidualizacija (*PRL*, *ESR1*, *IGFBP1* ir *FOXO1*), raiškos, ir baltymų, siejamų su ląstelės ciklo reguliavimu (p53 ir p21), santykinio lygio pokyčiai turi įtaką endometriumo decidualizacijai, receptyvumui ir galiausiai vaisingumo sutrikimų išsivystymui.
5. Endometriumo kilmės MKL terapija yra efektyvi endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo atveju *in vivo* modeliuose.
6. Moterų jaučiamas nerimas yra ne tik pasekmė, bet kartu ir galimas priežastinis vaisingumo sutrikimų išsivystymo bei pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų rezultatų veiksnys.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Vaisingumo sutrikimų aktualumas

Vaisingumo sutrikimai – sveikatos problema, paliečianti milijonus vaisingo amžiaus žmonių visame pasaulyje. Nevaisingumas yra ne tik lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimas. Jis gali reikšmingai neigiamai paveikti asmens ir (arba) poros psichologinę savijautą, emocinę gerovę, sociokultūrinius veiksnius ir ryšius, netgi ekonominį stabilumą (Vioreanu, 2021; Bagade *et al.*, 2022; A. Sharma & Shrivastava, 2022; Shayesteh-Parto *et al.*, 2023). Dėl šių priežasčių vaisingumo sutrikimai yra įvardijami gyvenimo krizės sąvoka (Hasanpoor-Azghdy *et al.*, 2014), o PSO jaunų asmenų nevaisingumą nurodo kaip penktą svarbiausią globalinę negalią (Deshpande & Gupta, 2019).

Nevaisingumo temos kontekste ypač pažeidžiamos yra moterys. PSO duomenimis, moterys, kurios susiduria su vaisingumo sutrikimais, dažniau tampa įvairių tipų smurto ir socialinių stigmų aukomis, turi žemą savivertę, išsiskiria su partneriu, patiria stresą, nerimą, depresiją. Analizuojant psichologinės sveikatos aspektą detaliau, *Ramezanzadeh* su kolegomis atlikto mokslinio tyrimo rezultatai parodė, kad net 87 proc. vaisingumo sutrikimų turinčių moterų susiduria su nerimu, o beveik 41 proc. moterų – su depresija (Ramezanzadeh *et al.*, 2004). Vėlesnių mokslinių tyrimų duomenimis, su nevaisingumu susiduriančių moterų populiacijoje nerimo lygis svyruoja nuo 25,2 proc. iki 36,17 proc., o depresijos – apie 31,3 proc. (Kiani *et al.*, 2021; L. Wang *et al.*, 2023).

Kita vertus, yra keliamos hipotezės, kad neigiamos emocijos ir psichologinės sveikatos sutrikimai bei ligos savaime gali padidinti nevaisingumo ir tokių nepageidaujamų nėštumo baigčių, kaip kartotiniai blastocistos implantacijos endometriume sutrikimai, kartotiniai savaiminiai persileidimai, dažnį (Qu *et al.*, 2017; Y. Wang *et al.*, 2021). Įvairių epigenetinių veiksnių poveikį perinataliniu laikotarpiu nagrinėjančių mokslinių tyrimų duomenimis, asmenų jaučiamas nerimas ir (arba) jiems diagnozuota depresija gali lemti arba bent prisidėti prie tam tikrų su vaisingumo sutrikimais siejamų genų raiškos pokyčių (Litzky & Marsit, 2019).

Apibendrinant pirmiau pateiktą informaciją, galima teigti, kad vaisingumo sutrikimai biopsichosocialiniu požiūriu yra reikšminga ir sudėtinga problema, kurios supratimui, tinkamam įvertinimui ir galimai korekcijai yra būtinas įvairiakryptis veikimas.

1.2. Nevaisingumo apibrėžimas

Nevaisingumas yra liga, kai mažiausiai per 12 mėnesių, turint reguliarius lytinius santykius ir nenaudojant apsisaugojimo nuo nėštumo priemonių, nėra pasiekiamas klinikinis nėštumas (klinikinis nėštumas – ultragarsinio tyrimo metodu patvirtintas nėštumas, kai yra nustatomas vienas arba daugiau gestacinių maišų gimdos ertmėje ir (arba) ektopinėje (ne gimdos ertmėje) padėtyje), arba sveikatos sutrikimas, darantis neigiamą įtaką susilaukti palikuonių vienam arba su partneriu (partnere) (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

Tais atvejais, kai moteris yra ≥ 35 metų amžiaus arba jau iš anksto yra žinoma apie priežastis, galinčias sukelti vaisingumo sutrikimus, į reprodukcinės medicinos specialistą reikėtų kreiptis nepastojant 6 mėnesius (Pfeifer *et al.*, 2017). Jei moteris yra vyresnė nei 40 metų amžiaus, tokia konsultacija rekomenduojama dar prieš nėštumo planavimą.

1.3. Vaisingumo sutrikimų statistika

Tarptautiniai statistiniai vaisingumo sutrikimų rodikliai yra pakankamai išsibarstę dėl šalių naudojamų skirtingų duomenų rinkimo ir (arba) apdorojimo metodologijų, visgi, tam tikros apibendrinančios informacijos esama.

Naujausiais PSO duomenimis, apytikriai vienas iš šešių arba nuo 12,6 proc. iki 17,5 proc. vaisingo amžiaus asmenų visame pasaulyje bent kartą gyvenime yra susidūrę su tam tikrais vaisingumo sutrikimais (World Health Organization, 2023). Turima informacija rodo, kad kasmet visame pasaulyje yra atliekama apie 2–3,5 milijono pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų, o jų dažnis išsivysčiusiose šalyse pastaraisiais metais vidutiniškai padidėjo nuo 5 proc. iki 10 proc. (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) *et al.*, 2023). Atitinkamai skaičiuojama, kad nuo 1978 m. liepos 25 d., kai pasaulį išvydo pirmasis IVF kūdikis – *Louis Brown* (*Royal Oldham Hospital*, Oldamas, Didžioji Britanija), iki 2022 m. visame pasaulyje jau yra gimę ≥ 10 mln. gyvų naujagimių po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne savaiminio apvaisinimo būdu / atliekant intracitoplazminę spermatozoido injekciją (IVF/ICSI) gydymo ciklų (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) *et al.*, 2023). Belgijoje, Čekijoje, Danijoje, Estijoje ir Islandijoje daugiau nei 4 proc. visų naujagimių gimsta po šių procedūrų (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the

European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) *et al.*, 2023). Nacionalinė Lietuvos situacija yra panaši keliais aspektais.

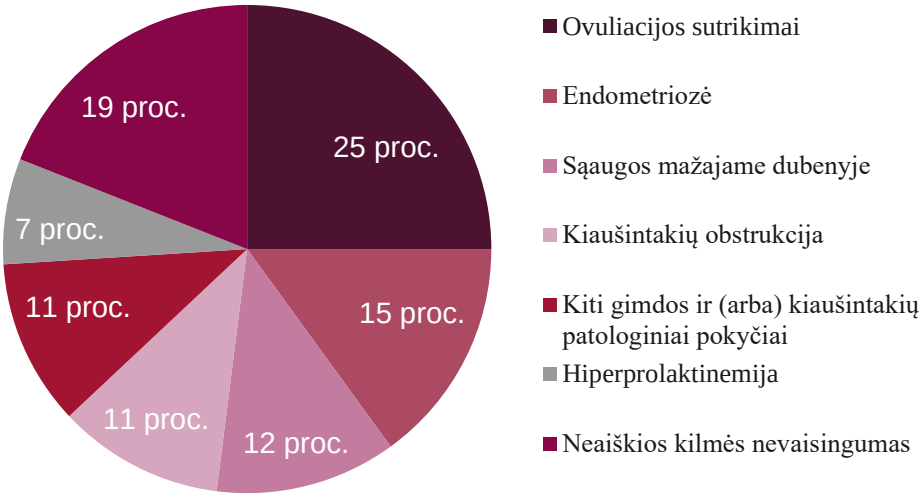
Remiantis turima statistine informacija, skaičiuojama, kad su tam tikrais vaisingumo sutrikimais bent vieną kartą gyvenime yra susidūrę apie 10–15 proc. mūsų šalies vaisingo amžiaus suaugusiųjų populiacijos (Klimas *et al.*, 2019; Pfeifer *et al.*, 2017). Higienos instituto duomenimis, 2016 m. Lietuvoje užregistruota 3 138 moters ir 210 vyro nevaisingumo atvejų (Higienos institutas, 2016). Naujausiais Valstybinės ligonių kasos (VLK) prie Sveikatos apsaugos ministerijos (SAM) duomenimis (2017 m. kovo 1 d. – 2020 m. gruodžio 31 d.), Lietuvoje po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų gimė 1 575 naujagimiai, kurie sudarė apie 1,5 proc. visų šiuo laikotarpiu gimusių gyvų naujagimių (Valstybinė ligonių kasa prie Sveikatos apsaugos ministerijos, 2023). Visgi, būtina pripažinti, kad Lietuvoje irgi susiduriama su vaisingumo sutrikimų paplitimo, nevaisingumo diagnostikos bei gydymo paslaugų duomenų rinkimo ir apdorojimo problemomis, todėl pateikiama informacija gali nepakankamai tiksliai atspindėti esamą realią situaciją.

1.4. Nevaisingumo priežastys

Pastojimas ir vaisiaus išnešiojimas iki gyvo naujagimio gimimo – daugelio veiksnių reguliuojami procesai, todėl vaisingumo sutrikimų priežastys yra įvairios.

Apibendrintai teigiama, kad nuo 25 proc. iki 30 proc. nevaisingumo atvejų sukelia moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimai, nuo 20 proc. iki 30 proc. atvejų – vyrų lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimai, nuo 25 proc. iki 40 proc. atvejų – abiejų partnerių lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimai ir nuo 10 proc. iki 20 proc. atvejų yra neaiškios kilmės (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) *et al.*, 2023).

Analizuojant moterų vaisingumo sutrikimų priežastis detaliau, yra išskiriamos septynios pagrindinės jų grupės (Walker & Tobler, 2022) (1 pav.):



1 paveikslas. Moterų nevaisingumo priežastys. Pagal Walker & Tobler, 2022.

Moterų nevaisingumo priežastys, susijusios su gimdos patologija, apima anatominius ir funkcinius gimdos ir (arba) endometriumo pokyčius, kurie, savo ruožtu, gali reikšmingai sutrikdyti blastocistos stadijos embriono implantaciją jame (Smikle *et al.*, 2023). Nepaisant per pastaruosius kelis dešimtmečius įvykusios sparčios vaisingumo sutrikimų gydymo pažangos, implantacijos sutrikimai išlieka svarbiu jo sėkmę ribojančiu veiksniu.

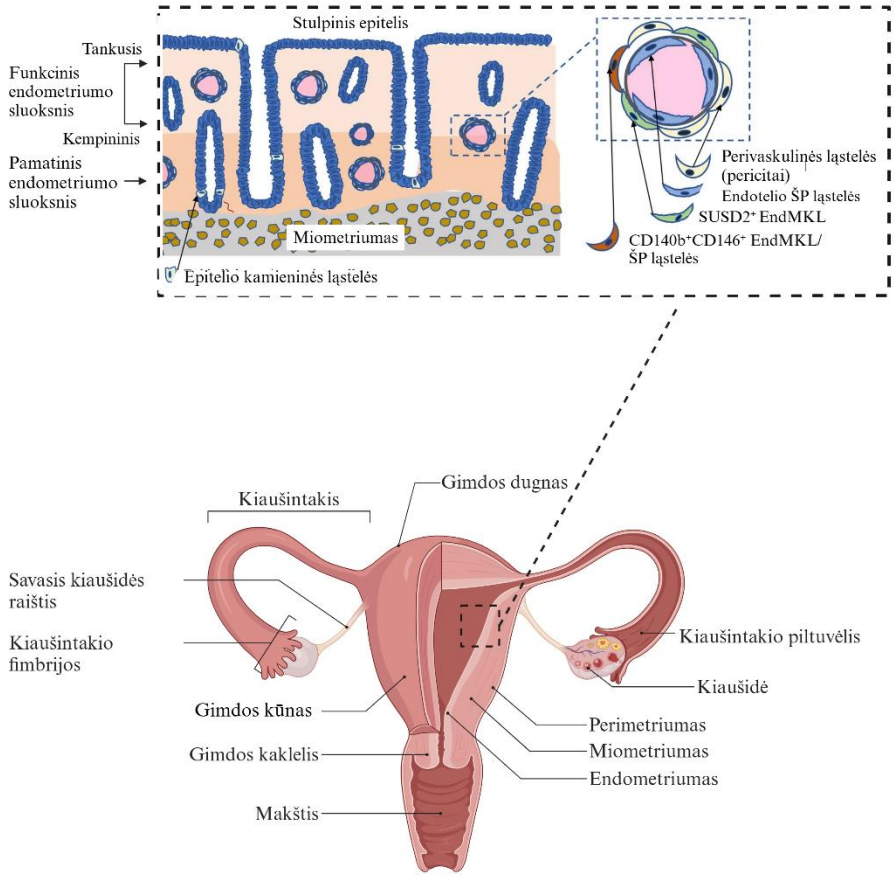
Šiuolaikinėje klinikinėje praktikoje, kai preimplantacinė genetinė diagnostika suteikia galimybę identifikuoti ir į apvaisinamos moters gimdos ertmę selektyviai perkelti euploidinį blastocistos stadijos embrioną, skaičiuojama, kad endometriumo patologija gali būti susijusi su 50–75 proc. blastocistos implantacijos sutrikimų atvejų (Craciunas *et al.*, 2019; Casper, 2020).

1.5. Vidinis gimdos sienelės sluoksnis – endometriumas

Endometriumas – vidinis gimdos sienelės sluoksnis, arba gleivinė, kurią dengia vienasluoksnis stulpinis epitelis. Jis yra sudarytas iš dviejų sluoksnių (Giri *et al.*, 2021; Kong *et al.*, 2021) (2 pav.):

1. funkcinio sluoksnio, kurio storis svyruoja nuo 1–4 mm mėnesinių kraujavimo metu iki 16–18 mm sekrecijos fazės metu (lot. *stratum funcionale*);

2. pamatinio sluoksnio, kurio storis mėnesinių ciklo metu išlieka pastovus, apie 1 mm (lot. *stratum basale*).



2 paveikslas. Gimda ir jos priklausiniai, endometriumo kilmės MKL išsidėstymas. CD140b⁺CD146⁺EndMKL, SUSD2⁺EndMKL – endometriumo kilmės MKL, išsidėsčiusios funkciniame ir pamatiniame endometriumo sluoksniuose, už kraujagyslių ribų. ŠP ląstelės – šoninės populiacijos ląstelės. Pagal Kong *et al.*, 2021. Adaptuota ir modifikuota, naudojant *Biorender.com.*

Funkcinis endometriumo sluoksnis reguliariai kinta moters mėnesinių ciklo metu ir pasišalina mėnesinių kraujavimo metu. Jis yra sudarytas iš dviejų sluoksnių (Heremans *et al.*, 2021):

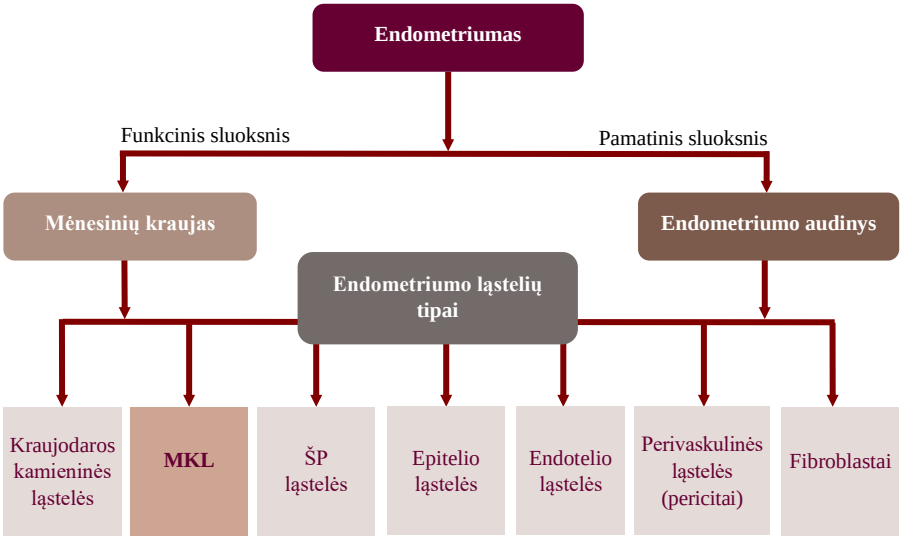
1. tankiojo sluoksnio (lot. *stratum compactum*) – arčiausiai gimdos ertmės esančios funkcinio endometriumo sluoksnio dalies. Jį sudaro paviršinio epitelio ląstelės, paviršinės kraujagyslės, viršutinės gimdos liaukų dalys, santykinai tanki stroma;
2. kempininio sluoksnio (lot. *stratum spongiosum*) – giliau už tankųjį sluoksnį esančios funkcinio endometriumo sluoksnio

dalies, sudarytos iš pagrindinių gimdos liaukų dalių ir kraujagyslių. Stromos ląstelės yra išsidėsčiusios rečiau ir yra didesnės nei tankiajame sluoksnyje.

Pamatinis endometriumo sluoksnis nekinta moters mėnesinių ciklo metu ir yra funkcinio endometriumo sluoksnio atsinaujinimo šaltinis. Jame yra išsidėsčiusios gimdos liaukų pamatinės dalys, tanki stroma, stambiosios kraujagyslės ir limfocitų sankaupos.

Kamieninės ląstelės, šoninės populiacijos (ŠP) ląstelės bei jų nišos yra išsidėsčiusios funkciniame ir pamatiniame endometriumo sluoksniuose. Niša – speciali mikroaplinka *in vitro* arba *in vivo*, kurioje susidaro tam tikros sąlygos ir specifinės cheminės bei fizinės jungtys, reikalingos kamieninių ląstelių savaiminiam atsinaujinimui, proliferacijai ir (arba) diferenciacijai (Z. Zhao *et al.*, 2022; Farahzadi *et al.*, 2023).

Apibendrinta endometriumo ląstelių tipų įvairovė pateikta 3 pav. (Somasundaram, 2016).



3 paveikslas. Endometriumo ląstelių pasiskirstymas. MKL – mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės. ŠP ląstelės – šoninės populiacijos ląstelės. Pagal Somasundaram, 2016.

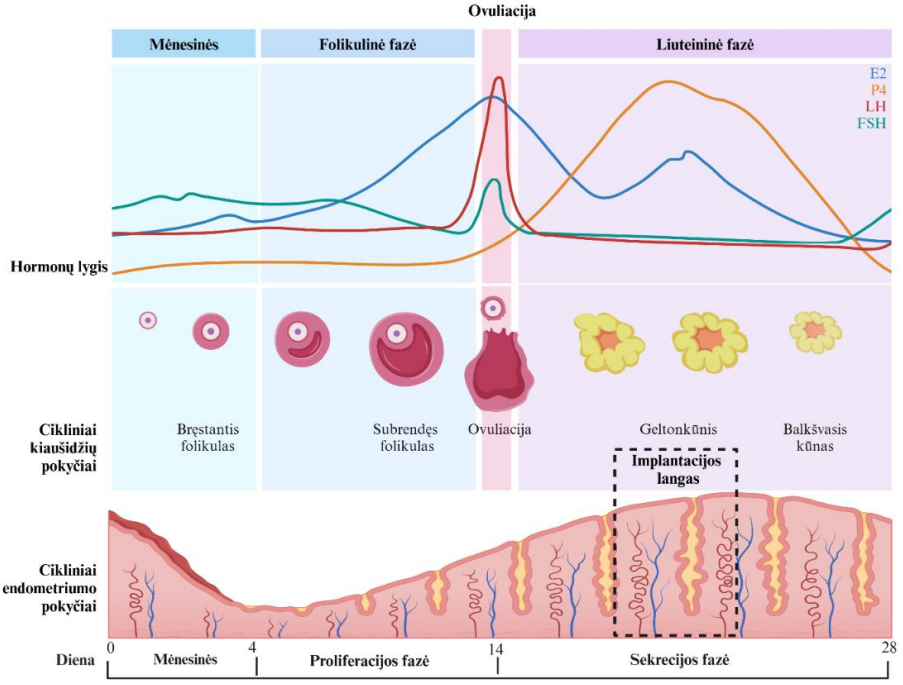
Endometriumas sudaro pagrindą blastocistos implantacijai ir placentos vystymuisi nėštumo metu, o jo pokyčiai yra glaudžiai susiję su moters mėnesinių ciklu.

1.6. Moters mėnesinių ciklas

Moters mėnesinių ciklo vidutinė trukmė yra 28 dienos (galimas svyravimas – 21–35 dienos). Jis yra skaičiuojamas nuo pirmos mėnesinių ciklo dienos iki kitų mėnesinių pirmos dienos ir skirstomas, remiantis (4 pav.):

1. cikliniais kiaušidžių veiklos pokyčiais: folikulinė fazė (0–13-a diena) – ovuliacija (14-a diena) – liuteininė fazė (15–28-a diena);
2. cikliniais endometriumo pokyčiais: mėnesinės (0–5-a diena) – proliferacijos fazė (6–13-a diena) – sekrecijos fazė (14–28-a diena).

Ciklinę endometriumo kaitą reguliuoja pogumburio, hipofizės, kiaušidžių ir iš dalies kitų organų gaminamų bei išskiriamų hormonų koncentracijų svyravimai, o endometriumo epitelio ir stromos ląstelės yra pagrindiniai parakrininių signalų taikiniai šio audinio proliferacijos ir diferenciacijos procesuose.



4 paveikslas. Mėnesinių ciklo pokyčiai, atsižvelgiant į lytinių hormonų – E2, P4, LH ir FSH, pokyčius moters organizme. E2 – 17β-estradiolis, P4 – progesteronas, LH – liuteinizuojantis hormonas, FSH – folikulus stimuliuojantis hormonas. Sukurta naudojant *Biorender.com.*

Kiekvieną moters vaisingo gyvenimo (15–49 gyvenimo metais) mėnesį, išskyrus nėštumą, įgimtus arba įgytus sveikatos sutrikimus bei

laikotarpius, kai vartojami tam tikri vaistai ir (arba) kitos medžiagas, vyksta mėnesinių kraujavimas, kurio metu funkcinis endometriumo sluoksnis atkrinta ir pasišalina (iš viso 400–500 kartų per moters reprodukcinį gyvenimą). Pasibaigus mėnesinių ciklo kraujavimui, iki folikulinės mėnesinių ciklo fazės pabaigos (6–13-ą mėnesinių ciklo dienomis), dėl organizme didėjančios estrogenų (aktyviausia hormonų estrogenų forma – 17β-estradiolis, E2), kuriuos gamina ir išskiria kiaušidžių folikulų grūdėtosios ląstelės, koncentracijos endometriumas yra visiškai atkuriamas, dalyvaujant kamieninėms ląstelėms (Salamonsen *et al.,* 2021). Šiuo laikotarpiu endometriumo ląstelės proliferuoja, didėja liaukos, formuojasi naujas kraujagyslių tinklas (angiogenezė) ir užląstelinė matrica. 14-ą mėnesinių ciklo dieną E2 koncentracijai pasiekus piką, įvyksta ovuliacija, po kurios intensyviai pradeda didėti hormono progesterono (P4) kiekis moters organizme. Pasikeitęs hormonų balansas skatina endometriumo ląstelių diferenciaciją decidualizacijos kryptimi, naujai susiformavusių kraujagyslių vystymąsi. Dėl minėtų procesų įtakos 5–7-ą (± 1 d.) dienomis po ovuliacijos, arba apytikriai 19–24-ą (± 1 d.) mėnesinių ciklo dienomis, yra pasiekiamos optimalios sąlygos blastocistos implantacijai endometriume (endometriumas tampa receptyvus) ir atveriamas vadinamasis implantacijos langas (*angl. the window of implantation, WOI*).

Implantacijos langas – palankiausias laikas įvykti blastocistos stadijos embriono implantacijai endometriume, o galiausiai – sėkmingam nėštumo užsimezgimui ir tolesniam vystymuisi (Lessey, 2011; Salamonsen & Dimitriadis, 2022) (4 pav.). Vidutinė jo trukmė yra 24–36 val. (Ng *et al.,* 2020). Šiuo laikotarpiu veikia daug signalinių kaskadų, skirtų palengvinti tiek blastocistos prisitvirtinimą prie endometriumo paviršiaus bei invaziją į jį, tiek endometriumo stromos ląstelių migraciją blastocistos implantacijos vietos link. Individualūs skirtumai tarp moterų, tam tikri jų sveikatos sutrikimai ir ligos, pavyzdžiui, endometriozė, gali paveikti implantacijos lango charakterstikas. Remiantis mokslinių tyrimų duomenimis, nuo 20 proc. iki 30 proc. vaisingumo sutrikimų turinčių moterų yra būdingi implantacijos lango poslinkiai ir (arba) trukmės pokyčiai.

Jei nėštumas neužsimezga, moters organizme nėra pradedama hormono žmogaus chorioninio gonadotropino (žCG) gamyba, todėl reikšmingai sumažėja E2 ir P4 koncentracijos, tokiu būdu sukeliama kontroliuojama uždegiminė audinių reakcija, funkcinio endometriumo sluoksnio atsisluoksniavimas ir galiausiai prasideda mėnesinių kraujavimas (Evans *et al.*, 2016; d'Hauterive *et al.,* 2022).

1.7. Blastocistos stadijos embriono implantacija endometriume

Blastocistos stadijos embriono implantacija endometriume yra vienas griežčiausiai reguliuojamų žmogaus organizmo procesų. Jo eigą lemia tiek individualios endokrininės ir imuninės sistemos veikimo, blastocistos trofoblasto ląstelių prisitvirtinimo prie endometriumo paviršiaus ir invazijos jame, endometriumo ląstelių diferenciacijos, proliferacijos ir migracijos bei genų raiškos ir ją reguliuojančių veiksnių savybės, tiek koordinuotas jų tarpusavio veikimas.

Pagrindiniais blastocistos implantacijos endometriume reguliaciniais veiksniais yra įvardijami blastocistos stadijos embriono kokybiniai rodikliai, endometriumo decidualizacija ir receptyvumas bei embriono ir endometriumo sinchronija (Gellersen & Brosens, 2014; Shaodi *et al.*, 2020).

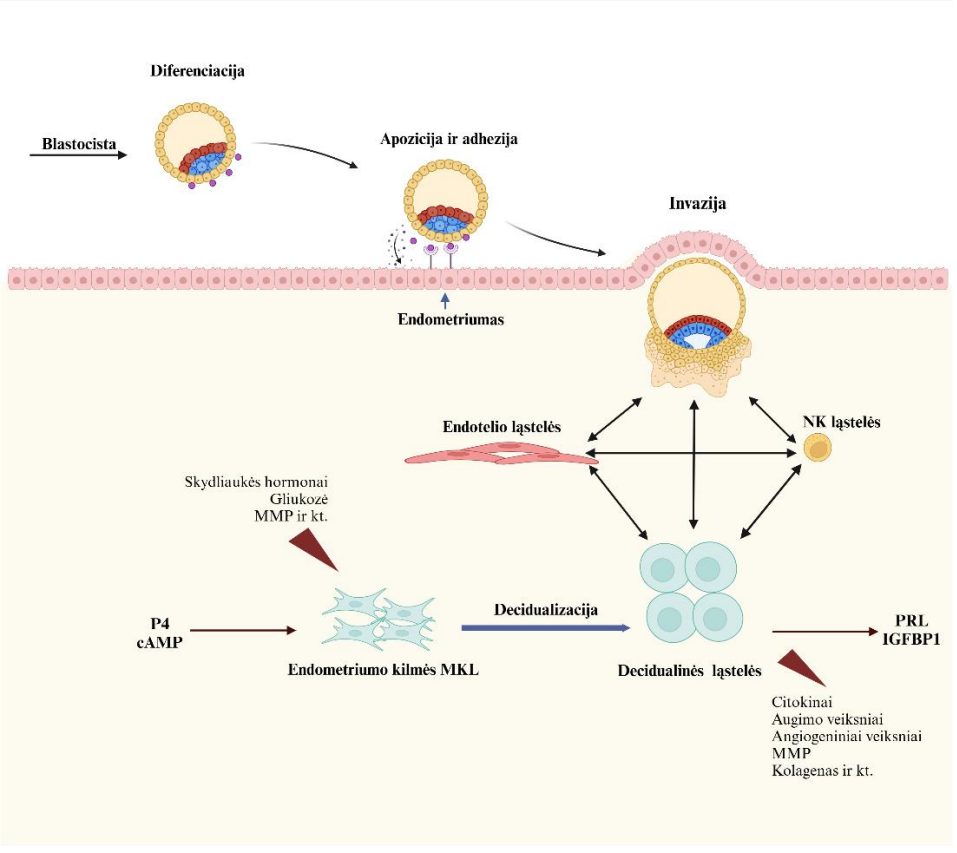
Atsižvelgiant į bendrai žinomą reikšmingą endometriumo poveikį implantacijos procesui ir studijuojant doktorantūroje vykdytų mokslinių tyrimų kryptis, šis procesas toliau bus aptartas remiantis su endometriumu susijusiais pokyčiais.

1.7.1. Decidualizacija

Decidualizacija – funkcinių ir morfologinių gimdos gleivinės pokyčių visuma, skirta paruošti endometriumą blastocistos stadijos embriono implantacijai jame (5 pav.).

Įprastai decidualizacija prasideda po įvykusios ovuliacijos ir baigiasi mėnesinių kraujavimu dėl reikšmingo hormono P4 koncentracijos sumažėjimo mėnesinių ciklo liuteininės fazės pabaigoje, kai nėštumas neužsimezga.

Pagrindiniai decidualizacijos proceso metu vykstantys pokyčiai apima endometriumo stromos fibroblastų diferenciaciją į sekrecines „epitelioidines“ (decidualines) ląsteles, suintensyvėjusią gimdos liaukų sekreciją ir angiogenezę bei gimdos mikroaplinkai būdingų ląstelių žudikių / natūraliųjų kilerių (NK ląstelių) kiekio padidėjimą endometriume, siekiant sudaryti optimalias sąlygas blastocistos implantacijai jame (Murata *et al.*, 2022).



5 paveikslas. Endometriumo kilmės MKL decidualizacijos ir blastocistos stadijos embriono implantacijos endometriumo schema. cAMP – ciklinis adenozino monofosfatas, IGFBP1 – į insuliną panašus augimo faktorių surišantis baltymas 1, MMP – matricos metaloproteinazės, NK ląstelės – ląstelės žudikės / natūralieji kileriai, P4 – progesteronas, PRL – prolaktinas. Pagal Murata *et al.*, 2022. Adaptuota ir modifikuota naudojant *Biorender.com.*

Decidualinės ląstelės yra pagrindinės šio proceso ląstelės, neretai apibrėžiančios ir pačią diferenciaciją. Tai yra dideli, kartais daugiabranduoliai endometriumo struktūriniai vienetai, turtingi glikogeno ir riebalų intarpų. Jos gamina ir išskiria nėštumo užsimezgimui ir tolesniam vystymuisi svarbius veiksnius, pavyzdžiui, į insuliną panašų augimo faktorių surišantį baltymą 1 (IGFBP1), prolaktiną (PRL), kolageną, matricos metaloproteinazes (MMP) ir kitus (Retis-Resendiz *et al.*, 2024). Manoma, kad tokiu būdu yra užtikrinamos net kelios blastocistos implantacijai endometriume svarbios funkcijos (Ramathal *et al.*, 2010):

1. mitybinė – blastocistos implantacijos endometriume pradžioje decidualinės ląstelės yra jos maisto medžiagų šaltinis;
2. sekrecinė – decidualinės ląstelės išskiria įvairias medžiagas, kurios daro įtaką tolesniam blastocistos vystymuisi;
3. apsauginė – decidualinės ląstelės didina endometriumo atsparumą oksidaciniam stresui, moduliuoja vietinį uždegiminį atsaką, kad būtų sudarytos tinkamos sąlygos blastocistos trofoblastų invazijai į endometriumą.

Endometriumo stromos ląstelių diferenciaciją decidualine kryptimi reguliuoja daugelis veiksnių: kiaušidžių folikulų grūdėtosiose ląstelėse gaminami steroidiniai hormonai – E2 ir P4, ciklinis adenozino monofosfatas (cAMP), vietiniu poveikiu pasižymintys parakrininiai veiksniai ir blastocistos siunčiami signalai. Vis dėlto, kaip pagrindiniai yra įvardijami E2 ir P4 bei antrinis informacijos nešiklis viduląstelinis cAMP, veikiantys per atitinkamus ląstelės membranos ir branduolio receptorius, transkripcijos veiksnius.

Moters mėnesinių ciklo metu hormonas E2 atlieka reikšmingas endometriumo decidualizacijai funkcijas: reguliuoja epitelio ląstelių proliferaciją, skatina stromos ląstelių diferenciaciją, citokinų (chemokinų, interferonų, interleukinų (IL), tumoro nekrozės faktoriaus-α (TNF-α) ir limfokinų) gamybą ir išskyrimą bei indukuoja tokius endometriumo decidualizacijai svarbius signalinius kelius, kaip į insuliną panašaus augimo faktoriaus 1 (IGF1), Wnt/β-katenino, fibroblastų augimo faktoriaus (FAF) ir ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės-mitogeno aktyvuotos baltymų kinazės (ERK-MAPK) (Kaya Okur *et al.*, 2016; Marquardt *et al.*, 2019). Taip pat E2 ne tik endometriume, bet ir kituose moters organizmo audiniuose tiesioginiu bei netiesioginiu būdais skatina progesterono receptorių (PR) kiekio didėjimą (Prange-Kiel *et al.*, 2001; Retis-Resendiz *et al.*, 2024). Visos šios savybės sudaro pagrindą būtent hormoną E2 įvardyti kaip endometriumo diferenciacijos decidualine kryptimi iniciatorių (Makieva *et al.*, 2018; Retis-Resendiz *et al.*, 2024).

Vėlesniu mėnesinių ciklo laikotarpiu, kai ovuliacija jau yra įvykusi, endometriumo decidualizacija yra veikiama ir tokių hormonų kaip folikulus stimuliuojantis hormonas (FSH), relaksinas (RLX), kortikotropiną atplaiduojantis hormonas (CRH), liuteinizuojantis hormonas (LH), ciklooksigenazė-2 (COX-2) (nėštumo užsimezgimo atveju – ir žCG) bei kitų endokrininių veiksnių (Campitiello *et al.,* 2011; Maruyama & Yoshimura, 2008). Visi jie jungiasi prie su G baltymu susijusių receptorių, išsidėsčiusių endometriumo stromos ląstelių membranoje, ir skatina antrinio informacijos nešiklio viduląstelinio cAMP gamybą (Gellersen & Brosens, 2014). Padidėjęs cAMP kiekis ląstelėje aktyvuoja nuo cAMP priklausomą proteino kinazę A (PKA). Aktyvuota PKA fosforilina cAMP atsako elementą surišantį baltymą (CREB), kuris prisijungia prie cAMP atsako elemento (CRE), ir tokiu būdu yra inicijuojama daugelio decidualizacijai būdingų transkripcijos veiksnių, pavyzdžiui, *Forkhead box* šeimos baltymo O1 (FOXO1), signalo keitiklių ir transkripcijos aktyvatorių (STAT3, STAT5) bei CCAAT stipriklį surišančio baltymo beta (CEBPβ), galinčių jungtis prie PR, gamyba (Mak *et al.*, 2002; Maruyama & Yoshimura, 2008; W. Wang *et al.*, 2012; Kajihara *et al.*, 2013). Staigiu ir greitu veikimu pasižyminčiam cAMP įjautrinus endometriumo stromos ląsteles P4, kuriam yra būdingas pastovus, nors ir lėtas veikimas, tolesniais pagrindiniais procesais tampa endometriumo epitelio ląstelių proliferacijos slopinimas ir stromos ląstelių diferenciacijos decidualine kryptimi skatinimas. Beje, cAMP dalyvauja ir ląstelės ciklo reguliavime, indukuodamas p53 transkripciją bei endometriumo stromos ląstelių proliferaciją, sustabdydamas ląstelės ciklo fazę G2/M (Pohnke *et al.*, 2004). Nors cAMP ir hormono P4 tarpusavio sąveika dar lieka iki galo neištirta, abiejų jų veikla yra glaudžiai susijusi su PR, kurie yra aptinkami ir ląstelės membranoje, ir branduolyje.

Ląstelės branduolyje yra išsidėsčiusios dvi ląstelės branduolio progesterono receptoriaus (bPR) izoformos – PRA ir PRB, kurios gali sudaryti sąsajas su progesterono atsako elementu (PRE) tikslinių genų promotorių srityse arba su kitais transkripcijos veiksniais bei koaktyvatoriais. Endometriumo epitelio ląstelės pasižymi PRB raiška, leidžiančia daryti prielaidą apie jų dalyvavimą kontroliuojant endometriumo liaukų sekreciją. PRA izoforma yra vyraujanti endometriumo stromos ląstelėse, todėl dažniausiai jos patologiniai pokyčiai yra siejami su decidualizacijos sutrikimais (Mote *et al.,* 2000; Mulac-Jericevic *et al.,* 2000). Abiem receptoriams yra būdingi skirtingi signaliniai keliai. Pavyzdžiui, PRB per sąveiką su protoonkogeninės tirozino baltymų kinazės Src (c-Src) homologo 3 (SH3) domenu ląstelių plazminėje membranoje indukuoja endometriumo stromos ląstelių decidualizacijai svarbų Ras/Raf1/MAPK signalinį kelią

(Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2005). Kita vertus, PRA signalai didina širdies ir nervų keteros dariniais išreikšto baltymo 2 (HAND2) kiekį endometriumo stromoje, tokiu būdu yra susilpninama FAF gamyba ir atitinkamai mitogeninis signalo kelias epitelio ląstelėse (Q. Li *et al.*, 2011).

bPR paveikta transkripcija turi didelį poveikį WNT/β-katenino signaliniam keliui (Van Der Horst *et al.*, 2012). Šis signalinis kelias yra svarbus blastocistos implantacijai, tačiau kartu pastebėta, kad hormonas P4 per inhibitorių su *Dickkopf* susijusį baltymą 1 (DKK1) sukelia WNT/β-katenino slopinimą endometriumo stromos ląstelėse. Nors dabartiniu metu paaiškinimo šiems procesams nėra, tačiau manoma, kad tai gali būti susiję su tikslu užtikrinti balansą tarp tokių endometriumo stromos ląstelių procesų, kaip proliferacija, diferenciacija, migracija ir decidualizacija. Tai yra, blastocistos siunčiami signalai skatina WNT/β-katenino kelio aktyvumą, o kartu motinos P4 per DKK1 apsaugo nuo per didelio jo aktyvumo, kad būtų užtikrinta tinkama endometriumo stromos ląstelių diferenciacija. Kita vertus, hormonas P4 per sąveiką su bPR indukuoja įvairius transkripcijos veiksnius, pavyzdžiui, *Homeobox* baltymą Hox-A10 (HOXA10), kurie didina decidualizacijai svarbių – IGFBP1, COX-2, prostaglandinų EP3 ir EP4 kiekį (Lim *et al.*, 1999). cAMP irgi gali aktyvuoti tokius transkripcijos veiksnius, kaip STAT5 ir FOXO1, po kurių sąveikos su bPR padidėja ne tik WNT4, kaulų morfogenetinio baltymo-2 (BMP-2), bet ir IGFBP1, PRL bei p57 lygis (Buser *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2007). Šie pavyzdžiai jau leidžia formuluoti teiginį, kad bPR siunčiami signalai suteikia pagrindą specifiniam, iš įvairių veiksnių ir koaktyvatorių sudarytam transkripcijos kompleksui, dėl kurio yra aktyvuojami pagrindiniai decidualizacijos (pavyzdžiui, PRL, IGFBP1) ir endometriumo ląstelių ciklą reguliuojantys (pavyzdžiui, ciklinai, nuo ciklinų priklausomos kinazės (CDK), p21, p27, p53, p57) veiksniai, svarbūs endometriumo diferenciacijai decidualine kryptimi ir blastocistos implantacijai jame. Atliktų papildomų mokslinių tyrimų duomenimis, reikšmingas yra ir ląstelės membranos progesterono receptorių (mPR) veikimas (Fernandes *et al.*, 2005; Pru & Clark, 2013).

Keletas eksperimentinių darbų parodė, kad mPR gali dalyvauti perduodant signalus bPR ir kitų endometriumo decidualizacijai svarbių steroidinių hormonų receptoriams bei sukeliant viduląstelinio Ca^{2+} mobilizaciją endometriumo ląstelėse. Tokiais būdais suaktyvinamos MAPK kaskados ir slopinama cAMP gamyba (Hanna *et al.*, 2006; Karteris *et al.*, 2006). Visgi, kol kas mPR vaidmuo endometriumo stromos ląstelėms diferencijuojantis decidualine kryptimi kelia daug neatsakytų klausimų.

Šių atsakymų paieška ir, apskritai, išsamesnė nagrinėjamos temos analizė yra svarbi ateities mokslinių tyrimų sritis, nes jau dabar yra akivaizdu,

kad ne visada endometriumo ląstelių pokyčiai koreliuoja su hormonų arba kitų žinomų veiksnių raiška, o tai rodo sudėtingesnius genų bei jų koduojamų baltymų gamybos reguliavimo procesus, kurie galėtų būti vertinami kaip ląstelių morfologinių pokyčių, genų reguliavimo tinklų ir aplinkinių veiksnių (pavyzdžiui, skydliaukės hormonų, MMP, gliukozės metabolizmo) derinimo rezultatas.

Endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos decidualine kryptimi sutrikimai lemia patologinius endometriumo receptyvumo pokyčius, o svarbiausia – blastocistos implantacijos endometriume ir tolesnio nėštumo vystymosi sutrikimus.

1.7.2. Endometriumo receptyvumas

Mėnesinių ciklo metu po mėnesinių kraujavimo prasidedanti endometriumo regeneracija, o vėliau – decidualizacija yra kritiškai svarbūs veiksniai sėkmingam nėštumo užsimezgimui ir tolesniam vystymuisi. Šių procesų sutrikimai gali sukelti endometriumo receptyvumo patologinius pokyčius (X. Zhang *et al.*, 2022).

Endometriumo receptyvumo sąvoka apibūdina funkcinį ir morfologinį endometriumo pasiruošimą priimti blastocistos stadijos embrioną. Tai reiškia, kad mėnesinių ciklo metu endometriume susiformavo optimalios sąlygos blastocistos prisitvirtinimui, invazijai ir vystymuisi jame, kai siektinas galutinis šio kompleksinio proceso rezultatas yra gyvo naujagimio gimimas (Achache & Revel, 2006; Lessey & Young, 2019). Endometriumas receptyvus yra itin ribotą mėnesinių ciklo laiką, dar vadinamą jau anksčiau minėtu implantacijos lango terminu. Pavyzdžiui, 28 dienų mėnesinių cikle, kai ovuliacija įvyksta 14-ą dieną, jis yra skaičiuojamas apytikriai nuo 19-os iki 24-os dienos (± 1 d.).

Endometriumo receptyvumo patologiją gali sukelti daugelis moters sveikatos sutrikimų, o dažniausi išskiriami yra šie (Lessey & Young, 2019; A. H. Bui *et al.*, 2022):

1. intrauterininių sinechijų (intrauterininės sinechijos – vidinės gimdos ertmės sąaugos) susiformavimas (Ašermano sindromas). Tai yra viena iš pagrindinių endometriumo receptyvumo sutrikimo priežasčių (Yu *et al.*, 2008). Įprastai, sėkmingai blastocistos implantacijai yra būtinas ≥ 8 mm endometriumo storis, tuo atveju, kai jis siekia < 6 mm (kai kurių autorių teigimu, < 7 mm), toks endometriumas vadinamas išplonėjusiu arba net yra vartojama endometriumo atrofijos sąvoka. Remiantis 22 mokslinių tyrimų metaanalizės rezultatais, 2,4 proc. moterų,

kurioms buvo atlikti IVF/ICSI gydymo ciklai, nustatyta išplonėjusio endometriumo diagnozė (Kasius *et al.,* 2014). Kitų mokslinių tyrimų duomenimis, Ašermano sindromo dažnis moterų, kurioms nevaisingumo tyrimų metu atlikta histerosalpingografija, grupėje buvo 1,5 proc., o kartotinių savaiminių persileidimų grupėje svyravo nuo 5 proc. iki 39 proc. (Smikle *et al.,* 2023);

2. kiti anatominiai moters lyties organų pokyčiai, pavyzdžiai, gimdos ertmės polipas, gimdos mioma, endometriozė ir hidrosalpinksas (hidrosalpinksas – skysčių susikaupimas kiaušintakyje, sukeliantis jo blokadą);
3. endokrininės sistemos sutrikimai;
4. metaboliniai sutrikimai;
5. imuninės sistemos sutrikimai;
6. kraujo krešėjimo sistemos sutrikimai, pavyzdžiui, trombofilijos;
7. infekcijos, pavyzdžiui, uždegiminė dubens liga, endometritas, intrauterininė tuberkuliozė;
8. natūralus endometriumo storio mažėjimas didėjant moterų amžiui. Atliktų tyrimų duomenimis, net 25 proc. IVF/ICSI gydymo ciklų, atliekamų vyresnėms nei 40 metų amžiaus moterims, metu yra nustatomas išplonėjęs endometriumo sluoksnis (Sher *et al.,* 1991).

Kartu yra paminėtina, kad nors endometriumo pasiruošimas blastocistos priėmimui ir embriono vystymasis vyksta lygiagrečiai, iš dalies siejasi, tačiau kartu tai nepriklausomi procesai, todėl sėkmingai blastocistos implantacijai endometriume yra labai svarbi endometriumo ir embriono sinchronija (Teh *et al.,* 2016). Jeigu endometriumas nereceptyvus arba prarandama endometriumo ir embriono sinchronija, didėja tokių sutrikimų kaip nevaisingumo, savaiminio persileidimo, ektopinio nėštumo, netaisyklingo placentos prisitvirtinimo ir formavimosi, mažo gimimo svorio naujagimių gimimo ir kitų pastojimo bei perinatalinių komplikacijų rizika (Jing *et al.,* 2019; Bu *et al.,* 2020; Guo *et al.,* 2020; Liu, Zhang, *et al.,* 2020; Mahutte *et al.,* 2022).

1.8. Medicininė pagalba su endometriumo receptyvumu susijusio nevaisingumo atveju

Endometriumo receptyvumo sutrikimas yra viena pagrindinių nesėkmingos blastocistos implantacijos endometriume priežasčių, todėl jo korekcijai yra

naudojamos įvairios medicininės priemonės (AAGL Practice Report, 2017; Santamaria *et al.*, 2020; Makrigiannakis *et al.*, 2021):

1. skiriami medikamentai, vitaminai ir maisto papildai, pavyzdžiui, estrogenų terapija, vitaminas E, L-argininas, aspirinas, tamoksifenas, sildenafilis, žCG preparatai, augimo hormonas, antibiotikai;
2. taikoma autologinė ląstelių terapija, pavyzdžiui, autologinė trombocitais papildytos plazmos (PRP) terapija;
3. atliekama endometriumo sąaugų profilaktika, pavyzdžiui, naudojant gimdos balioną, *Foley* kateterį, antiadhezijos barjerus;
4. skiriamos invazinės procedūros, pavyzdžiui, endometriumo pažaida;
5. atliekamos chirurginės procedūros, pavyzdžiui, gimdos ertmės dilatacija ir kiuretažas, histeroskopinės operacijos;
6. taikomi pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklai;
7. naudojama surogacija;
8. ugdoma sveika gyvensena.

Nors ir yra įvairių gydymo galimybių, o jų atlikimas dar gali būti derinamas tarpusavyje, tačiau nemažai daliai porų nepavyksta pastoti ir (arba) išnešioti vaisių iki gyvo naujagimio gimimo. Kai kurie metodai siejami su dideliu asmeninių finansų poreikiu, daliai asmenų ir (arba) porų jie yra nepriimtini dėl pasaulėžiūros bei įsitikinimų, gydymo rezultatai – ganėtinai išsibarstę, išlieka rizikų ir komplikacijų tikimybė. Atsižvelgiant į tai, nuolat ieškoma efektyvesnių ir priimtinesnių medicininės pagalbos galimybių.

1.9. Mezenchiminės kamieninės / stromos ląstelės

1.9.1. Bendrųjų savybių apžvalga

Kamieninių ląstelių naudojimas yra moksliniais tyrimais įrodyta ir klinikinėje praktikoje pripažinta gydymo strategija daugelyje regeneracinės medicinos sričių (Song *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022). Ypač didelis dėmesys yra skiriamas MKL, nes jos ne tik pasižymi bendromis pagrindinėmis kamieninių ląstelių savybėmis, bet ir turi svarbių išskirtinumų.

Būdingos MKL savybės (Lee & Yi, 2018; Lukomska *et al.*, 2019; J. Wang *et al.*, 2019; Musiał-Wysocka *et al.*, 2019; Zhuang *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2022):

1. plati įvairiakryptė diferenciacija;
2. mažas imuninis aktyvumas;
3. aukštas proliferacijos potencialas;

4. galimybė lengvai migruoti į pažeistą audinio vietą ir inicijuoti pažeisto audinio regeneraciją;
5. galimybė jas surinkti iš daugelio įvairių šaltinių;
6. sąlyginai nesudėtingi ėminių, skirtų išskirti MKL, surinkimo metodai;
7. lengvas kultivavimas mitybinėse terpėse;
8. jų gavimas ir naudojimas nekelia etinių dilemų;
9. geros komercializavimo galimybės.

Vis dėlto, kol kas nėra vienareikšmio atsakymo dėl MKL tumorogeninių savybių, jų gebėjimo išlaikyti genetinį stabilumą ilgalaikio ląstelių kultivavimo metu (Musiał-Wysocka *et al.*, 2019).

MKL galima išskirti iš daugelio skirtingų šaltinių (Murray *et al.*, 2014; Musiał-Wysocka *et al.*, 2019):

1. suaugusiųjų donorų – kaulų čiulpų, periferinio kraujo, riebalinio audinio, odos, dantų pulpos, sąnarių sinovinio skysčio, raiščių, raumenų, motinos pieno, endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo;
2. nėštuminių audinių ir skysčių – placentos audinio, virkštelės kraujo, virkštelės audinio, amniono membranos ir skysčio.

Nors geriausiai ištirti ir labiausiai žinomi MKL šaltiniai yra kaulų čiulpai, riebalinis audinys ir virkštelės audinys, vis daugiau tyrimų rezultatų rodo, kad $CD140b^{+}CD146^{+}$ endometriumo stromos ląstelės pasižymi dideliu proliferaciniu potencialu, įvairiakrypte diferenciacija ir tipiniais MKL būdingais žymenimis, todėl gali būti vadinamos endometriumo MKL ir naudojamos kaip daug žadanti atitinkamų tyrimų kryptis (Abuwala & Tal, 2021; T. Li *et al.*, 2024).

Tolesniuose skyriuose plačiau bus nagrinėjamas skirtingos kilmės MKL veikimas esant endometriumo patologijos sukeltiems vaisingumo sutrikimams.

1.9.2. Ne endometriumo kilmės MKL vaidmuo koreguojant endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus

Pagrindinės ne endometriumo kilmės MKL grupės, nagrinėjamos vaisingumo sutrikimų diagnostikos ir terapijos plotmėje, yra kelios:

1. **Kaulų čiulpų kilmės MKL.** Kaulų čiulpų kilmės MKL yra bendrai geriausiai ištirtas MKL tipas, o jų terapijos sėkmingas taikymas endometriumo patologinių pokyčių, lemiančių

vaisingumo sutrikimus ir nepalankias nėštumo baigtis, korekcijai yra įrodytas ikiklinikiniais bei klinikiniais tyrimais.

Zhao ir kolegų atlikto *in vivo* tyrimo rezultatai atskleidė, kad kaulų čiulpų MKL infuzija į žiurkių patelių gimdos ragų ertmę padidina endometriumo ląstelėms būdingų baltymų kiekį bei endometriumo storį (J. Zhao *et al.*, 2015). Tai leido daryti prielaidą, kad tiriamos ląstelės dėl migracijos ir imunomoduliacijos procesų gali pagerinti endometriumo regeneraciją. Netrukus buvo gauta duomenų dėl teigiamo kaulų čiulpų MKL transplantacijos poveikio endometriumo atkūrimui dėl padidėjusio estrogenų receptorių (ER) ir PR kiekio (J. Wang *et al.*, 2016). *Tal* su kolegomis atlikto *in vivo* tyrimo rezultatai įrodė, kad kaulų čiulpų kilmės MKL geba migruoti į endometriumo stromą ir diferencijuotis į hormoną PRL išskiriančias decidualines ląsteles, kai PRL gamyba yra vienas svarbiausių rodiklių, patvirtinančių sėkmingą endometriumo stromos ląstelių decidualizaciją (Tal *et al.*, 2019). Kartu šie rezultatai atskleidė, jog kaulų čiulpų kilmės MKL gali daryti įtaką endometriumo stromos ląstelių nišoms, pagerindamos blastocistos implantacijos endometriume procesą. Tyrimai buvo tęsti toliau, ir *Gao* su kolegomis, suleidę kaulų čiulpų kilmės MKL į žiurkių patelių, kurioms diagnozuotas Ašermano sindromas, gimdos ragus, hematoksilino ir eozino (HE) dažymo metodu patvirtino visų endometriumo sluoksnių atsinaujinimą ir proliferaciją, o *Masson Trichrome* dažymo metodu – sumažėjusį fibrozės intensyvumą (Gao *et al.*, 2019). Taip pat vykdant šį ir kitus mokslinius tyrimus buvo nustatyta, kad kaulų čiulpų kilmės MKL infuzija gali padidinti įvairių augimo veiksnių, skatinančių mikrovaskulinių endotelio ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, išskyrimą bei pagerinti endometriumo receptyvumą (Abumaree *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2019). *Yi* su kolegomis atlikto mokslinio tyrimo rezultatai irgi patvirtino kaulų čiulpų kilmės MKL transplantacijos teigiamą poveikį (Yi *et al.*, 2019). Suleidus kaulų čiulpų kilmės MKL suspensiją į pelių patelių gimdos ragus, buvo nustatytas padidėjęs endometriumo receptyvumo žymenų – leukemiją slopinančio faktoriaus (LIF), IL-1β ir integrino β3, kiekis. Ikiklinikinių mokslinių tyrimų rezultatai suformavo prielaidas plėtoti klinikinius tyrimus.

Kaulų čiulpų kilmės MKL migracijos galimybes klinikiniais tyrimais patvirtino skirtingų mokslininkų grupės, atlikusios

alogeninę kaulų čiulpų transplantaciją moterims ir jų gimdos audiniuose identifikavusios donorų ląsteles (Lee & Yi, 2018; Taylor, 2004). Jų poveikio galimybes atskleidė *Santamaria* su kolegomis įvykdytas tyrimas, kurio metu kaulų čiulpų kilmės MKL specialia metodika buvo suleistos į gimdos spiralines arterijas moterims, turinčioms patvirtintą Ašermano sindromą arba endometriumo atrofiją (Santamaria *et al.,* 2016). Tyrimo rezultatai buvo padidėjęs endometriumo storis ir brandžių kraujagyslių tankis jame, ilgesnė mėnesinių kraujavimo trukmė ir intensyvumas, o svarbiausia – geresnės pastojimo galimybės. Visų 11 moterų, kurioms diagnozuotas Ašermano sindromas, endometriumo paaugo vidutiniškai nuo 4,3 mm (2,7–5) iki 6,7 mm (3,1–12 mm) (p = 0,004). Tuo tarpu 4 iš 5 moterų, kurioms buvo diagnozuota endometriumo atrofija, endometriumo storis padidėjo nuo 4,2 mm (2,7–5) iki 5,7 mm (5– 12) (p = 0,03). Iš tyrime dalyvavusių moterų: 3 moterys pastojo savaime, o jų nėštumo baigtys – 1 gimęs gyvas naujagimis, 1 besitęsiantis nėštumas bei 1 savaiminis persileidimas, ir 7 moterys pastojo po IVF/ICSI gydymo ciklų, o jų nėštumo baigtys – 3 biocheminiai nėštumai (biocheminis nėštumas – nėštumas, kai žCG (> 10 U/l) koncentracija kraujo serume padidėja dažniausiai iki 100 U/l, kuri vėliau ima mažėti bei tiriant ultragarsu nėra nustatomi nėštumo požymiai (Schreiber *et al.,* 2009)), 1 savaiminis persileidimas, 1 ektopinis nėštumas, 1 gimęs gyvas naujagimis bei 1 besitęsiantis nėštumas. Naujesniame klinikiniame tyrime, kurį atliko *Singh* su kolegomis, autologinės kaulų čiulpų MKL buvo persodintos 25 moterims su diagnozuotu nevaisingumu ir Ašermano sindromu (*n = 12*) arba išplonėjusiu endometriumu (*n = 13*) (Singh *et al.,* 2020). Ląstelės suleistos į endometriumo – miometriumo jungties zoną, o po to skirta 3–6 mėnesių estrogenų terapija geriamomis tabletėmis. 6 iš 7 tyrime dalyvavusių moterų, kurioms buvo amenorėja (amenorėja – mėnesinių kraujavimo nebuvimas), mėnesinių kraujavimas atsinaujino, o vidutinis endometriumo storis bendrai padidėjo nuo 3,3 mm iki 5,1 mm per 3 mėnesius laiko. 11 moterų buvo atliktas IVF/ICSI gydymo ciklas, iš jų 2 pastojo – 1 moteris sėkmingai pagimdė gyvą naujagimį, o 1 moteriai diagnozuotas ektopinis nėštumas. Dar 2 moterys pastojo savaime ir sėkmingai pagimdė gyvą naujagimį praėjus trejiems metams po procedūros.

2. **Riebalinio audinio kilmės MKL**. Riebalinio audinio kilmės MKL tampa vis patrauklesniu kamieninių ląstelių tyrimų objektu dėl santykinai lengvo ląstelių surinkimo metodo, kuris kartu nekelia etinių dilemų. Ikliklinikinių ir klinikinių tyrimų rezultatai atskleidžia, kad endometriumo patologijos sukeltų vaisingumo sutrikimų gydymui perspektyvu naudoti šio tipo MKL.

   Shao su kolegomis atliko mokslinį tyrimą, kurio rezultatai patvirtino riebalinio audinio kilmės MKL transplantacijos veiksmingumą endometriumo patologijos atveju dėl šių ląstelių gebėjimo diferencijuotis į endometriumo ląsteles (Shao *et al.*, 2019). Tyrėjai persodino žaliu fluoresuojančiu baltymu (GFP) pažymėtas riebalinio audinio kilmės MKL į *in vivo* modelius ir vėliau identifikavo GFP pažymėtas endometriumo epitelio ląsteles. Praėjus 30 dienų nuo atliktos transplantacijos buvo pastebėtas padidėjęs žiurkių patelių endometriumo storis, liaukų ir mikrokraujagyslių skaičius jame, ER ir PR kiekis, o galiausiai – geresnis laboratorinių gyvūnų vaisingumas. Šie rezultatai patvirtino ankstesnių tyrimų duomenis, kai naudotuose *in vivo* modeliuose riebalinio audinio kilmės MKL derinys su estrogenais sukėlė endometriumo audinių regeneraciją (Kilic *et al.,* 2014) arba iš riebalinio audinio kilmės MKL gautos egzosomos paskatino endometriumo regeneraciją, kolageno remodeliavimą ir padidino integrino β3, LIF bei kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) kiekį (L. Chen *et al.,* 2017).

   Sudoma su kolegomis pristatė pirmuosius nėštumo ir gimdymo atvejus po autologinių riebalinio audinio kilmės MKL panaudojimo endometriumui atkurti (Sudoma *et al.,* 2019). Į šį tyrimą buvo įtrauktos 25 vaisingumo sutrikimus turinčios moterys, kurių endometriumo storis buvo iki 5 mm ir jos, anamnezės duomenimis, turėjo mažiausiai tris nesėkmingus pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklus, kai buvo perkeltos aukštos kokybės blastocistos. Ultragarso kontrolėje atlikus MKL transplantaciją po endometriumu, buvo skirta 5–7 dienų trukmės estrogenų terapija geriamomis tabletėmis. 20 moterų endometriumo storis padidėjo iki 6,5–7 mm embriono perkėlimo į gimdos ertmę metu, užsimezgė 13 nėštumų (11 nėštumų po IVF/ICSI gydymo ciklų ir 2 savaiminiai nėštumai) ir gimė 9 gyvi naujagimiai.
3. **Iš virkštelės kraujo išskirtos MKL.** Virkštelės kraujo MKL tyrimai, susiję su endometriumo patologijos sukelto

nevaisingumo gydymu, intensyvėja ir gaunami teigiami rezultatai. Pavyzdžiui, *Zhang* su kolegomis atlikę *in vivo* tyrimą nustatė, kad iš virkštelės kraujo išskirtos ir per uodegos veną endometriumo patologiją turinčioms žiurkių patelėms suleistos MKL gali sukelti jų endometriumo regeneraciją, mažindamos priešuždegiminių veiksnių kiekį ir skatindamos angiogenezę, tokiu būdu pagerinant endometriumo receptyvumą bei blastocistos implantaciją jame (L. Zhang *et al.*, 2018). Šiuos rezultatus patvirtino ir *Hua* su kolegomis įvykdyto tyrimo rezultatai, kurie parodė, kad virkštelės kraujo MKL gali atkurti endometriumą, pagerinti jo regeneraciją per ląstelių diferenciacijos ir imunomoduliacijos procesus bei ląstelės branduolio faktoriaus *kappa* B (NF-κB) signalinį kelią (Hua *et al.*, 2022).

Analizuojant virkštelės kraujo MKL klinikinius tyrimus endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo kontekste, paminėtini eksperimentai, kai moterims, kurioms diagnozuotos intrauterininės sąaugos, buvo atlikta šių ląstelių transplantacija panaudojant specialaus kolageno karkaso perkėlimą į gimdos ertmę. *Cao* su kolegomis virkštelės kraujo MKL pritvirtino ant specialaus kolageno karkaso ir histeroskopijos metu perkelė į moterų, kurioms diagnozuotas nevaisingumas ir intrauterininės sinechijos, gimdos ertmę (Cao *et al.*, 2018). Po procedūros moterims buvo skirta viena 60 mg progesterono dozė ir 30 dienų trukmės estrogenų terapija. Praėjus trims mėnesiams po procedūros, moterų endometriumo storis padidėjo nuo 4,46 mm ± 0,85 mm iki 5,74 mm ± 1,2 mm, o intrauterininių sąaugų balas sumažėjo nuo 9,12 ± 1,51 iki 5,52 ± 3,22. Histologinis tyrimas parodė ERα, vimentino, Ki67 ir *von Willebrand* faktoriaus lygio padidėjimą ir ΔNP63 lygio sumažėjimą, patvirtinančius, kad po gydymo pagerėjo endometriumo proliferacija, diferenciacija ir angiogenezė. Per 30 stebėjimo mėnesių 10 iš 26 tyrime dalyvavusių moterų pastojo: 3 moterys pastojo po IVF/ICSI gydymo ciklo, 7 moterys pastojo savaime. Iš jų 8 moterys pagimdė išnešiotus naujagimius, 1 – trečiąjį nėštumo trečdalį, o 1 patyrė savaiminį persileidimą. Šie rezultatai sudarė prielaidas naudoti iš virkštelės išskirtas MKL ne tik intrauterininių sinechijų gydymui, bet ir audinių inžinerijai. Vėliau atlikto panašaus klinikinio tyrimo metu virkštelės kraujo MKL buvo pritvirtintos ant specialaus kolageno karkaso ir histeroskopijos metu 7–12-ą

mėnesinių ciklo dienomis dviem nuosekliais ciklais perkeltos į gimdos ertmę 16 moterų, kurioms buvo diagnozuotas nevaisingumas dėl išplonėjusio endometriumo (endometriumo storis < 5,5 mm) (Y. Zhang *et al.*, 2021). Praėjus trims mėnesiams po transplantacijos, endometriumas vidutiniškai paaugo nuo 4,1 mm iki 5,9 mm, taip pat labai padidėjo mikrokraujagyslių tankis, liaukų skaičius ir ERα, PR bei proliferacinio žymens Ki67 kiekis. Iš 15 moterų, kurioms buvo atlikti 22 atšildytų embrionų perkėlimo ciklai, 3 pastojo – gimė 2 gyvi naujagimiai, o 1 pacientė pastojo savaime ir sėkmingai pagimdė gyvą naujagimį.

4. **Iš amniono membranos išskirtos MKL.** Amniono membranos MKL endometriumo patologijos korekcijos tikslu yra tiriamos ikiklinikiniuose eksperimentiniuose darbuose.
   Gan su kolegomis atlikto mokslinio tyrimo rezultatai parodė, kad amniono membranos MKL transplantavus *in vivo* modeliams su mechaniniu būdu sukelta endometriumo patologija, jau po vienos savaitės gali padidėti endometriumo storis, liaukų kiekis ir sumažėti fibrozės intensyvumas (Gan *et al.*, 2017). Kartu buvo nustatytas reikšmingai mažesnis tokių uždegimą skatinančių citokinų kaip TNF-α ir IL-1β matricinės RNR (mRNR) lygis ir didesnis tokių uždegimą slopinančių citokinų kaip FAF ir IL-6 lygis. Tai leido daryti prielaidą, kad aptariamos ląstelės turi teigiamą imunomoduliuojantį poveikį endometriumo regeneracijai ir receptyvumui. Taip pat *Mao* su kolegomis atliko *in vivo* tyrimą, kurio metu amniono membranos MKL transplantavo žiurkių patelėms su patvirtintu intrauterininių sinechijų susiformavimu (Mao *et al.*, 2023). Suleidus amniono membranos MKL į uodegos veną, buvo stebėta intensyvesnė endometriumo liaukų proliferacija, mažesnė fibrozė, didesnė VEGF ir citokeratino koncentracija.
5. **Iš placentos audinio išskirtos MKL.** Iš placentos audinio išskirtų MKL naudojimas endometriumo patologijos sukelto vaisingumo sutrikimų atvejais dar tik skinasi kelią. Visgi, tam tikri duomenys leidžia daryti teigiamas prielaidas apie šių ląstelių veiksmingumą intrauterininių sinechijų korekcijos atvejais.
   2016 m. *Du* su kolegomis atlikto *in vivo* tyrimo rezultatai atskleidė, kad iš placentos audinio išskirtos MKL gali slopinti endometriumo sąaugų formavimąsi ir pagerinti jo receptyvumą (Du *et al.*, 2016). Šių ląstelių terapijos galimybės padidinti endometriumo storį, liaukų skaičių, paskatinti endometriumo

ląstelių proliferaciją ir angiogenezę, sumažinti fibrozės intensyvumą, o galiausiai – teigiamai paveikti pastojimo rezultatus buvo įrodytos ir vėlesniuose *in vivo* endometriumo patologijos modeliuose (Y. Lin *et al.*, 2022).

1.9.3. Endometriumo kilmės MKL vaidmuo koreguojant endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus

1978 m. *Prianishnikov* pristatė hipotezę apie kamieninių ląstelių buvimo galimybę endometriumo audinyje (Prianishnikov, 1978). 2004 m. pavyko pirmą kartą istorijoje sėkmingai išskirti ir charakterizuoti endometriumo kilmės MKL (Chan *et al.*, 2004). Tuomet jos buvo identifikuotos kaip klonogeninės stromos ląstelės, apimančios 1,25 proc. ± 0,18 proc. stromos fibroblastų (Chan *et al.*, 2004), ir tik nustačius, kad šioms ląstelėms yra būdinga teigiama perivaskulinių ląstelių CD140b ir CD146 paviršiaus žymenų raiška, jos buvo charakterizuotos kaip MKL (Schwab & Gargett, 2007). Tolesni moksliniai tyrimai įrodė, kad $CD140b^{+}CD146^{+}$ ląstelės pasižymi teigiama daugelio tipinių MKL paviršiaus žymenų raiška (pavyzdžiui, CD73, CD90 ir CD105) bei neigiama kraujodaros kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų raiška, joms yra būdingos kitos standartizuotos MKL apibrėžimo savybės – diferenciacija adipogenine, chondrogenine, osteogenine kryptimis bei kibimas prie plastiko paviršiaus. Šios žinios leido plačiau naudoti endometriumo kilmės MKL terminą.

2007 m. *Meng* su kolegomis ir *Cui* su kolegomis žengė dar vieną reikšmingą žingsnį nagrinėjamos temos kontekste – pirmą kartą aprašė naują, visiškai neinvazyvų endometriumo kilmės MKL šaltinį – mėnesinių kraują (Cui *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2007), o iš jo išskirtas ląsteles pavadino endometriumo regeneracinėmis ląstelėmis (Meng *et al.*, 2007). Vėliau buvo kartotinai įrodyta, kad pastarosioms ląstelėms yra būdinga teigiama daugelio tipinių MKL paviršiaus žymenų – CD9, CD13, CD29, CD41a, CD59, CD73, CD90 ir CD105 raiška ir neigiama kraujodaros kamieninėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų – CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 bei žmogaus leukocitų II klasės antigeno DR (ŽLA-DR) raiška (L. Chen *et al.*, 2019; Bozorgmehr *et al.*, 2020; Sanchez-Mata & Gonzalez-Muñoz, 2021; Cordeiro *et al.*, 2022).

Tęsiant iš mėnesinių kraujo ėminių išskirtų endometriumo kilmės MKL charakteristikos analizę, svarbu paminėti ir dažniausiai pabrėžiamas jų funkcines savybes (Meng *et al.*, 2007; L. Chen *et al.* 2019; Bozorgmehr *et al.*, 2020; Sanchez-Mata & Gonzalez-Muñoz, 2021; Cordeiro *et al.*, 2022):

1. itin aukštą proliferacijos potencialą – ląstelės padvigubėja vidutiniškai kas 18–36 val., o tai yra beveik 2–4 kartus greičiau nei kaulų čiulpų kilmės MKL atveju;
2. gebėjimą išlaikyti stabilų genotipą ilgalaikio ląstelių auginimo metu, pavyzdžiui, net po 40-ies pasažų;
3. gebėjimą sąveikauti su daugeliu imuninių ląstelių ir dalyvauti reguliuojant ląstelinį bei humoralinį imunitetą. Pavyzdžiui, MenMKL yra būdinga 10–100 000 kartų greitesnė citokinų, MMP (MMP3, MMP10 ir kt.), granuliocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GM-KSF), angiopoetino-2 (ANG-2) ir trombocitų kilmės augimo faktoriaus BB homodimero (PDGF-BB) gamyba, palyginti su virkštelės kraujo MKL, gebėjimas išskirti imunomoduliuojančiu poveikiu pasižymintį žmogaus didįjį audinių suderinamumo kompleksą I (MHC I) bei slopinti gama interferono (IFN-γ) ir TNF-α gamybą;
4. plačias diferenciacijos galimybes. Žinoma, kad MenMKL gali diferencijuoti ne tik į endometriumo ląsteles, bet ir įvairias kitų tipų ląsteles – adipocitus, chondrocitus, miocitus, kardiomiocitus, neuronus, kvėpavimo takų epitelio, endotelio, kepenų, kasos ir kiaušidžių ląsteles.

Nors išvardytos savybės iš tiesų yra artimos EndMKL charakteristikai, šiuos du endometriumo kilmės MKL šaltinių tipus reikšmingai skiria surinkimo metodika.

Galimybė neinvazyviai, santykinai lengvai, mažomis sąnaudomis atlikti ir pakartoti procedūrą surenkant reliatyviai didelį ląstelių kiekį išskiria MenMKL ne tik iš endometriumo audinio, bet ir kitų MKL šaltinių (L. Chen *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2018).

Atsižvelgiant į šias ir kitas, anksčiau apžvelgtas MenMKL ypatybes, vis labiau intensyvėja mokslo tyrimai siekiant įvertinti jų terapinio taikymo galimybes.

Kelios mokslininkų grupės jau yra nustačiusios, kad *in vivo* modeliuose, kai endometriumą iš dalies yra pakeitęs fibrozinis randinis audinys (Gargett *et al.*, 2012; Hosoya *et al.*, 2023) arba diagnozuotos intrauterininės sinechijos (Y. Zhang *et al.*, 2016), MenMKL transplantacija gali sukelti endometriumo regeneraciją. Minimų eksperimentinių darbų metu MenMKL infuzija ją gavusioms pelių patelėms lėmė endometriumo storio padidėjimą, sumažino fibrozės intensyvumą, sutrumpino pastojimo laiką ir padidino embrionų implantacijos vietų skaičių, palyginti su tokios terapijos negavusiomis pelių patelėmis. *Zhao* su kolegomis parodė, kad MenMKL gali skatinti endometriumo epitelio ląstelių invaziją, jų proliferaciją bei didinti šių

ląstelių išskiriamų citokinų ir augimo faktorių (FAF, trombocitų kilmės augimo faktorius (PDGF) ir MMP3 baltymų), atliekančių svarbų vaidmenį ląstelių judrume, proliferacijoje ir audinių remodeliavime, endometriume kiekį (M. Zhao *et al.*, 2021). *Zhu* su kolegomis atlikto mokslinio tyrimo metu, kai endometriumo patologija *in vivo* modelyje buvo sukelta mifepristonu (mifepristonas – sintetinis steroidas, kuris blokuoja P4 veikimą), parodė, kad MenMKL gali reguliuoti endometriumo stromos ląstelių proliferaciją, migraciją ir sumažinti ląstelių apoptozę, aktyvinant p38 MAPK ir AKT signalinius kelius (Zhu *et al.*, 2018, 2019). Taip pat buvo nustatyta, kad MenMKL ir jų sekrecijos produktai (pavyzdžiui, granuliocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius, G-KSF) gali sumažinti endometriumo fibrozės intensyvumą (X. Lin *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019) bei nuo vieno iš jos induktoriaus – transformuojančio augimo faktoriaus-β (TGF-β) priklausančių fibrozę skatinančių veiksnių ir miofibroblastų kiekį (Zhu *et al.*, 2019). Kartu skirtingų tyrėjų grupių tyrimai patvirtino, kad MenMKL gali skatinti angiogenezę (Y. Zhang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), sukelti vimentino, keratino bei VEGF koncentracijos padidėjimą (Hu *et al.*, 2019) ir aktyvuoti baltymų kinazės B, atliekančios svarbų vaidmenį ląstelių proliferacijos, metabolizmo bei gyvavimo procesuose, signalinį kelią (Zhu *et al.*, 2018), tokiais būdais pagerinant endometriumo receptyvumą, o tuo pačiu – blastocistos implantaciją jame. Šia tema jau yra pradėti ir klinikiniai tyrimai.

Vieną iš ankstyviausių klinikinių tyrimų, kurių metu naudota MenMKL terapija, atliko *Tan* su kolegomis (Tan *et al.*, 2016). Moterims, kurioms buvo diagnozuotos intrauterininės sinechijos (sunkios stadijos Ašermano sindromas), pirma, suleista autologinė MenMKL infuzija į gimdos ertmę, o po to skirta 21 dienos trukmės estrogenų terapija geriamomis tabletėmis. 5 iš 7 atvejų endometriumo storis padidėjo iki 7–8 mm, iš jų 2 moterys pastojo po atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklo, o 1 moteris – savaime, praėjus 3,5 mėn. po atliktos procedūros. Taip pat, priešingai nei ankstesnių mokslinių tyrimų metu, šiame MenMKL charakteristika buvo patvirtinta MKL žymenų raiška. Kito klinikinio tyrimo metu, po MenMKL transplantacijos praėjus 7 dienos, nustatyta ryški endometriumo regeneracija, pasireiškusi storesniu endometriumu, padidėjusiu mikrokraujagyslių tankiu jame ir sumažėjusia fibroze (Y. Zhang *et al.*, 2016). Taip pat MenMKL transplantaciją gavusių moterų grupėje stebėtas dažnesnis klinikinių nėštumų užsimezgimas po atlikto pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo nei kontrolinėje, tokios infuzijos negavusių moterų grupėje – atitinkamai 53,57 proc. ir 14,29 proc. Vėlesnių tyrimų rezultatai irgi išliko teigiami. Pavyzdžiui, *Tersoglio* su kolegomis atliko kompleksinį tyrimą, siekdami

įvertinti endometriumo kilmės MKL transplantacijos įtaką endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo atveju (Tersoglio *et al.*, 2020). Klinikiniame tyrime dalyvavo 29 moterys, kurioms buvo nustatyta išplonėjusio endometriumo ir kartotinių persileidimų (kartotinių persileidimų diagnozė buvo suformuluota, kai ≥ 3 kartų neįvyko sėkminga embriono implantacija, nors į apvaisinamos moters gimdos ertmę buvo perkelta aukštos kokybės blastocista) diagnozės. EndMKL, kurios pasižymėjo MKL būdingais paviršiaus ląstelių žymenimis ir $SUSD2^{+}$, kartu su PRP injekcija suleistos moterims, praėjus 6–8 savaitėms po estrogenų terapijos vartojimo. Rezultatai parodė statistiškai reikšmingą endometriumo storio padidėjimą po EndMKL transplantacijos į gimdos ertmę, tokiu būdu įrodant regeneracines šių ląstelių savybes. Vidutiniškai endometriumas paaugo nuo 5 mm ± 1,24 mm iki 9,93 mm ± 0,77 mm (p = 0,000). Taip pat iš 29 moterų, kurioms buvo perkeltas embrionas, autoriai pranešė apie 23 klinikinius ir 7 besitęsiančius nėštumus. Naujesniame tyrime *Ma* su kolegomis MenMKL terapiją skyrė 12 moterų, kurioms buvo diagnozuotos intrauterininės sąaugos (Ma *et al.*, 2020). Tyrimo metu MKL buvo charakterizuotos pagal ląstelių paviršiaus žymenų raišką ir daugiakryptį diferenciacijos potencialą. MenMKL transplantuotos į pamatinį endometriumo sluoksnį, o po skirta 1–2 mėnesių hormonų terapija. Praėjus 14 dienų po procedūros, endometriumo storis padidėjo nuo 3,9 mm iki 7,5 mm, o 5 iš 12 moterų pasiekė klinikinį nėštumą (dažnis – 41,7 proc. atvejų) – 4 pastojo po pagalbinio apvaisinimo ne moters gydymo ciklo, o 1 – savaime.

Nepaisant pirmiau aptartų mokslinių tyrimų rezultatų, kurie formuoja teigiamas prielaidas dėl endometriumo kilmės MKL egzistavimo, jų charakteristikų, mokslinėje bendruomenėje iki šiol išlieka prieštaravimų, susijusių su aptariamų ląstelių identifikavimu, kilme ir surinkimo metodais, todėl būtina toliau vykdyti šių sričių tyrimus.

1.10. Endometriumo pažaida

Vidinio gimdos sienelės sluoksnio, arba gleivinės – endometriumo, pažaida (*angl. endometrial scratching*) – paviršinis gimdos gleivinės pažeidimas specialia metodika.

2003 m. endometriumo pažaida pirmą kartą buvo įvardyta kaip procedūra, galinti padidinti blastocistos implantacijos endometriume dažnį ir todėl būti naudinga vaisingumo sutrikimų korekcijos atvejais (B. N. Bui *et al.*, 2018). Praėjus vieneriams metams, iš endometriumo audinio ėminių pirmą kartą buvo išskirtos ir charakterizuotos endometriumo kilmės MKL, kartu nurodant, kad jos yra išsidėsčiusios abiejuose endometriumo sluoksniuose – funkciniame ir pamatiniame (Chan *et al.*, 2004). Ėminiai, skirti MKL

išskyrimui iš endometriumo audinio, buvo surinkti po moterims atliktos histerektomijos. Beveik lygiagretus šių dviejų įvykių pasirodymas atkreipė mokslininkų ir gydytojų dėmesį dėl endometriumo pažaidos metodo pritaikymo kaip galimybės surinkti endometriumo kilmės MKL.

Endometriumo pažaida – ambulatorinė intervencinė procedūra, kuri gali būti atliekama prieš pagalbinio apvaisinimo moters kūne – intrauterininės inseminacijos (IUI), pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI ir atšildytų embrionų perkėlimo, bei planuotų lytinių santykių gydymo ciklus, siekiant padidinti nėštumo užsimezgimo tikimybę. Jeigu moters mėnesinių ciklas yra reguliarus (mėnesinių ciklo trukmė yra 28 dienos), optimalus procedūros atlikimo laikas yra 21-a mėnesinių ciklo diena (galimos ribos – 19–25-a mėnesinių ciklo diena) arba, kitaip tariant, po to, kai yra įvykusi ovuliacija ir iki naujo mėnesinių ciklo yra likusios apytikriai 7 dienos. Tais atvejais, kai mėnesinių ciklas yra nereguliarus, dėl endometriumo pažaidos atlikimo laiko yra sprendžiama individualiai. Manoma, kad šios procedūros poveikis tęsiasi apie 3 mėnesinių ciklus.

Endometriumo pažaidos atlikimas siekiant pagerinti vaisingumo sutrikimų gydymo rezultatus yra grindžiamas trimis hipotezėmis (Lensen *et al.*, 2021):

1. lokali endometriumo pažaida gali skatinti endometriumo stromos ląstelių decidualizaciją;
2. endometriumo pažaida sukelia žaizdos gijimo reakciją, apimančią imuninės sistemos ląstelių mobilizaciją į gijimo vietą. Reikšmingas citokinų, IL, augimo veiksnių, makrofagų, dendritinių ir NK ląstelių sutelkties padidėjimas daro teigiamą poveikį blastocistos implantacijos endometriume procesui;
3. endometriumo pažaida gali prisidėti prie embriono ir endometriumo sinchronijos užtikrinimo, išvengiant priešlaikinio endometriumo ląstelių subrendimo. Pagalbinio apvaisinimo gydymo ciklų metu atliekama kiaušidžių veiklos stimuliacija gali sukelti priešlaikinį endometriumo ląstelių subrendimą, lemiantį mažesnį endometriumo receptyvumą implantuojantis jame blastocistai.

2021 m. pristatytos *Cochrane* sisteminės apžvalgos, į kurią buvo įtraukti 35 klinikiniai tyrimai (8 915 moterys), vidutinio įrodymų lygmens rezultatų duomenimis, endometriumo pažaida IVF gydymo ciklų metu gali padidinti klinikinių nėštumų užsimezgimo dažnį iki 31–37 proc., o gyvų naujagimių gimimo dažnį – iki 27–32 proc., nesukeliant papildomos savaiminių persileidimų rizikos (Lensen *et al.*, 2021). Vis dėlto, reikia atlikti tolesnius šios srities tyrimus.

Diskusijos, susijusios su endometriumo pažaidos teigiamu poveikiu blastocistos implantacijos procesui, procedūros invazyvumas ir su tuo susijęs diskomfortas moterims paskatino tyrimus nukreipti į naują galimą endometriumo kilmės MKL šaltinį – mėnesinių kraujo ėminių surinkimą.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Bendroji informacija

Doktorantūros studijų metu vykdyti moksliniai darbai buvo biomedicininio tyrimo „Žmogaus endometriumo kilmės mezenchiminių kamieninių ląstelių terapinio potencialo tyrimai“, patvirtinto Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto sprendimu Nr. 158200-18/7-1049-550 (29/06/2018), sudedamosios dalys.

Dalyvių įtraukimo į mokslinius tyrimus kriterijai:

1. Moteriai planuojama atlikti pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklą dėl neaiškios kilmės nevaisingumo (tiriamųjų endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių atvejais):
   1.1. moteris yra 18–45 metų amžiaus;
   1.2. poros nevaisingumo trukmė yra bent 12 mėnesių laiko;
   1.3. moteris sutinka teikti informaciją apie sveikatos būklę, atliekamas diagnostines procedūras, taikomą gydymą bei jo rezultatus.
2. Moteris neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos sutrikimų (kontrolinių mėnesinių kraujo ėminių atvejais):
   2.1. moteris yra 20–35 metų amžiaus;
   2.2. moteris sutinka teikti informaciją apie sveikatos būklę, atliekamas diagnostines procedūras, taikomą gydymą bei jo rezultatus.

Dalyvių neįtraukimo į mokslinius tyrimus kriterijai:

1. Moteriai yra nustatytas nepiktybinis endometriumo darinys (-iai), pavyzdžiui, gimdos kūno polipas.
2. Moteriai paskutinių penkerių metų laikotarpiu buvo diagnozuota onkologinė ir (arba) reta liga.
3. Moteriai yra diagnozuota kita sveikatos patologija, kuri gali turėti neigiamą įtaką jos lytinei ir reprodukcinei sveikatai, nevaisingumo diagnostikai ir (arba) gydymo eigai bei rezultatams ir kuri šiuo metu nėra tinkamai kontroliuojama ir (arba) gydoma.
4. Moteris paskutinius 3 mėnesius vartojo egzogeninius hormoninius vaistus, tokius kaip gonadotropinus atpalaiduojančio hormono (GnRH) agonistai ir kt.
5. Moteris piktnaudžiauja arba turi priklausomybę alkoholiui, narkotinėms, psichotropinėms ir (arba) kitoms toksinėms medžiagoms ir (arba) turi kitų žalingų įpročių.

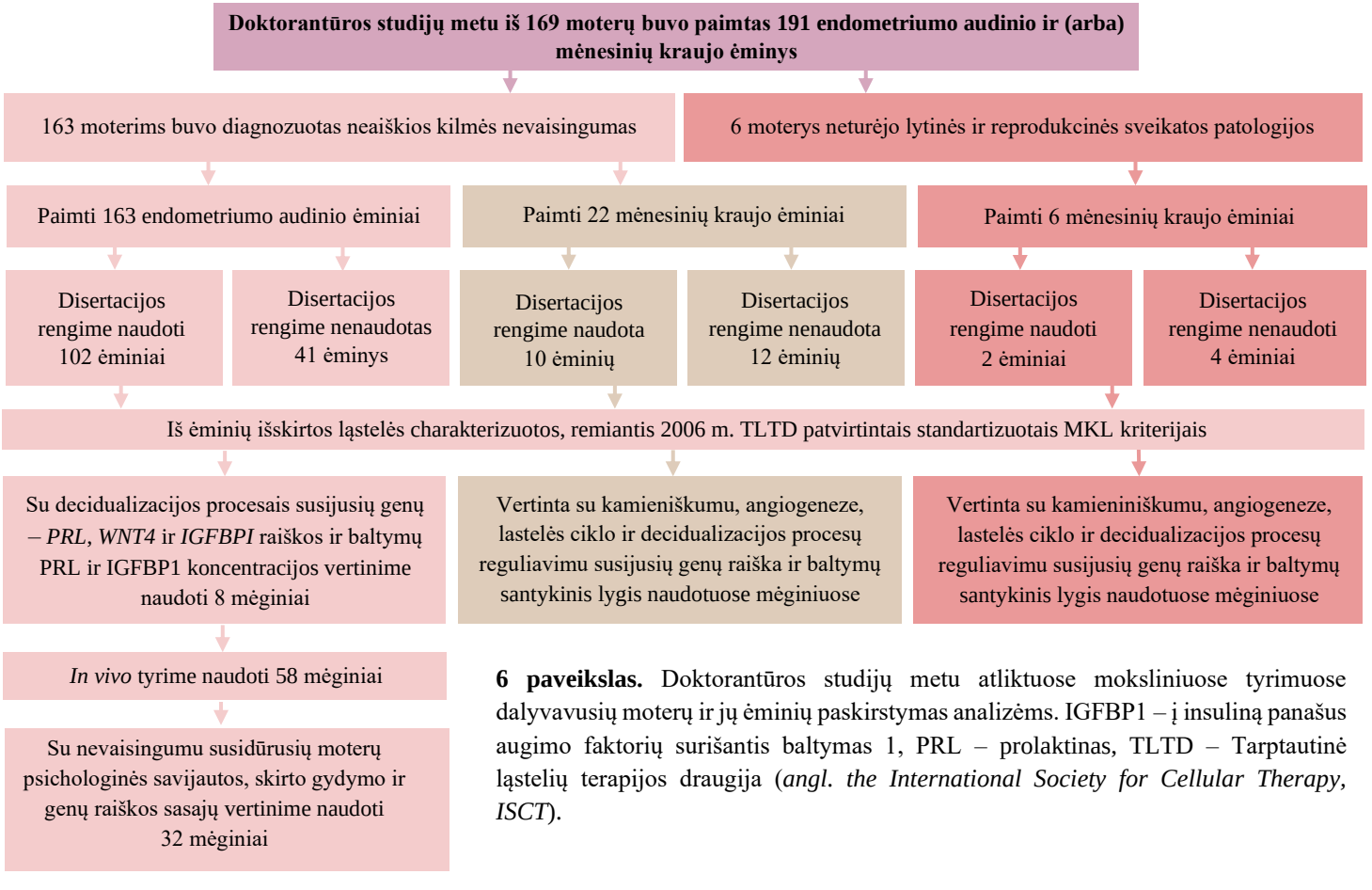
6. Moteris nesutinka teikti informaciją apie savo sveikatos būklę, atliekamas diagnostines procedūras, taikomą gydymą bei jo rezultatus.

Pagal patvirtintus kriterijus atrinktos potencialios biomedicininio tyrimo dalyvės žodine ir rašytine formomis buvo supažindintos su tyrimo tikslu, dalyvavimo ir pasitraukimo sąlygomis, nauda bei rizikomis, turėjo galimybę tyrėjui užduoti klausimus. Moterys sutikimą dalyvauti tyrime patvirtino laisva valia pasirašyta Informuoto asmens sutikimo forma.

Moterų, sudarančių neaiškios kilmės nevaisingumo grupę, endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminiai atsitiktinės atrankos tvarka buvo išskirstyti į naudojamus genų raiškos ir baltymų kiekio analizėje, *in vivo* tyrime bei su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės savijautos ir pastojimo rezultatų sąsajos genų raiškos lygmeniu vertinime (6 pav.).

Moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos, mėnesinių kraujo ėminiai atsitiktinės atrankos tvarka buvo išskirstyti į naudojamus genų raiškos ir baltymų santykinio lygio tyrimuose (6 pav.).

Siekiant išlaikyti mokslinių tyrimų dalyvių konfidencialumą, jų duomenys buvo nuasmeninti.



6 paveikslas. Doktorantūros studijų metu atliktuose moksliniuose tyrimuose dalyvavusių moterų ir jų ėminių paskirstymas analizėms. IGFBP1 – į insuliną panašus augimo faktorių surišantis baltymas 1, PRL – prolaktinas, TLTD – Tarptautinė ląstelių terapijos draugija (*angl. the International Society for Cellular Therapy, ISCT*).

2.2. Endometriumo audinio ėminių surinkimas

Doktorantūros studijų laikotarpiu vykdytų mokslinių tyrimų metu endometriumo pažaida buvo atlikta moterims, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centre.

Mėnesinių ciklo, kuriame buvo numatyta ši procedūra, metu pora turėjo naudoti barjerines kontracepcijos priemones. Kadangi endometriumo pažaida yra siejama su silpno ar vidutinio skausmo pasireiškimo galimybe, moterims buvo rekomenduota išgerti vaistų nuo skausmo iki intervencijos pradžios likus apie 60 min.

Endometriumo pažaida dažniausiai atlikta 19–25-ą mėnesinių ciklo dieną (apytikriai likus 7 dienoms iki naujo mėnesinių ciklo; esant nereguliariam mėnesinių ciklui, buvo sprendžiama individualiai). Procedūros metu gydytojas akušeris ginekologas per gimdos kaklelio žiotis ir kanalą įkišdavo 3 mm skersmens endometriumo pipelę *The Pipet Curet*^{TM} (*CooperSurgical, Inc. 95 Corporate Drive Trumbull, CT 06611,* JAV) (endometriumo pipelė – sterilus, plonas kateteris) į gimdos kūno ertmę iki dugno ir specialia metodika (judinant endometriumo pipelę pirmyn – atgal – ratu ir tuo pačiu metu išsiurbiant endometriumo audinio) atlikdavo gimdos gleivinės įbrėžimus. Įprasta procedūros trukmė – iki 30 sekundžių. Po procedūros buvo galimas trumpalaikis nestiprus tepimas kraujingomis išskyromis iš moters lytinių takų.

Surinkti endometriumo audinio ėminiai endometriumo pipelėje, vienodomis sąlygomis, buvo pristatyti į Vilniaus universiteto (VU) Gyvybės mokslų centro (GMC) Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją per 2 val. nuo paėmimo įvertinti EndMKL išskyrimą, charakterizavimą ir tolesnių tyrimų analizę.

2.3. Mėnesinių kraujo ėminių surinkimas

Mėnesinių kraujo ėminiai buvo imti iš dviejų grupių – moterų, kurioms planuotas IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centre, ir moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų.

Antrą – trečią mėnesinių ciklo kraujavimo dieną tyrimo dalyvės pagal gaminio naudojimo instrukciją į makštį įsikišdavo silikoninę menstruacinę

taurelę *DivaCup* (*Diva International Inc. 222 Mcintyre Drive Kitchener*, Ontarijas, Kanada). Praėjus 8–12 val. arba anksčiau (priklausomai nuo mėnesinių kraujavimo gausumo), tyrimo dalyvės pagal gaminio naudojimo instrukciją išsiimdavo silikoninę menstruacinę taurelę ir perduodavo tyrėjui supilti į 50 ml kūginį mėgintuvėlį. Vienos menstruacinės taurelės tūris – 8–10 ml.

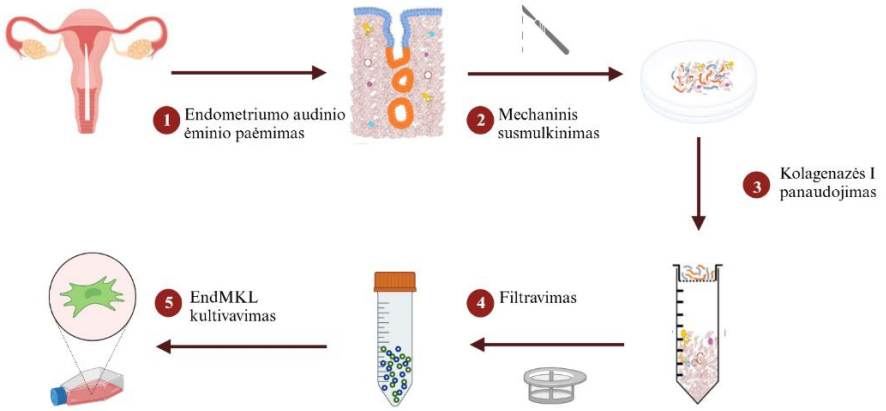
Mėnesinių kraujo ėminiai buvo apdoroti iš karto, o tais atvejais, kai jie buvo surinkti VUL SK, mėnesinių kraujas iš menstruacinės taurelės *DivaCup* buvo perpiltas į BD mėgintuvėlius su Na-heparinu ir tuomet pastarieji pristatyti į VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją tolesnei analizei.

2.4. Endometriumo kilmės MKL išskyrimas ir kultivavimas

Iš endometriumo pažaidos metu surinktų endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių MKL buvo išskirtos naudojant atitinkamus protokolus.

EndMKL išskyrimo iš endometriumo audinio ėminio etapai (Tavakol *et al.*, 2018; Tsolova *et al.*, 2022) (7 pav.):

1. endometriumo audinio ėminys paimamas endometriumo pažaidos (*angl. endometrial scratching*) metodu iš moterų, kurioms planuojamas pagalbinio apvasinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, apytikriai likus 7 dienoms iki naujo mėnesinių ciklo (esant nereguliariam mėnesinių ciklui, sprendžiama individualiai);
2. ėminys susmulkinamas mechaniniu būdu;
3. ėminys paveikiamas kolagenaze I, siekiant suardyti skirtingų ląstelių tipų tarpusavio ryšius;
4. išskirtos ląstelės filtruojamos per 40 μM *Falcon* ląstelių sietą, siekiant pašalinti epitelio ir liaukines ląsteles;
5. ląstelės, praėjusios filtrą praplaunamos buferiniu druskos tirpalu (PBS), centrifuguojamos 100 g 10 min. ir perkeliamos į ląstelių kultūrų auginimui skirtus plastikinius flakonus su pilnai paruošta *Dulbecco* modifikuotos *Eagle* terpės / mitybinio mišinio F-12 (DMEM/F12) terpe.



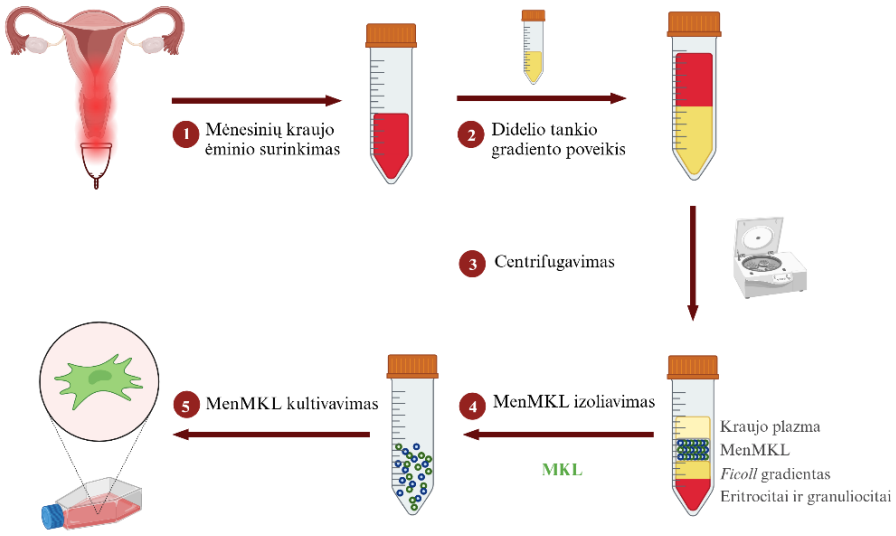
7 paveikslas. EndMKL išskyrimas iš endometriumo audinio ėminio. Pagal Tavakol *et al.* (2018) ir Tsolova *et al.* (2022). Adaptuota ir modifikuota naudojant *Biorender.com.*

MenMKL išskyrimo iš mėnesinių kraujo ėminio etapai (Tavakol *et al.*, 2018) (8 pav.):

1. mėnesinių kraujo ėminys surenkamas į sterilią menstruacinę taurelę *DivaCup* iš moterų, kurioms planuojamas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, ir moterų, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų. Surinktas ėminys perpilamas į 50 ml mėgintuvėlį su 2,5 µg/ml fungizono, 1 proc. penicilino ir streptomicino tirpalu, 0,5 mM etilendiamintetraacto rūgštimi (EDTA) ir PBS (santykis 1:4);

2–3. ėminys sluoksniuojamas ant didelio tankio gradiento ir centrifuguojamas 400 × g 20 min., siekiant atskirti leukocitų ir trombocitų sluoksnį nuo kitų komponentų;

4. virš didelio tankio gradiento esantis ėminio sluoksnis (MenMKL) atskiriamas, praplaunamas PBS, centrifuguojamas 1 000 × g 10 min.;
5. MenMKL perkeliamos į ląstelių kultūrų auginimui skirtus plastikinius flakonus su pilnai paruošta DMEM/F12 mitybine terpe.



8 paveikslas. MenMKL išskyrimas iš mėnesinių kraujo ėminio. Pagal Tavakol *et al.* (2018). Adaptuota ir modifikuota naudojant *Biorender.com.*

Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos EndMKL ir MenMKL buvo du kartus praplautos steriliu PBS tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV) ir pasėtos į 25/75 cm^2 tūrio ląstelių kultūrų auginimui skirtus plastikinius flakonus (1,6 x 10^4 ląstelių/cm^2) su DMEM/F12 mitybine terpe (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), papildyta 10 proc. fetaliniu jaučio serumu (FBS) (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV) bei 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), o flakonai perkelti į 37 °C termostatą su 5 proc. CO_2. Pasirodžius pirmosioms kolonijoms (0 pasažas) buvo pakeista mitybinė terpė, pašalintos neprikibusios ir žuvusios ląstelės. Prikibusių, suformavusių pirmųjų kolonijų ląstelių auginimas toliau tęstas šviežioje auginimo terpėje iki 90 proc. ląstelių suaugimo tankio, o jį pasiekus – persėtos kitam pasažui.

Vėlesnis ląstelių kultivavimas buvo atliktas vadovaujantis ta pačia metodika, tai yra – mitybinė terpė keista ląstelių suaugimui pasiekus 90 proc. (vidutiniškai kas 2–3 paras). Galiausiai, ląstelės buvo tripsinizuotos, naudojant 0,05 proc. tripsino-EDTA tirpalą (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), centrifuguotos ir resuspenduotos DMEM/F12 mitybinėje terpėje (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV).

Ląstelių kiekis ir gyvybingumas buvo vertintas kiekvieno ląstelių persėjimo metu, nudažius jas 0,4 proc. tripano mėliu (*Pharmacia LKB*, Upsala, Švedija) ir stebint per šviesinį mikroskopą (skaičiuojant

hematocitometro kameroje). Geltonai arba baltai švytinčios matomos ląstelės identifikuotos kaip gyvybingos, o tamsiai mėlynos – negyvos.

EndMKL ir MenMKL populiacijos dvigubėjimo lygis (PDL) buvo vertintas stebint ląstelių proliferaciją skirtingų pasažų metu ir apskaičiuotas pagal formulę (1):

$$PDL(X) = 3{,}32\ (log\left(\frac{Surinktos\ gyvybingos\ ląstelės}{Užsėtos\ gyvybingos\ ląstelės}\right)) + PDL(X-1), \quad (1)$$

čia X – pasažo numeris.

2.5. Endometriumo kilmės MKL charakteristikų vertinimas

Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos EndMKL ir MenMKL buvo charakterizuotos pagal 2006 m. TLTD patvirtintus standartizuotus kriterijus, skirtus apibrėžti MKL:

1. gebėjimą kibti prie plastiko paviršiaus;
2. teigiamą (≥ 95 proc.) ląstelių paviršiaus žymenų raišką: CD105, CD73, CD90, ir neigiamą (≤ 2 proc.) ląstelių paviršiaus žymenų raišką: CD45, CD34, CD14 arba CD11b, CD79a arba CD19, ŽLA-DR.
3. gebėjimą diferencijuoti adipogenine, chondrogenine ir osteogenine kryptimis.

Atliktų mokslinių tyrimų metu buvo ištirta šių ląstelių paviršiaus žymenų raiška (Priedas Nr. 1):

1. MKL paviršiaus žymenų: CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ir CD166;
2. kraujodaros ląstelių paviršiaus žymenų: CD34, CD45 ir CD117.

Po 30 min. inkubacijos su antikūnais, ląstelės buvo praplautos 2–3 kartus su PBS papildytu 1 proc. jaučio serumo albuminu (BSA) (*Sigma-Aldrich,* Sent Luisas, MO, JAV), resuspenduotos ir, jei tėkmės citometrija nebuvo atlikta iš karto, fiksuotos 100 µl PBS su 2 proc. paraformaldehidu (PFA) (*Sigma-Aldrich,* Sent Luisas, MO, JAV).

Ląstelių paviršiaus žymenų raiškos analizė buvo atlikta naudojant *Partec* tėkmės citometrą (*Sysmex Corporation,* Kobė, Hioko, Japonija) su *Flowing Software 2* programine įranga.

2.6. Endometriumo kilmės MKL diferenciacija

Ląstelių diferenciacija skirtingomis kryptimis buvo atlikta 37 ^{o}C temperatūroje 5 proc. CO_2 sąlygomis, o jos indukcija ir vertinimas aprašytas toliau:

1. Adipogenė diferenciacija indukuota naudojant 4,5 g/l gliukozės DMEM (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV) su 1 proc. penicilino ir streptomicino tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), 1 μM deksametazonu (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV), 60 μM indometacinu (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas. MO, JAV) ir 0,5 mM 3-izobutil-1-metilksantinu (IBMX) (*Sigma-Aldrich*, Sent Luisas, MO, JAV). Ląstelės augintos diferenciacijos terpėje iki 14 dienų, rezultatas vertintas *Oil Red O* dažymu.
2. Osteogeninė diferenciacija indukuota naudojant 1 g/l gliukozės DMEM (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV) su 1 proc. penicilino ir streptomicino tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), 10 proc. BSA (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), 0,1 μM deksametazonu (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV), 50 μg/ml askorbo rūgštimi (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV) ir 10 mM β-glicerofosfatu (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV). Ląstelės augintos diferenciacijos terpėje iki 21 dienos, rezultatas vertintas *Alizarin Red* dažymu.
3. Chondrogeninė diferenciacija indukuota naudojant 4,5 g/l gliukozės DMEM (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV) su 1 proc. penicilino ir streptomicino tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), 0,1 μM deksametazonu (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV), 50 μg/ml askorbo rūgštimi (*Cayman Chemical Company*, An Arboras, MI, JAV), 1X ITS (*PeproTech*, Londonas, Didžioji Britanija), 1 mM natrio piruvatu (*Genaxxon bioscience*, Ulmas, Vokietija) ir 0,35 mM prolinu (*Genaxxon bioscience*, Ulmas, Vokietija). Ląstelės augintos diferenciacijos terpėje iki 32 dienų, rezultatas vertintas morfologijos pokyčiais.
4. Decidualizacija indukuota naudojant RPMI 1640 (*Hyclone Laboratories*, Loganas, UT, JAV) su 2 proc. BSA, apdorotu anglimi (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham*,

MA, JAV), 1 proc. penicilino ir streptomicino tirpalu (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham,* MA, JAV*)*, 0,5 mM 8-bromo-cAMP (*Cayman Chemical Company,* An Arboras, MI, JAV) ir 1 μM medroksiprogesterono acetatu (MPA) (*Cayman Chemical Company,* An Arboras, MI, JAV). Ląstelės augintos diferenciacijos terpėje iki 3 dienų ir 6 dienų, rezultatas vertintas remiantis ląstelių morfologijos pokyčiais, matomais šviesos mikroskopu *EVOS*™ (*Thermo Fisher Scientific, Waltham*, MA, JAV), ir RT-kPGR bei *ELISA* metodais.

2.7. Genų raiškos vertinimas RT-kPGR metodu

RNR iš endometriumo kilmės MKL buvo išskirta su *TRIzol* reagentu (*Invitrogen,* Karlsbadas, CA, JAV), naudojant chloroformą ir izopropanolį pagal gamintojo rekomendacijas.

Pelių patelių gimdos rago audinių ląstelių mėginiai RT-kPGR tyrimams buvo paruošti naudojant komercinį rinkinį *Quick-DNA/RNR Miniprep Kit* (*Zymo Research,* CA, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas.

Atvirkštinė transkripcija į kopijinę arba komplementarią DNR (kDNR) visais atvejais buvo atlikta naudojant *SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit* (*Bioline,* Londonas, Didžioji Britanija), *LunaScript® RT SuperMix Kit* (*New England Biolabs,* Ipsvičas, MA, JAV) arba *Luna® Universal One-Step the reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) Kit* (*New England Biolabs,* Ipsvičas, MA, JAV) sintezės rinkinius pagal gamintojo rekomendacijas.

RT-kPGR buvo atlikta naudojant *SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit* (*Bioline Memphis, TN,* JAV) ir *Luna® Universal qPCR Master Mix* (*New England Biolabs,* Ipsvičas, MA, JAV) rinkinius *Rotor-Gene™ 6000 Real-time Analyzer* sistemoje (*Corbett Life Science, QIAGEN,* Hildenas, Vokietija) atitinkamomis sąlygomis.

Genų raiškos lygis standartizuotas pagal *GAPDH* geno (moterų genų tyrimuose; *Abcam,* Kembridžas, Didžioji Britanija) arba *18S* geno (pelių patelių genų tyrimuose; *metabion international AG, Planegg,* Vokietija) lygį. Santykinė genų raiška vertinta lyginamuoju ΔΔCt metodu.

RT-kPGR buvo naudoti Priede Nr. 2 išvardyti pradmenys (5’ – > 3’ orientacija).

2.8. Baltymų išskyrimas ir imunoanalizė *Western blot* metodu

Endometriumo kilmės MKL, skirtos baltymų imunoanalizei *Western blot* metodu, nuo paviršiaus struktūros buvo atkabintos naudojant 0,05 proc. tripsino-EDTA tirpalą (*Gibco, Life Technologies*, NY, JAV*)*. Po to surinktos ląstelės (1–1,5 × 10^6 ląstelių vienam pavyzdžiui) 2 kartus praplautos šaltu PBS tirpalu (*Genaxxon bioscience*, Ulmas, Vokietija), 30 min. inkubuotos benzonaze (*Merck,* Darmštatas, Vokietija) ledo vonelėje ir galiausiai iki pirminės – linijinės struktūros lizuotos natrio dodecilsulfato (SDS) buferyje (sudėtis – 62,5 mM Tris, 100 mM ditiotreitolis (DTT), 2 proc. SDS, 10 proc. glicerolis ir bromfenolio mėlynojo pėdsakai; pH 6,8). Homogenizuotas mėginys inkubuotas 5 min. 95 ^oC ir nusodintas centrifuguojant 20,000 × g greičiu 15 min. 4 ^oC. Jei elektroforezė nebuvo atlikta iš karto, supernatantas saugotas -20 ^oC.

Baltymai buvo frakcionuoti 7–15 proc. natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio (SDS-PAGE) elektroforezės sistemoje. SDS elektroforezei naudotas Tris-glicino buferinis tirpalas (sudėtis – 0,025 M Tris-bazės, 0,192 M glicino, 0,1 proc. SDS; pH 8,5).

Western blot analizė atlikta naudojant antikūnus prieš p53, p21, cikliną A2, Bcl-2 susijusį X-baltymą (Bax), CEBPβ, *zeste* homologo 2 stipriklį (Ezh2), *zeste* homologo 12 slopiklį (Suz12), histono deacetilazę 1 (HDAC1), HyperAcH4 ir H3K27me3 pagal gamintojo rekomendacijas. GAPHD baltymo lygis naudotas baltymo lygio kontrolei (*Abcam*, Kembridžas, Didžioji Britanija). Tyrime naudoti atitinkami antriniai antikūnai (prieš pelių arba triušių antikūnus), konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP) (*DAKO,* Glostrupas, Danija). *Western blot* analizės antikūnių sąrašas pateiktas Priede Nr. 3.

Chemiliuminescencijos aptikimui naudotas *Clarity Western ECL Substrate* rinkinys (*BIORAD, Hercules*, CA, JAV), signalas nustatytas *ChemiDoc XRS+ System* (*BIORAD, Hercules*, CA, JAV) sistema. Išryškintų baltymų juostelių densitometrinė analizė atlikta *ImageJ* programa *(NIH,* MD, JAV*).*

2.9. Baltymų nustatymas ir imunofermentinė analizė *ELISA* metodu

Atlikus 6 dienų trukmės endometriumo kilmės MKL diferenciaciją decidualine kryptimi, pagrindinių sėkmingos decidualizacijos žymenų – IGFBP1 ir PRL baltymų kiekis terpėje buvo vertintas imunofermentinės analizės metodu – *ELISA*.

IGFBP1 koncentracijai nustatyti naudotas komercinis *Mediagnost IGFBP-1 ELISA* rinkinys (*Mediagnost*, Vokietija), o PRL koncentracijai – komercinis *DiaMetra Prolactin ELISA* rinkinys (*DiaMetra S.r.l*, Italija). Visos procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtų baltymų kiekis normalizuotas pagal bendrą ląstelių baltymų kiekį.

ELISA 96 šulinio plokštelė buvo išmatuota naudojant plokštelių skaitytuvą *Infinite M200 Pro* su *i-control 1.5* programine įranga (*Tecan, Männedorf*, Šveicarija). Optinis tankis išmatuotas esant 450 nm ir 630 nm ilgio bangoms, kalibravimo kreivė nubraižyta pagal pateiktus žinomus koncentracijų standartus ir apskaičiuotos IGFBP1 ir PRL baltymų koncentracijos (ng/ml).

2.10. Endometriumo kilmės MKL terapinio poveikio vertinimas *in vivo* tyrime

2.10.1. Bendroji informacija

In vivo tyrimas „Kamieninių ląstelių naudojimo endometriumo regeneracijai galimybės“ buvo atliktas VU GMC Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriuje (Veterinarinio patvirtinimo Nr. LT 59-13-001, LT 60-13-001, LT 61-13-004), gavus Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (VMVT) leidimą Nr. G2-115 (2019 m. gegužės 20 d.), suteikiantį teisę vykdyti eksperimentus su gyvūnais. Genetiškai modifikuotų pelių naudojimo tyrimams tikslu gautas Lietuvos Respublikos aplinkos ministerijos leidimas Nr. RN-33 (2020 m. balandžio 8 d.). Visi eksperimentai ir reikalingos procedūros buvo vykdytos laikantis bandomųjų gyvūnų gerovės rekomendacijų, nurodytų Direktyvoje 2010/63/ES, ir darbo su bandomaisiais gyvūnais reikalavimų, reglamentuotų VMVT direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1–866.

Prieš *in vivo* tyrimo atlikimą doktorantė Raminta Baušytė 2020 m. rugsėjo 2 d. – 2021 m. sausio 26 d. VU GMC išklausė „Laboratorinių (bandomųjų) gyvūnų mokslo“ kursą ir išlaikė egzaminą raštu.

In vivo tyrime buvo naudotos iš *JANVIE LABS* (Prancūzija) įsigytos *NOD.CB-17-Prkdc scid/Rj* linijos 6 savaičių amžiaus pelių patelės, sveriančios 18 g ± 0,5 g. Atsivežus pelių pateles į VU GMC, joms skirtas 7 dienų trukmės karantino laikotarpis. Laboratoriniai gyvūnai laikyti individualiuose, pritaikytuose narveliuose. Patalpose palaikyta kontroliuojama aplinka: 22 °C ± 1 °C kambario temperatūra, 55 proc. ± 3 proc. santykinė oro drėgmė bei 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos režimas. Pelių patelės *ad libitum* šertos komerciniu subalansuotu pašaru

graužikams (*Mucedola S. R. L.,* Milanas, Italija) ir turėjo laisvą prieigą prie vandens.

Prieš intervencinių procedūrų atlikimą pelių patelėms buvo sukelta anestezija. Anestezijai naudota EZ-SA800 anestezijos sistema (*E-Z Systems*, Palmeris, PA, JAV), o jos inicijavimui laboratoriniai gyvūnai buvo laikyti 3 proc. izoflurano (*Vetpharma,* Barselona, Ispanija) ir medicininio deguonies (0,6 l/min.) (*Elme Messer LIT,* Vilnius, Lietuva) mišiniu pripildytoje kameroje nuo 5 min. iki 10 min. Anestezuotos pelių patelės perkeltos ant šildomo operacinio stalo (37 °C) ir švelniai imobilizuotos. Procedūrų metu (nuo 5 min. iki 20 min.) anestezija buvo palaikyta 0,5–1 proc. izoflurano koncentracija.

Visi intervenciniai veiksmai vykdyti steriliomis sąlygomis, remiantis ankstesniuose moksliniuose tyrimuose naudota metodologija ir medžiagomis (Hu *et al.*, 2019; B. Li *et al.*, 2019; Reig *et al.*, 2019).

Pasibaigus atitinkamo tyrimo etapui, pelių pelės buvo įvykdyta eutanazija dujų kameroje, palaipsniui didinant medicininio CO_2 (*Elme Messer LIT*, Vilnius, Lietuva) koncentraciją iki 8 l/min., ir po to atliekant cervikalinę dislokaciją. Po mirties buvo išpreparuoti pelių patelių gimdos ragai ir perduoti tolesnei analizei.

In vivo tyrimo metu pelių patelės į tiriamąsias grupes buvo išskirstytos atsitiktinės atrankos tvarka.

2.10.2. Pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaninių būdu, grupė

Mechaniniu būdu gimdos rago ertmė buvo paveikta 23 pelių patelėms. Visais atvejais poveikis atliktas tik vienos pusės gimdos rage (dešiniajame). Šios pelių patelių grupės suformavimas ir paskirstymas detaliau apžvelgtas tolesniame tekste.

Pirmasis žingsnis buvo įsitikinti, kad pelė patelė yra anestezuota. Po to buvo steriliai paruoštas operacinis laukas, pasluoksniui atverta pilvo ertmė ir adatos Nr. 21 antgalis atsargiai įstumtas į jungtį tarp dešiniojo ir kairiojo gimdos ragų, nukreipiant jį į dešiniojo gimdos rago ertmę. Dešiniojo gimdos rago ertmė buvo subraižyta judesiu pirmyn – atgal – ratu iki hiperemijos (apie 10 kartų), kartu išlaikant gimdos rago vientisumą. Po procedūros laboratorinių gyvūnų audiniai susiūti pasluoksniui. Praėjus 7 dienoms, šios pelės patelės buvo išskirstytos į atitinkamas grupes (9 pav.):

1. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragų ėminiai formaldehido tirpale perduoti histologiniams pokyčiams vertinti, naudojant HE ir trispalvio

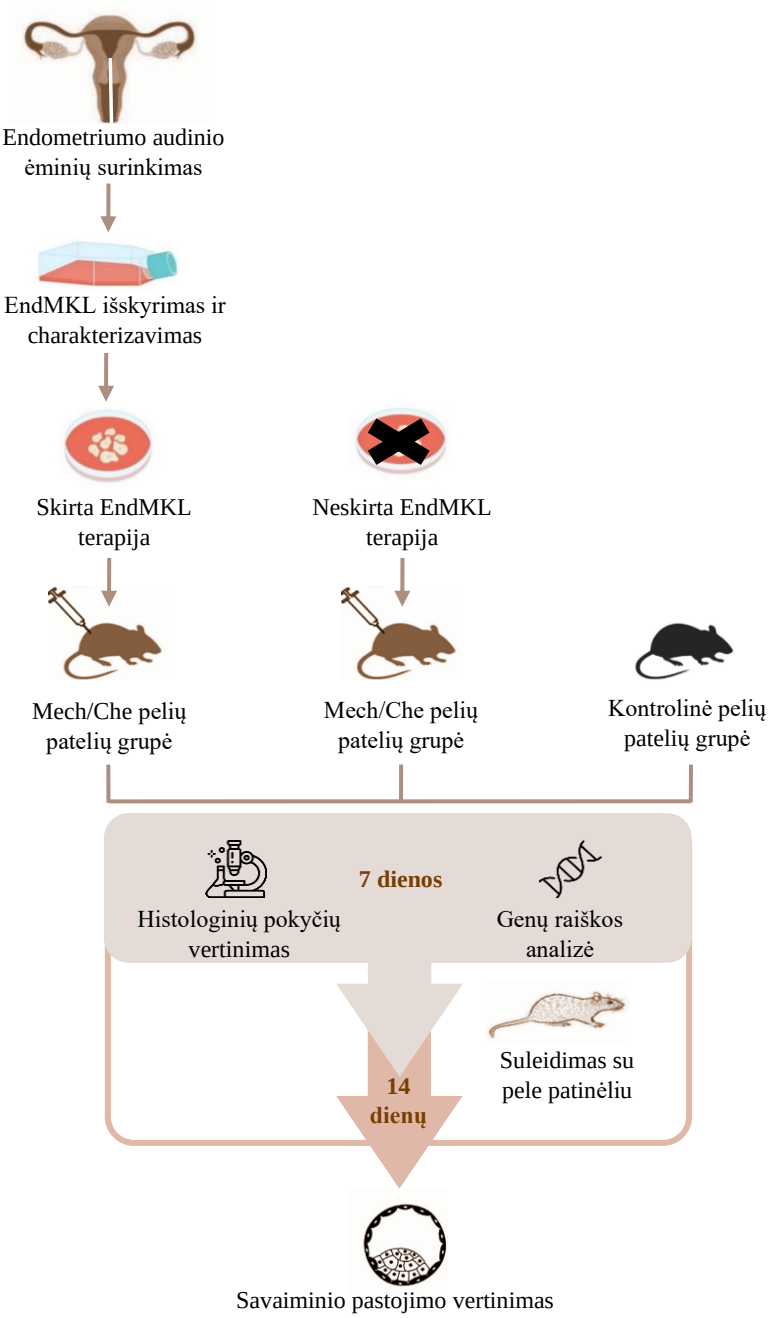
dažymo *Masson Trichrome* metodą, į Valstybinį patologijos centrą, VUL SK filialą;

2. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragų ėminiai perduoti genų raiškai vertinti į VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją;
3. pelių patelių grupę, kuri toliau 2 savaitėms buvo suleista su pelėmis patinėliais, siekiant įvertinti savaiminio pastojimo galimybę. Praėjus numatytam laikui, pelių patelėms buvo atlikta eutanazija, o jų vaisingumas vertintas vizualiniu metodu, atsižvelgiant į embrionų implantacijos vietų skaičių išpreparuotuose gimdos raguose;
4. pelių patelių grupę, kuriai buvo skirta endometriumo kilmės MKL terapija. Praėjus 7 dienoms nuo endometriumo patologijos sukėlimo mechaniniu būdu, specialiai paruošta endometriumo kilmės MKL suspensija ($0{,}5 \times 10^6$ ląstelių/20 µl PBS) buvo tiesiogiai suleista į dešiniojo tiriamosios pelės patelės gimdos rago ertmę. Po 7 dienų ši pelių patelių grupė buvo papildomai išskirstyta:
    4.1. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragų ėminiai formaldehido tirpale perduoti histologiniams pokyčiams vertinti, naudojant HE ir trispalvio dažymo *Masson Trichrome* metodą, į Valstybinį patologijos centrą, VUL SK filialą;
    4.2. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragų ėminiai perduoti genų raiškai vertinti į VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją;
    4.3. pelių patelių grupę, kuri toliau 2 savaitėms buvo suleista su pelėmis patinėliais, siekiant įvertinti savaiminio pastojimo galimybę. Praėjus numatytam laikui, pelių patelėms buvo atlikta eutanazija, o jų vaisingumas vertintas vizualiniu metodu, atsižvelgiant į embrionų implantacijos vietų skaičių išpreparuotuose gimdos raguose.

In vivo tyrimo pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, grupių pavadinimai priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo:

1. pelių patelių grupė, kuriai neskirta EndMKL terapija, – Mech pelių patelių grupė / Mech grupė;

2. pelių patelių grupė, kuriai skirta EndMKL terapija, – Mech-EndMKL pelių patelių grupė / Mech-EndMKL grupė.



9 paveikslas. *In vivo* tyrimo modelis. Mech/Che – pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu (Mech) arba kurioms skirta chemoterapija (Che), grupės. Paveikslo figūros panaudotos iš *Shutterstock* duomenų bazės.

2.10.3. Pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, grupė

Chemoterapija skirta 24 pelių patelėms. Šios pelių patelių grupės suformavimas ir paskirstymas detaliau apžvelgtas tolesniame tekste.

Pirmasis žingsnis buvo įsitikinti, kad pelė patelė yra anestezuota. Tuomet buvo steriliai paruoštas operacinis laukas ir intraperitoniniu būdu, stengiantis nepažeisti vidaus organų, vienkartinai suleistos 120 mg/kg ciklofosfamido (*Baxter Oncology GmbH,* Halė, Vokietija) ir 30 mg/kg busulfano (*Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Friedberg,* Vokietija) dozės. Po 7 dienų šios pelės patelės buvo išskirstytos į atitinkamas grupes (9 pav.):

1. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragai formaldehido tirpale perduoti histologiniams pokyčiamas vertinti, naudojant HE ir trispalvio dažymo *Masson Trichrome* metodą, į Valstybinį patologijos centrą, VUL SK filialą;
2. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragai perduoti genų raiškai vertinti į VU GMC Biochemijos instituo Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją;
3. pelių patelių grupę, kuri toliau 2 savaitėms buvo suleista su pelėmis patinėliais, siekiant įvertinti savaiminio pastojimo galimybę. Praėjus numatytam laikui, pelių patelėms buvo atlikta eutanazija, o jų vaisingumas vertintas vizualiniu metodu, atsižvelgiant į embrionų implantacijos vietų skaičių išpreparuotuose gimdos raguose;
4. pelių patelių grupę, kuriai buvo skirta EndMKL terapija. Praėjus 7 dienoms nuo chemoterapijos skyrimo, specialiai paruošta EndMKL suspensija ($0{,}5 \times 10^6$ ląstelių/20 µl PBS) buvo tiesiogiai suleista į dešinįjį tiriamosios pelės patelės gimdos ragą. Po 7 dienų ši pelių patelių grupė buvo papildomai išskirstyta į:
    4.1. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragai formaldehido tirpale perduoti histologiniams pokyčiams vertinti, naudojant HE ir trispalvio dažymo *Masson Trichrome* metodą, į Valstybinį patologijos centrą, VUL SK filialą;
    4.2. pelių patelių grupę, kuriai buvo atlikta eutanazija, o išpreparuoti jų gimdos ragai perduoti genų raiškai vertinti į VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratoriją;

4.3. pelių patelių grupę, kuri toliau 2 savaitėms buvo suleista su pelėmis patinėliais, siekiant įvertinti savaiminio pastojimo galimybę. Praėjus numatytam laikui, pelių patelėms buvo atlikta eutanazija, o jų vaisingumas vertintas vizualiniu metodu, atsižvelgiant į embrionų implantacijos vietų skaičių išpreparuotuose gimdos raguose.

In vivo tyrimo pelių patelių, kurioms buvo leista chemoterapija, grupių pavadinimai priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo:

1. pelių patelių grupė, kuriai neskirta EndMKL terapija – Che pelių patelių grupė / Che grupė;
2. pelių patelių grupė, kuriai skirta EndMKL terapija, – Che-EndMKL pelių patelių grupė / Che-EndMKL grupė.

2.11. Su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės savijautos vertinimas

Doktorantūros studijų metu buvo vertinta moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, psichologinė savijauta, naudojant specialią nerimo ir depresijos vertinimo – HAD skalę (*angl. the Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS*).

HAD skalė – tai patikima ir plačiai naudojama nerimo ir depresijos sutrikimų atrankos anketa, skirta įvertinti ne psichikos sutrikimų turinčių asmenų psichologinę savijautą bendro profilio ir specializuotose ne psichiatrijos medicinos įstaigose. HAD skalė gali būti panaudota ir emocinių sutrikimų sunkumui bei depresijos ir nerimo simptomų kitimui gydymo metu įvertinti. Šią skalę 1983 m. pasiūlė anglų psichiatrai *A. S. Zigmond* ir *R. P. Snaith* (Zigmond & Snaith, 1983), o 1991 m. ji buvo išversta į lietuvių kalbą ir iki šiol plačiai naudojama mokslo tiriamuosiuose darbuose (Priedas Nr. 4).

HAD skalės atlikimas yra pagrįstas savęs vertinimu. Ją sudaro 14 klausimų:

1. 7 yra skirti nerimo simptomams vertinti (HAD-N poskalė, klausimai Nr. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13);
2. 7 yra depresijos simptomams vertinti (HAD-D poskalė, klausimai Nr. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14).

Kiekvienas klausimas yra vertinamas keturių balų skale nuo 0 (požymio nejaučiama) iki 3 (požymis jaučiamas labai stirpiai). Asmens yra prašoma pažymėti atsakymą, kuris artimiausias jo savijautai per praėjusią savaitę. Baigus testavimą, HAD-N ir HAD-D balai sumuojami, didžiausia

poskalės balų suma – 21 balas. Nerimo arba depresijos sunkumo laipsnis vertinamas pagal atitinkamos poskalės rezultatą:

1. 0–7 balai – nestiprus nerimas arba nesunki depresija;
2. ≥ 8 balai – stiprus nerimas arba sunki depresija.

Aukštesni balai rodo didesnį nerimo ir depresijos lygį.

Nerimo nustatymo jautrumas – 0,9, specifiškumas – 0,78, o depresijos nustatymo jautrumas – 0,83, specifiškumas – 0,79 (Bjelland *et al.,* 2002).

Studijuojant doktorantūroje vykdytame tyrime HAD skalės nerimo poskalės *Cronbach α* buvo 0,799, o depresijos poskalės – 0,694.

2.12. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta *GraphPadPrism* programa (*GraphPad Software,* JAV).

Statistinis patikimumas vertintas naudojant dispersijos analizę (*ANOVA*), *Bonferroni*, *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney* ir *Tukey* kriterijus bei t-testą (*Holm-Sidak* metodą). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± standartinis nuokrypis (SD), apskaičiuotas iš kelių (dažniausiai trijų) nepriklausomų bandymų. Reikšmės vertintos kaip statistiškai patikimos, kai $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

Siekiant nustatyti su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės sveikatos, joms atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų ir genų raiškos rezultatų tarpusavio sąsajas, buvo atlikta koreliacinė analizė. Tinkamui statistinio metodo pasirinkimui vertintas duomenų normalumas, remiantis *Kolmogorovo-Smirnovo* testu. Kadangi gauti rezultatai netenkino duomenų normalumo reikalavimų ($p < 0,05$), jų sąsajoms nustatyti buvo naudotas neparametrinis Spirmeno (*Spearman*) ranginės koreliacijos koeficientas.

Koreliacijos koeficiento reikšmės kinta nuo -1 iki 1. Įgyjamos absoliučios koreliacijos koeficiento reikšmės rodo ryšio stiprumą, o ženklas rodo ryšio pobūdį – kintamųjų ryšys yra neigiamas ar teigiamas. Kai ryšys teigiamas, didėjant vieno požymio reikšmėms, kito požymio reikšmės taip pat didėja. Kai ryšys neigiamas, didėjant vieno kintamojo reikšmėms, kito kintamojo reikšmės mažėja.

Ryšio pobūdžio ir stiprumo vertinimas pagal įgyjamas Spirmeno (*Spearman*) ranginės koreliacijos koeficiento vertes pateiktas Priede Nr. 5.

3. REZULTATAI

Endometriumo audinio ėminiai buvo surinkti endometriumo pažaidos metodu iš moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centre. Procedūros metu ir po jos moterys jautė trumpalaikį diskomfortą, buvo negausus tepimas kraujingomis išskyromis iš lytinių takų. Kitų šalutinių reiškinių ir (arba) komplikacijų nepasireiškė.

Mėnesinių kraujo ėminiai buvo surinkti į silikonines menstruacines taureles *DivaCup* iš dviejų moterų grupių: moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI gydymo ciklas arba atšildytų embrionų perkėlimo į apvaisinamos moters gimdos ertmę gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centre, ir moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sistemos sutrikimų.

Moksliniai tyrimai, kurių metu buvo naudoti surinkti endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminiai, buvo atlikti VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus laboratorijoje.

Histologiniai pelių patelių gimdos rago audinių tyrimai buvo atlikti Valstybiniame patologijos centre, VUL SK filiale.

3.1. Endometriumo kilmės MKL charakterizavimas

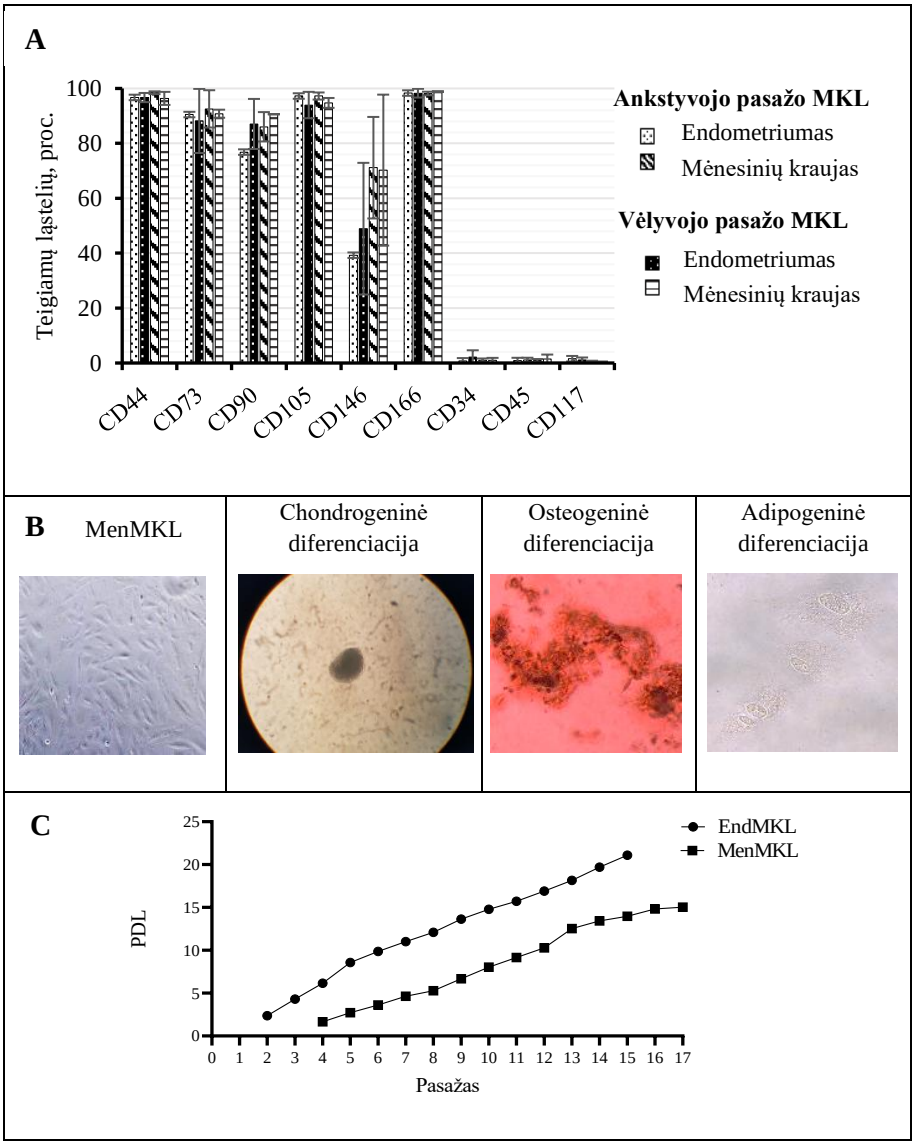
MKL iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių buvo išskirtos pagal *Tavakol* su kolegomis ir *Tsolova* su kolegomis sudarytus protokolus (Tavakol *et al.*, 2018; Tsolova *et al.*, 2022). Išskirtos ląstelės charakterizuotos remiantis 2006 m. TLTD patvirtintais standartizuotais MKL identifikavimo kriterijais (Dominici *et al.*, 2006).

Pirma, tėkmės citometrijos metodu įvertinus iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtų ląstelių paviršiaus molekulių raišką buvo nustatyta, kad šios ląstelės pasižymi (10 pav. A) (Valatkaitė *et al.*, 2021):

1. teigiama MKL būdingų paviršiaus žymenų CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ir CD166 raiška. Dalimi atvejų netgi ≥ 95 proc. ląstelių populiacijos pasižymėjo stipriai teigiama jų raiška. Teigiama ląstelių paviršiaus molekulių CD73, CD90 ir CD105 raiška atspindi MKL tipą, o teigiama ląstelių paviršiaus žymenų CD146 ir CD166 raiška yra būdinga stromos ląstelėms;

2. neigiama (≤ 1 proc.) kraujodaros kamieninėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų CD34, CD45 ir CD117 raiška.

Nustatant ląstelių paviršiaus molekulių raišką, nestebėta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp ankstyvųjų (2–7-o) ir vėlyvųjų (15–19-o) pasažų.



10 paveikslas. Endometriumo kilmės MKL charakterizavimas ir proliferacijos įvertinimas. **(A)** Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtų ląstelių paviršiaus žymenų raiškos analizė remiantis 2006 m. Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos (TLTD) patvirtintais standartizuotais MKL identifikavimo kriterijais (Dominici *et al.*, 2006). MKL būdingų paviršiaus žymenų CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ir CD166 raiška ir kraujodaros kamieninėms ląstelėms būdingų

paviršiaus žymenų CD34, CD45 ir CD117 raiška buvo įvertinta ankstyvuosiuose (2–7-ame) ir vėlyvuosiuose (15–19-ame) pasažuose tėkmės citometrijos metodu. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD (*n = 3*). **(B)** MenMKL diferenciacija chondrogenine, osteogenine ir adipogenine kryptimis. MenMKL – kontrolinės ląstelės. Chondrogeninė diferenciacija įvertinta po 32 ląstelių auginimo dienų, remiantis morfologijos pokyčiais. Osteogeninė diferenciacija įvertinta po 21 ląstelių auginimo dienos, naudojant *Alizarin Red* dažymą. Adipogeninė diferenciacija įvertinta po 14 ląstelių auginimo dienų, naudojant *Oil Red O* dažymą. **(C)** EndMKL ir MenMKL *in vitro* proliferacijos potencialas. Grafike pavaizduotas populiacijos dvigubėjimo lygis (PDL) ląsteles auginant iki 15-o (EndMKL) ir 17-o (MenMKL) pasažo. Pagal Skliutė, Baušytė *et al.* (2021) ir Valatkaitė, Baušytė *et al.* (2021).

Antra, vertinant išskirtų ląstelių diferenciacijos osteogenine, chondrogenine ir adipogenine kryptimis galimybes, buvo patvirtinta, kad išskirtoms ląstelėms yra būdinga diferenciacija chondrogenine ir osteogenine kryptimis, esant mažesniam jos potencialui adipogenine kryptimi (10 pav. B) (Skliutė *et al.* 2021). Trečia, nustatyta, kad iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės pasižymi kibimo prie plastiko paviršiaus savybe (Skliutė *et al.* 2021; Valatkaitė *et al.*, 2021).

Apibendrinus pirmiau pateiktus rezultatus, galima teigti, kad iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės atitinka 2006 m. TLTD patvirtintus standartizuotus MKL identifikavimo kriterijus.

Paminėtina, kad atliktų mokslinių tyrimų metu buvo įvertintas ir ląstelių proliferacijos greitis, remiantis jų gyvybingumu ir PDL (10 pav. C). Nustatyta, kad EndMKL dvigubėjimo laikas ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų metu buvo 2,5 d. ± 0,3 d., o MenMKL – 3 d. ± 0,2 d. be statistiškai reikšmingo skirtumo. Tai įrodo aukštą aptariamų jų proliferacijos potencialą.

3.2. Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi įvertinimas

Doktorantūros studijų metu atlikti moksliniai tyrimai siekiant įvertinti iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtų endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi galimybes, remiantis:

1. ląstelių morfologijos pokyčiais;
2. su decidualizacija susijusių genų – *PRL*, *WNT4* ir *IGFBP1* raiška;
3. decidualizacijai svarbių baltymų – PRL ir IGFBP1 koncentracija.

Endometriumo kilmės MKL diferenciacija decidualine kryptimi buvo indukuota 8-bromo-cAMP ir MPA reagentais. Pokyčiai įvertinti lyginamąja analize, praėjus 3 ir 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos pradžios.

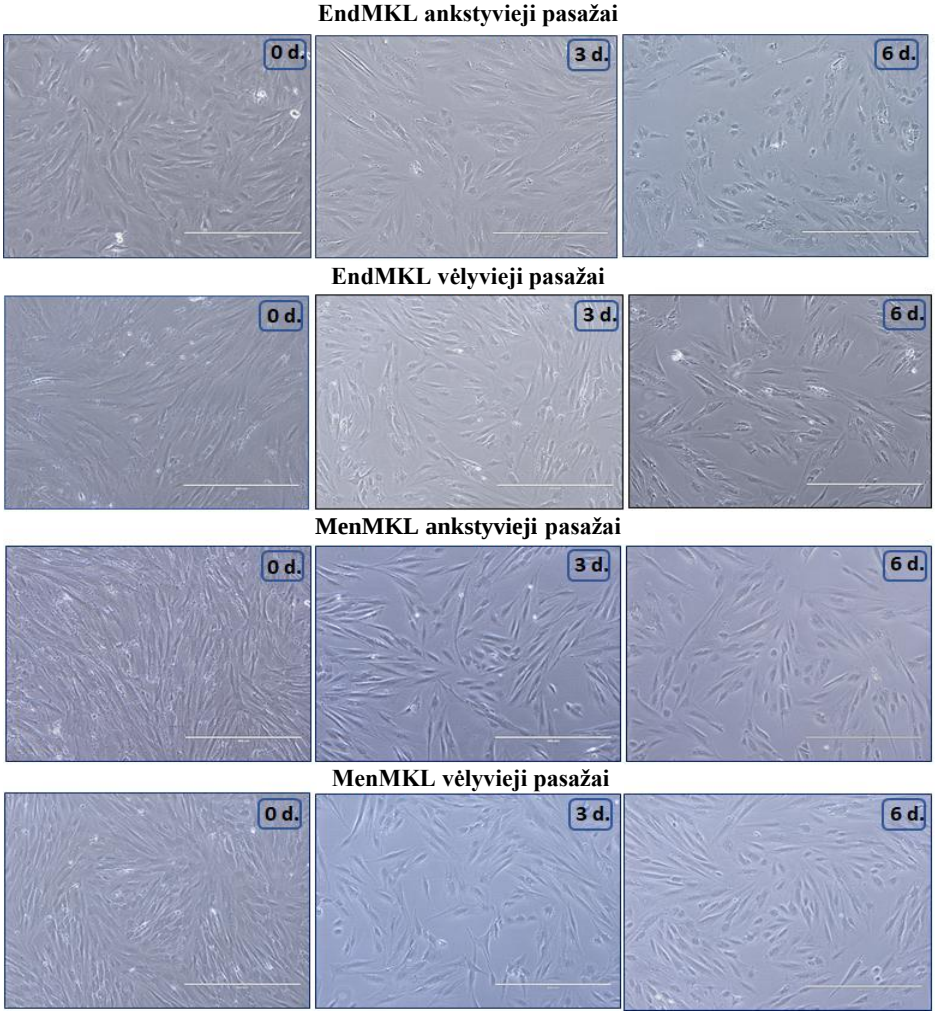
3.2.1. Ląstelių morfologija

Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ir decidualine kryptimi indukuotos endometriumo kilmės MKL 3-ią ir 6-ą diferenciacijos dieną pakeitė morfologiją – iš verpstės formos, fibroblastus primenančių ląstelių tapo ovalesnėmis, panašiomis į epitelio ląsteles, lyginant jas su nediferencijuotomis EndMKL ir MenMKL (11 pav.) (Valatkaitė *et al.*, 2021).

Endometriumo kilmės MKL morfologijos pokyčiai buvo ryškesni po ilgesnės ląstelių diferenciacijos decidualine kryptimi, tai yra praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos daugiau ląstelių įgijo „epitelioidinių“ ląstelių išvaizdą. Visgi, atlikus mokslinius tyrimus nepastebėta statistiškai reikšmingo ląstelių morfologijos skirtumo tarp ankstyvųjų (2–7-o) ir vėlyvųjų (15–19-o) pasažų visais atvejais.

Kartu paminėtina, kad nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp endometriumo kilmės MKL decidualizacijos skirtingose grupėse – moterų, kurioms planuotas IVF/ICSI arba atšildytų embrionų gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, ir moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos.

Šie rezultatai leidžia daryti išvadą, kad endometriumo kilmės MKL yra vienodai pajėgios keisti fenotipą, nepriklausomai nuo ląstelių diferenciacijos trukmės, jų surinkimo šaltinių – endometriumo audinio arba mėnesinių kraujo, bei moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos.



11 paveikslas. EndMKL ir MenMKL morfologijos pokyčių įvertinimas, atlikus ląstelių diferenciacijos indukciją decidualine kryptimi. Ląstelių fenotipo pokyčiai įvertinti ankstyvųjų (2–7-o) ir vėlyvųjų (15–19-o) pasažų metu po 3 dienų ir 6 dienų nuo diferenciacijos pradžios. 0 d. – nediferencijuotos (kontrolinės) EndMKL ir MenMKL. 3 d. – EndMKL ir MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – EndMKL ir MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Mastelis – 400 µm. Pagal Valatkaitė, Baušytė *et al.*, 2021.

3.2.2. Su decidualizacija susijusių genų raiškos analizė

Vertinant *PRL, WNT4* ir *IGFBP1* genų raiškos iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtose ir decidualine diferenciacijos kryptimi indukuotose endometriumo kilmės MKL, buvo nustatyta padidėjusi visų šių

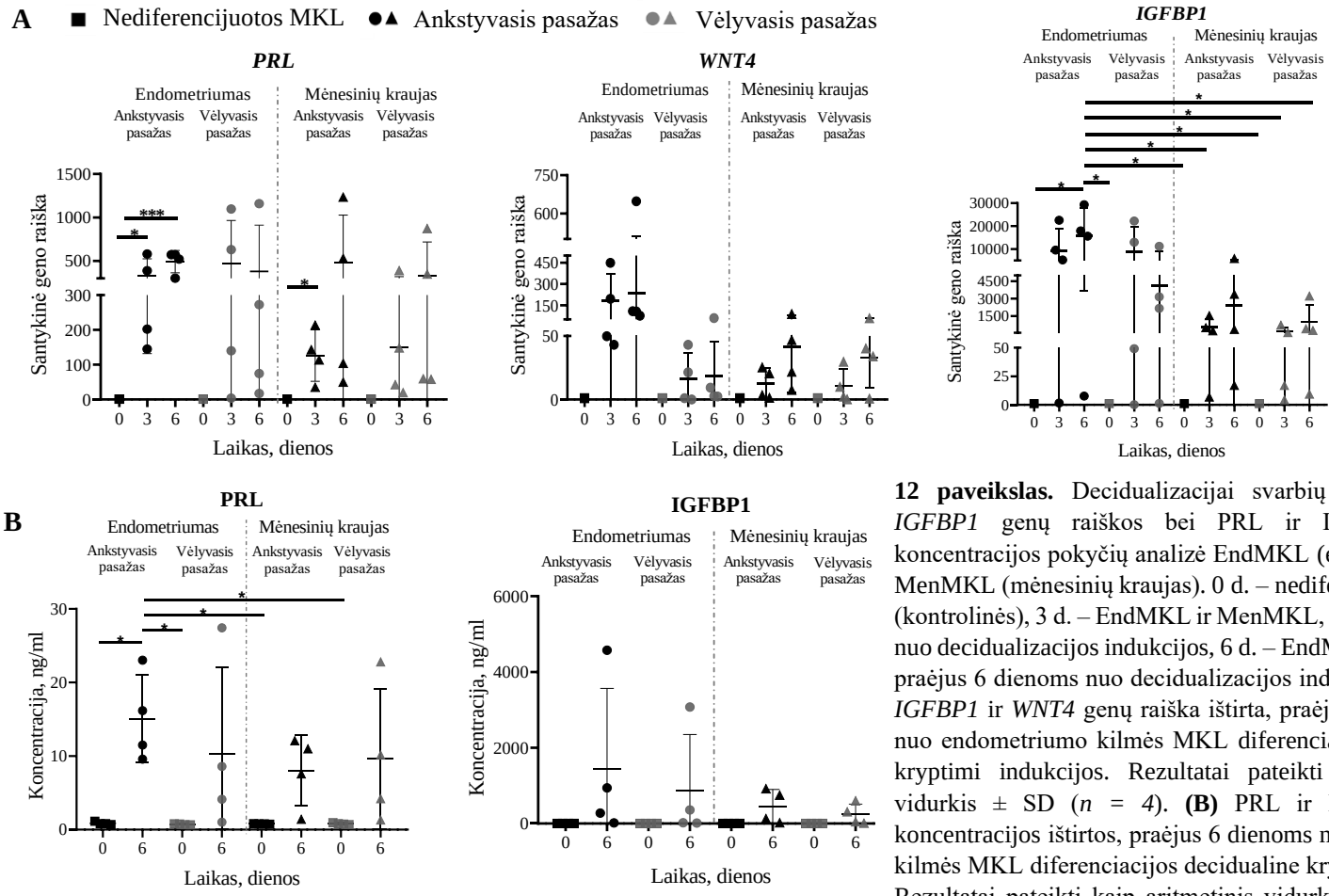
trijų genų raiška, lyginant jas su kontrolinės grupės – nediferencijuotomis MKL (12 pav. A) (Valatkaitė *et al.*, 2021).

Praėjus 3 ir 6 dienoms nuo EndMKL ir praėjus 3 dienoms nuo MenMKL decidualizacijos indukcijos pradžios, *PRL* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė, palyginti su kontroline ląstelių grupe. *IGFBP1* genas irgi pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne raiška praėjus 6 dienoms nuo EndMKL diferenciacijos indukcijos decidualine krypimi pradžios, lyginant su nediferencijuotomis MKL.

Analizuojant *PRL*, *WNT4* ir *IGFBP1* genų raiškos skirtumus tarp skirtingos decidualizacijos trukmės laikotarpių – 3 dienų ir 6 dienų, statistiškai reikšmingų skirtumų negauta nei ankstyvųjų, nei vėlyvųjų ląstelių pasažų metu.

Mokslinių tyrimų metu taip pat buvo įvertinti genetinių decidualizacijos žymenų raiškos skirtumai tarp skirtingų šaltinių endometriumo kilmės MKL.

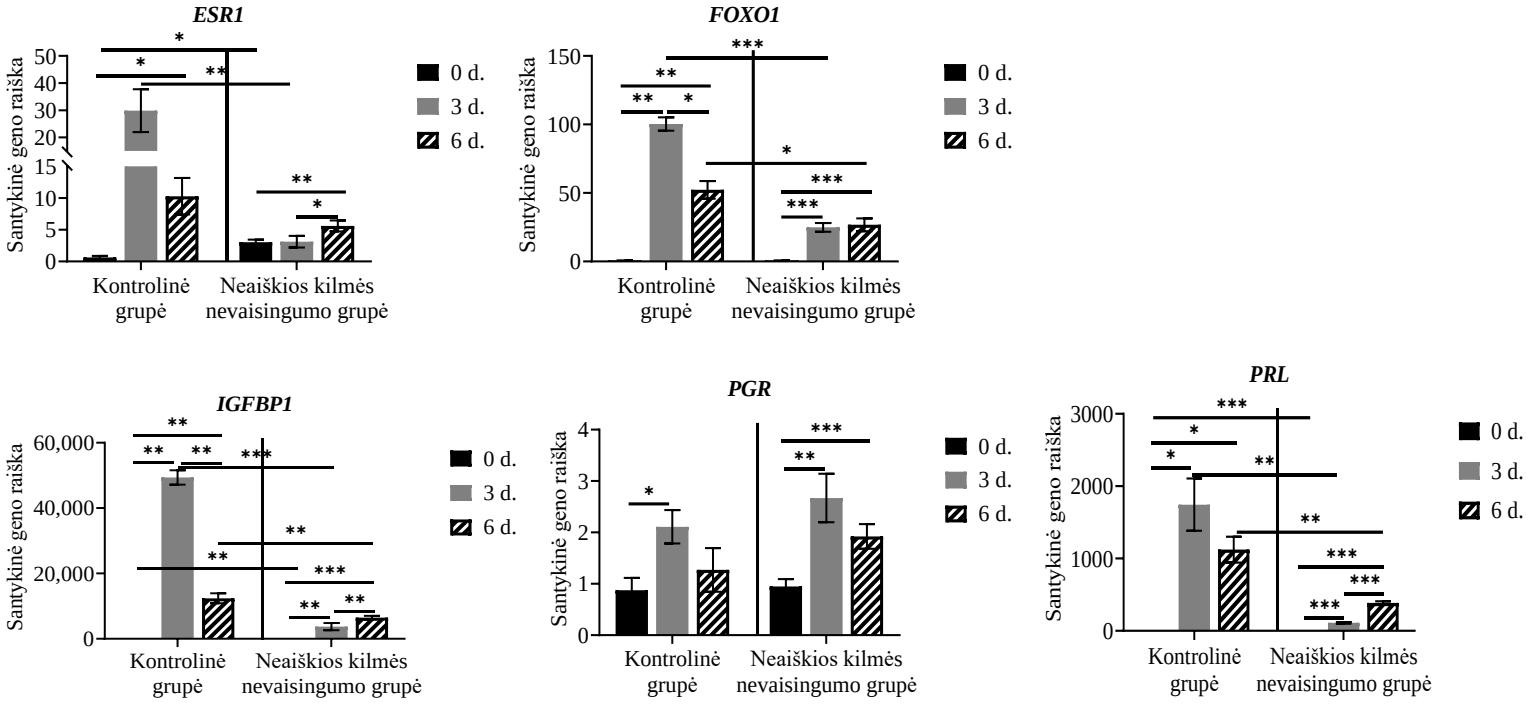
Statistiškai reikšmingai didesnė *IGFBP1* geno raiška nustatyta praėjus 6 dienoms nuo EndMKL diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su analogiška MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi trukme. *PRL* ir *WNT4* genų analizės atvejais buvo pastebėta stabili jų raiška iš abiejų šaltinių išskirtų endometriumo kilmės MKL diferenciacijos metu, tačiau *WNT4* geno raiška EndMKL ankstyvųjų pasažų metu buvo statistiškai nereikšmingai didesnė.



12 paveikslas. Decidualizacijai svarbių *PRL, WNT4* ir *IGFBP1* genų raiškos bei PRL ir IGFBP1 baltymų koncentracijos pokyčių analizė EndMKL (endometriumas) ir MenMKL (mėnesinių kraujas). 0 d. – nediferencijuotos MKL (kontrolinės), 3 d. – EndMKL ir MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – EndMKL ir MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. **(A)** *PRL, IGFBP1* ir *WNT4* genų raiška ištirta, praėjus 3 ir 6 dienoms nuo endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD (*n = 4*). **(B)** PRL ir IGFBP1 baltymų koncentracijos ištirtos, praėjus 6 dienoms nuo endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD (*n = 4*). *Reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, remiantis vienpuse *ANOVA* analize. Pagal Valatkaitė, Baušytė *et al.*, 2021.

Paminėtina, kad analizuojant jau aptartų *PRL* ir *IGFBP1* bei papildomų *FOXO1*, *PGR* ir *ESR1* genų raiškos pokyčius MenMKL decidualizacijos metu priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės, pastebėtas genų raiškos padidėjimas diferenciacijos decidualine kryptimi metu visais atvejais bei tam tikri atskiri statistiškai reikšmingi skirtumai (13 pav.) (Skliutė *et al.*, 2021).

ESR1, *IGFBP1*, *PRL* ir *FOXO1* genų raiška buvo statistiškai reikšmingai mažesnė moterų, kurioms planuotas IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė), lyginant su lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos neturinčių moterų grupe (kontrolinė grupė), praėjus 3 dienoms ir, išskyrus *ESR1* geną, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. *ESR1*, *IGFBP1* ir *PRL* genų raiška tik neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnė praėjus ilgesnei – 6 dienų diferenciacijos decidualine kryptimi trukmei, lyginant su trumpesne – 3 dienų diferenacijos decidualine kryptimi trukme.



13 paveikslas. *ESR1*, *FOXO1*, *IGFBP1*, *PGR* ir *PRL* genų raiškos analizė MenMKL priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms nustatytas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 4*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; *reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, remiantis t-testu (*Holm-Sidak* metodas). Pagal Skliutė, Baušytė *et al.*, 2021.

3.2.3. Baltymų PRL ir IGFBP1 koncentracijos pokyčiai

MKL, išskirtų iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo mėginių, į augimo terpę sekretuojamų decidualizacijai svarbių baltymų PRL ir IGFBP1 koncentracijos pokyčiai buvo įvertinti *ELISA* metodu (12 pav. B).

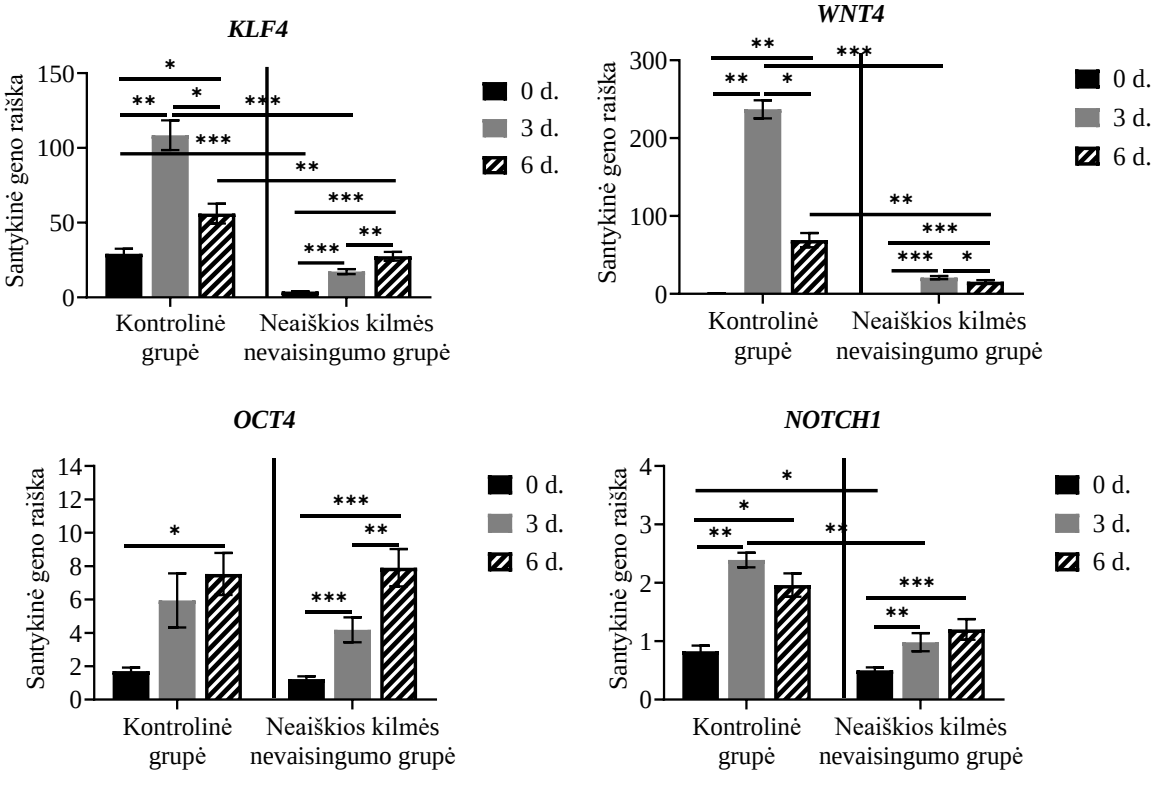
Nustatyta, kad 6-ą EndMKL ir MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi dieną abiejų baltymų koncentracijos padidėjo, nors statistiškai reikšmingas skirtumas pastebėtas tik pirmosios grupės ankstyvojo pasažo metu PRL baltymo atveju. Taip pat statistiškai reikšmingų skirtumų nerasta ir lyginant PRL bei IGFB1 baltymų koncentracijos pokyčius tarp skirtingų endometriumo kilmės MKL šaltinių.

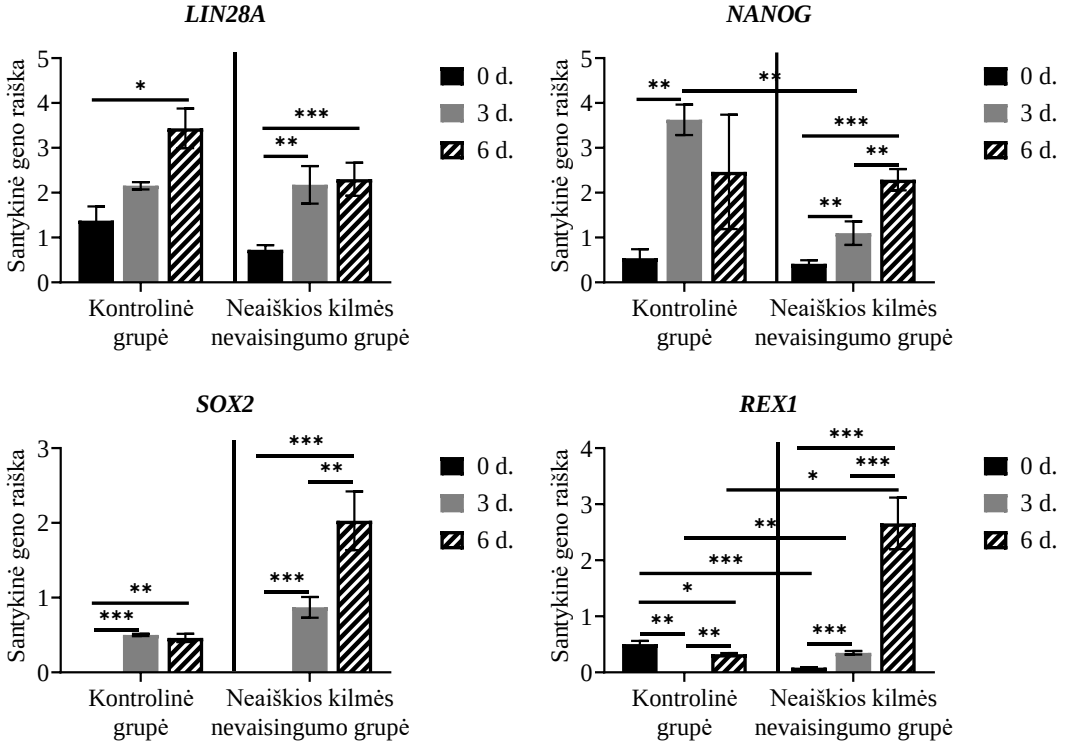
Apibendrinant, pagrindinių decidualizaciją atspindinčių baltymų koncentracijų pokyčiai patvirtinta sėkmingą endometriumo kilmės MKL diferenciaciją nepriklausomai nuo jų kilmės šaltinio ilgalaikio ląstelių kultivavimo metu.

3.3. Kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių genų raiškos rezultatai

Mokslinių tyrimų metu buvo ištirta ląstelių kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių *KLF4, LIN28A, WNT4, NANOG, OCT4, SOX2, NOTCH1* ir *REX1* genų raiška MenMKL išskirtose iš dviejų moterų grupių – kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė) ir kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų (kontrolinė grupė) (14 pav.) (Skliutė *et al.*, 2021).

Abiejose moterų grupėse pastebėta didesnė *KLF4, LIN28A, WNT4, NANOG, OCT4, SOX2 ir NOTCH1* genų raiška praėjus 3 ir 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotų MenMKL grupe. Visais atvejais skirtumai buvo statistiškai reikšmingi, išskyrus *LIN28A* ir *OCT4* genų raišką praėjus 3 dienoms ir *NANOG* geno raišką praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos pradžios kontrolinėje grupėje. *REX1* geno raiška statistiškai reikšmingai didesnė praėjus 3 ir 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su 0 diena, buvo tik neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje.


KLF4
Santykinė geno raiška
150
100
50
0
0 d.
3 d.
6 d.
Kontrolinė grupė
Neaiškios kilmės nevaisingumo grupė
WNT4
300
200
100
0
OCT4
14
12
10
8
6
4
2
NOTCH1
3
1



14 paveikslas. Kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių *KLF4*, *WNT4*, *OCT4*, *NOTCH1*, *LIN28A*, *NANOG*, *SOX2*, *REX1* genų raiškos analizė MenMKL priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms nustatytas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 4*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; *reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, remiantis t-testu (*Holm-Sidak* metodas). Pagal Skliutė, Baušytė *et al.*, 2021.

Vertinant MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi trukmės įtaką genų raiškai, ji dažniau nustatyta neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje. Joje *KLF4, NANOG, OCT4, SOX2* ir *REX1* genų raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su 3 dienų periodu, o kontrolinėje grupėje tai pastebėta tik *REX1* geno raiškos atveju.

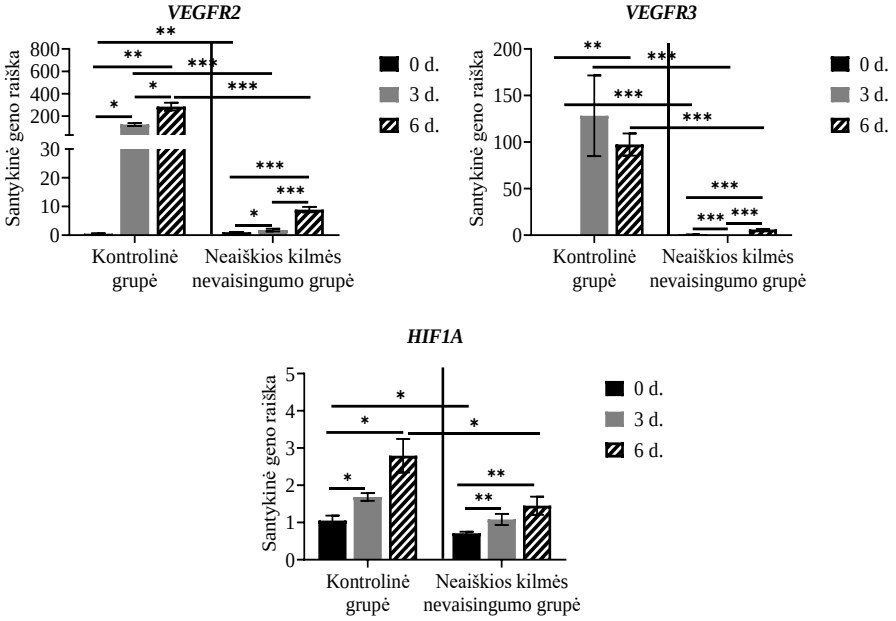
Analizuojant genų raiškos skirtumus priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės, pastebėta, kad *KLF4* geno raiška 0 dieną ir praėjus 3 dienoms bei 6 dienoms, *WNT4* geno raiška praėjus 3 dienoms ir 6 dienoms, *NANOG* geno raiška praėjus 3 dienoms ir *NOTCH1* geno raiška 0 dieną ir praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos buvo didesnė, o *REX1* geno raiška buvo mažesnė 0 dieną ir praėjus 3 dienoms bei 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos kontrolinėje grupėje.

Apibendrinant, galima teigti, kad ląstelių kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių genų raiška yra svarbi užtikrinant sėkmingą endometriumo decidualizaciją bei regeneraciją ir gali būti susijusi su vaisingumo sutrikimų išsivystymu.

3.4. Angiogenezę reguliuojančių genų raiškos įvertinimas

Nagrinėjant angiogenezę reguliuojančių *HIF1A, VEGFR2* ir *VEGFR3* genų raiškos kitimus, buvo nustatyta, kad jų raiška MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi metu didėjo ilgėjant decidualizacijos trukmei abiejose tyrimo grupėse – moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (kontrolinė grupė), ir moterų, kurioms planuotas IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė) visais atvejais, išskyrus *VEGFR3* geno raiškos lyginamąją analizę praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos pradžios antrojoje grupėje (15 pav.) (Skliutė *et al.*, 2021). Visgi, didesnė aptariamų genų raiška nustatyta kontrolinėje grupėje.

Paminėtina, kad statistiškai reikšmingai didesnė genų raiška, lyginant ilgesnę – 6 dienų trukmės MenMKL diferenciaciją decidualine kryptimi su trumpesne – 3 dienų trukme, buvo pastebėta *VEGFR2* geno atveju abiejose moterų grupėse ir *VEGFR3* geno atveju neaiškios kilmės nevaisingumo moterų grupėje.



15 paveikslas. Angiogenezę reguliuojančių *HIF1A, VEGFR2* ir *VEGFR3* genų raiškos analizė MenMKL priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 4*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; *reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, remiantis t-testu (*Holm-Sidak* metodas). Pagal Skliutė, Baušytė *et al*., 2021.

Analizuojant genų raiškos skirtumus priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės, kontrolinėje grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnė *HIF1A* geno raiška 0 dieną ir praėjus 6 dienoms, o *VEGFR2* ir *VEGFR3* genų atveju – praėjus 3 ir 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su neaiškios kilmės nevaisingumo grupės rezultatais atitinkamu metu.

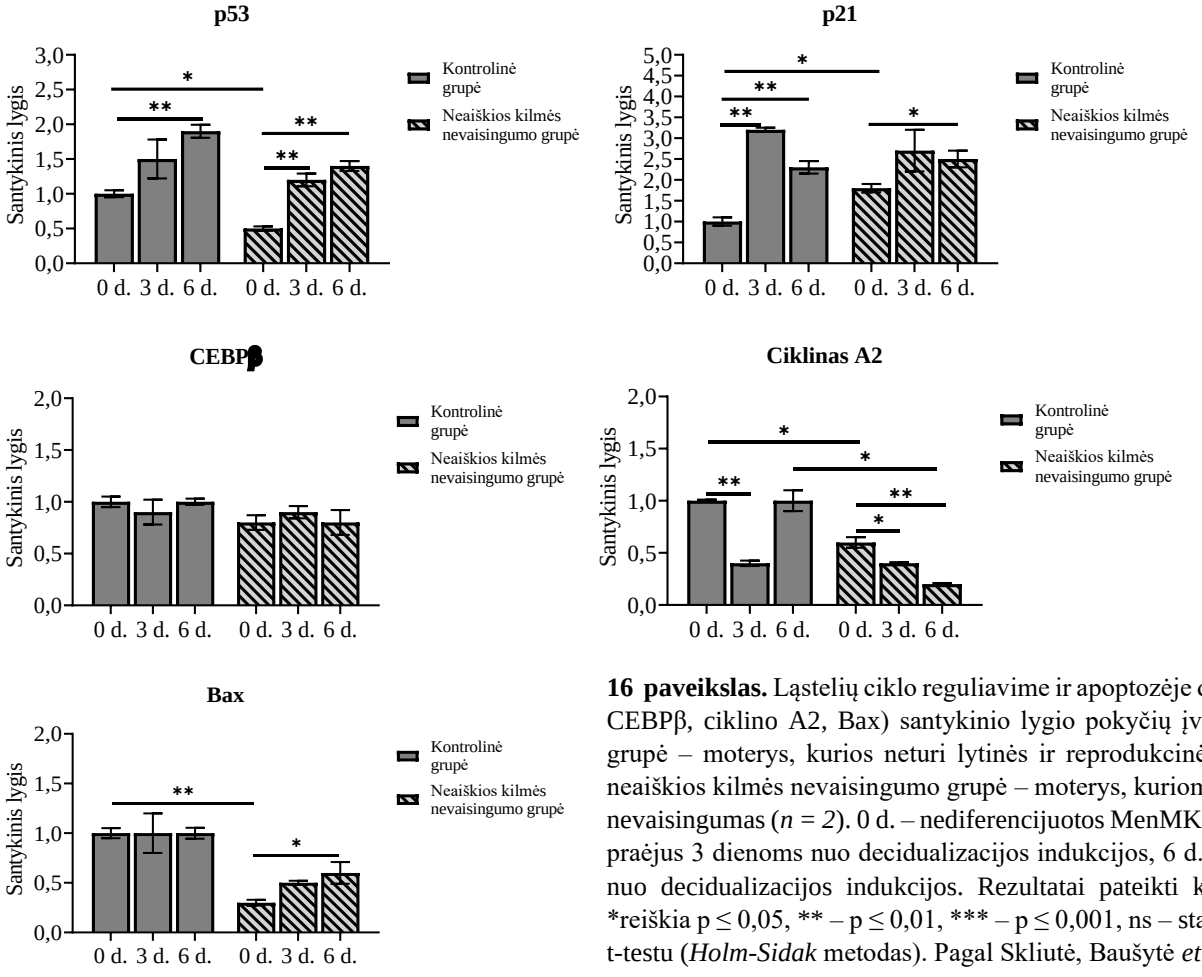
Mokslinio tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad angiogenezę reguliuojančių genų raiška išlieka stabili ląstelių kultivavimo metu ir gali būti susijusi su vaisingumo sutrikimų išsivystymu.

3.5. Ląstelės ciklo ir epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų santykinio lygio analizė

Doktorantūros studijų metu *Western blot* metodu buvo analizuoti ląstelės ciklo reguliavime ir apoptozėje dalyvaujančius baltymų (p53, p21, ciklino A2, Bax, CEBPβ) (16 pav. ir Priedas Nr. 6) ir epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų (Ezh2, Suz12, H3K27me3, HDAC1, HyperAcH4) (17 pav. ir Priedas Nr. 6) santykinio lygio pokyčiai MenMKL, išskirtose iš dviejų moterų grupių: moterų, neturinčių lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (kontrolinė grupė), ir moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė) (Skliutė *et al.*, 2021).

Pirma, atliktų mokslinių tyrimų metu buvo nustatytas statistiškai reikšmingai didesnis p53 baltymo santykinis lygis praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL, kontrolinėje grupėje, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje statistiškai reikšmingas padidėjimas pastebėtas praėjus ir 3 dienoms, ir 6 dienoms nuo decidualizacijos pradžios. Atvirkštiniai rezultatai gauti atliekant p21 baltymo santykinio lygio lyginamąją analizę.

p21 baltymo santykinis lygis kontrolinėje grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnis, praėjus tiek 3 dienoms, tiek 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MKL, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje šis skirtumas nustatytas praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos pradžios.

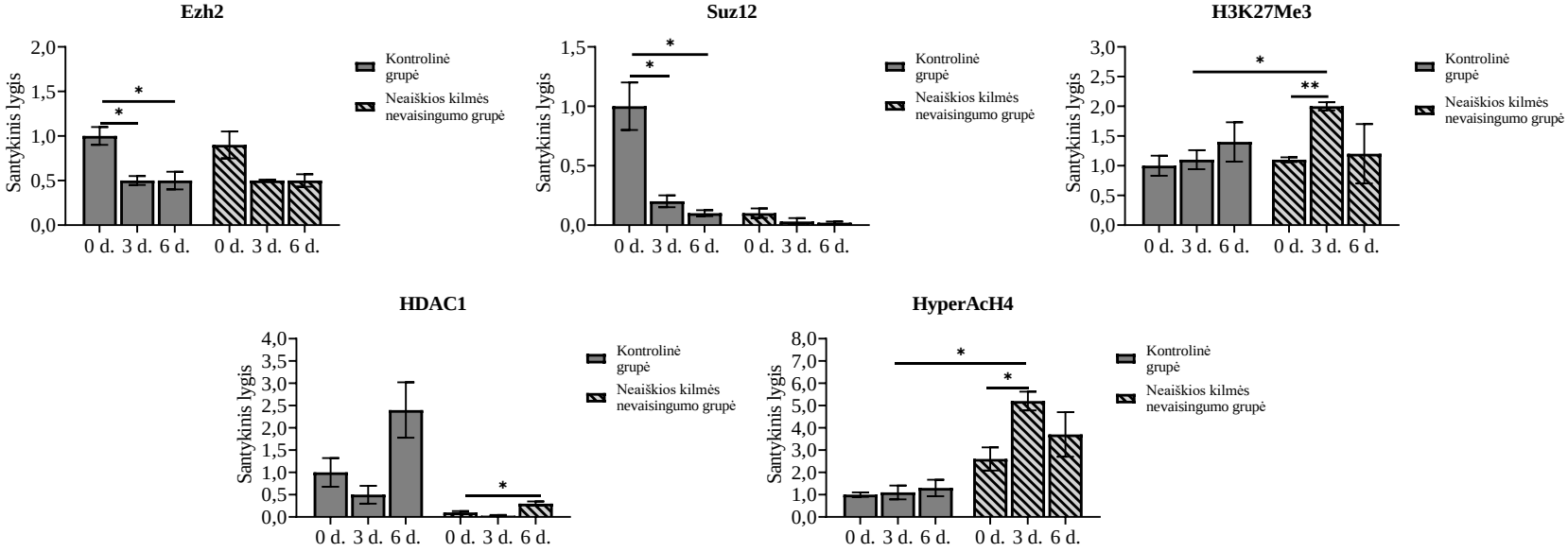


16 paveikslas. Ląstelių ciklo reguliavime ir apoptozėje dalyvaujančių baltymų (p53, p21, CEBPβ, ciklino A2, Bax) santykinio lygio pokyčių įvertinimas MenMKL. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 2*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; *reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, ns – statistiškai nereikšminga, remiantis t-testu (*Holm-Sidak* metodas). Pagal Skliutė, Baušytė *et al.*, 2021.

Antra, vertinant ciklino A2 baltymo santykinio lygio pokyčius, neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje pastebėtas stabilus jo mažėjimas visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu, o kontrolinėje grupėje rezultatai – heterogeniški. Ciklino A2 baltymo santykinis lygis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis praėjus 3 ir 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos pradžios, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL, neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje, bei statistiškai reikšmingai mažesnis, praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos pradžios pastarojoje grupėje, lyginant su kontroline grupe.

Trečia, atliktų eksperimentinių darbų metu nustatyta, kad Bax baltymo santykinis lygis kontrolinėje grupėje išliko stabilus ir didesnis nei neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu. Su nevaisingumu susiduriančių moterų grupėje Bax baltymo santykinis lygis nuolat didėjo, esant statistiškai reikšmingam pokyčiui praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL. Tačiau CEBPβ baltymo santykinis lygis abiejose moterų grupėse išliko panašus visą diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpį.

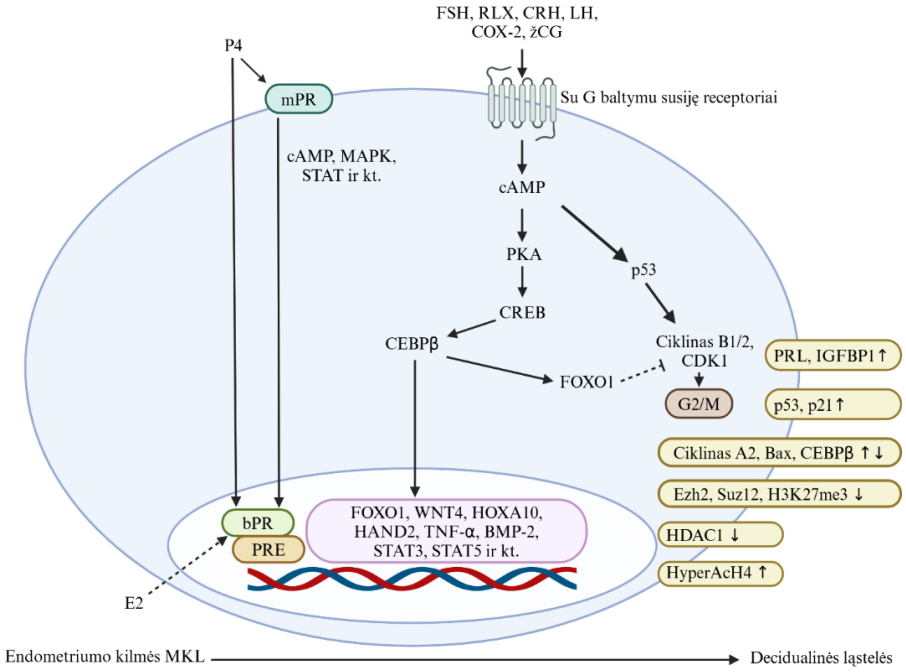
Ketvirta, išmatavus su histonų modifikavimu susijusių epigenetinio reguliavimo žymenų – Ezh2, Suz12, H3K27me3, HDAC1, HyperAcH4 baltymų santykinio lygio pokyčius, nustatytas mažesnis Ezh2 ir Suz12 baltymų santykinis lygis praėjus 3 ir 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL abiejose moterų grupėse, o statistiškai reikšmingi skirtumai šių dviejų baltymų santykinio lygio pokyčių atvejais pastebėti kontrolinėse grupėse. Baltymo H3K27me3 santykinis lygis buvo statistiškai reikšmingai didesnis neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje, lyginant su kontroline, praėjus 3 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos. Analizuojant toliau nustatytas didesnis HDAC1 baltymo santykinis lygis kontrolinėje nei su nevaisingumu susidūrusių moterų grupėje visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje pastebėtas statistiškai reikšmingai didesnis jo santykinis lygis praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos pradžios, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL. HyperAcH4 baltymo santykinis lygis buvo didesnis neaiškios kilmės nevaisingumo nei lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų neturinčių moterų grupėje visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu, kartu esant statistiškai reikšmingam padidėjimui po 3 dienų nuo diferencacijos indukcijos.



17 paveikslas. Epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų (Ezh2, Suz12, H3K27me3, HDAC1, HyperAcH4) santykinio lygio pokyčių įvertinimas MenMKL. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 2*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL, praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, 6 d. – MenMKL, praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; *reiškia $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, ns – statistiškai nereikšminga, remiantis t-testu (*Holm-Sidak* metodas). Pagal Skliutė, Baušytė *et al.*, 2021.

Apibendrinant, ląstelės ciklo reguliavime ir apoptozėje bei epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų santykinio lygio pokyčiai yra svarbūs sėkmingam ir stabiliam endometriumo decidualizacijos procesui. Kartu aptartų baltymų santykinio lygio pokyčiai atspindi jų įtakos tendenciją endometriumo receptyvumui ir vaisingumo sutrikimų išsivystymui.

Pagrindinius endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi procesus ir pokyčius molekuliniu lygmeniu, įvertinus anksčiau aptartus doktorantūros studijų metu atliktų mokslinių tyrimų rezultatus bei teorines žinias, iliustruoja 18 pav. pateikta medžiaga.



18 paveikslas. Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi procesai ir pokyčiai molekuliniu lygmeniu. bPR – ląstelės branduolio progesterono receptorius, mPR – ląstelės membranos progesterono receptorius, PRE – progesterono atsako elementas. Sukurta naudojant *Biorender.com.*

3.6. *In vivo* tyrimo rezultatų apžvalga

In vivo tyrimui endometriumo patologijos pelių patelių modeliai buvo sukurti dviem būdais – taikant mechaninį poveikį arba skiriant chemoterapiją. EndMKL terapijos poveikis endometriumo patologijos sukelto vaisingumo sutrikimų kontekste buvo įvertintas remiantis:

1. fibrozės išplitimu pelių patelių gimdos rago audiniuose;

2. pelių patelių gimdos rago audinių skersmens ir kitais histologiniais pokyčiais;
3. pelių patelių savaiminio pastojimo rezultatais;
4. fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose svarbių *Col1a1*, *Col3a1*, *Acta2* ir *CD44* genų raiškos analize.

Atlikto *in vivo* tyrimo krypčių rezultatai detaliau aptariami tolesnėje apžvalgoje.

3.6.1. Fibrozės išplitimo įvertinimas pelių patelių, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, grupėje

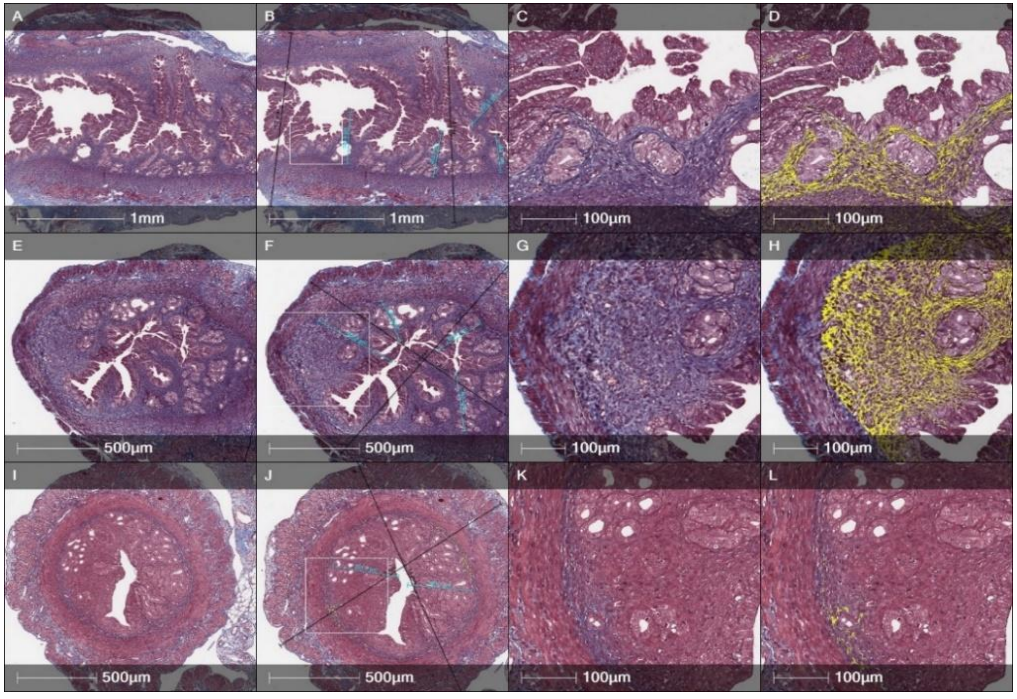
Fibrozės išplitimo įvertinimas mechaniniu būdu paveiktose pelių patelių grupėse priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo buvo atliktas analizuojant *Massone trichrome* metodu nudažytų Mech, Mech-EndMKL ir kontrolinės grupių gimdos rago audinių histologinius pjūvius (19 pav. D, H, L) ir naudojant statistinės analizės įrankius (20 pav.) (Bausyte *et al.*, 2023).

Statistinės analizės rezultatai parodė reikšmingus fibrozės išplitimo skirtumus tarp kontrolinės (19 pav. D), Mech (19 pav. H) ir Mech-EndMKL (19 pav. L) grupių visame gimdos rago skersmenyje (*Kruskal-Wallis* kriterijus; $H = 8,38$; $df = 2$; $p = 0,02$), miometriumo-endometriumo (*Kruskal-Wallis* kriterijus; $H = 7,28$; $df = 2$; $p = 0,03$) ir miometriumo (*Kruskal-Wallis* kriterijus; $H = 7,53$; $df = 2$; $p = 0,02$) sluoksniuose (20 pav.).

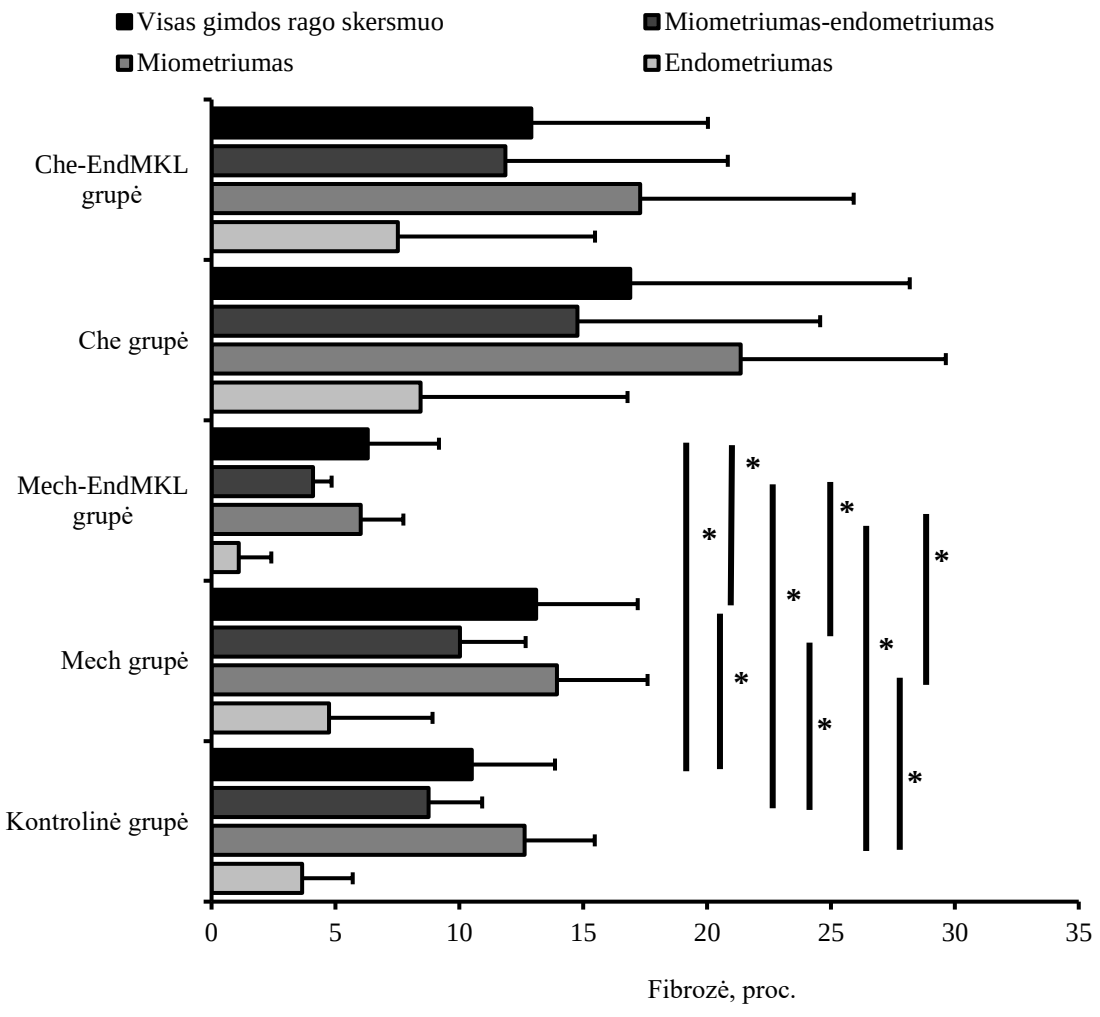
Fibrozės intensyvumas visame gimdos rago skersmenyje ir atskiruose jo sluoksniuose – miometriume-endometriume ir miometriume, buvo statistiškai reikšmingai didesnis Mech grupėje (19 pav. H), palyginti su Mech-EndMKL grupe (19 pav. L) (*Bonferroni* kriterijus; $p < 0,05$) (20 pav.).

Fibrozės išplitimas endometriume buvo statistiškai reikšmingai panašus tarp visų mokslinio tyrimo grupių (*Kruskal-Wallis* kriterijus; $H = 5,58$; $df = 2$; $p = 0,06$) (20 pav.). Plačiausia fibrozės sritis buvo Mech grupėje (19 pav. H), o siauriausia – Mech-EndMKL grupėje (19 pav. L).

Paminėtina, kad iš visų *in vivo* tyrimo grupių mažiausias fibrozės išplitimas, vertinant visus gimdos rago sluoksnius, irgi buvo nustatytas būtent Mech-EndMKL grupėje (19 pav. L): visame gimdos rago skersmenyje – 6,3 proc. (± 1,3 proc.), miometriume-endometriume – 4,1 proc. (± 2,9 proc.), miometriume – 6 proc. (± 0,8 proc.) ir endometriume – 1,1 proc. (± 1,7 proc.) (20 pav.).



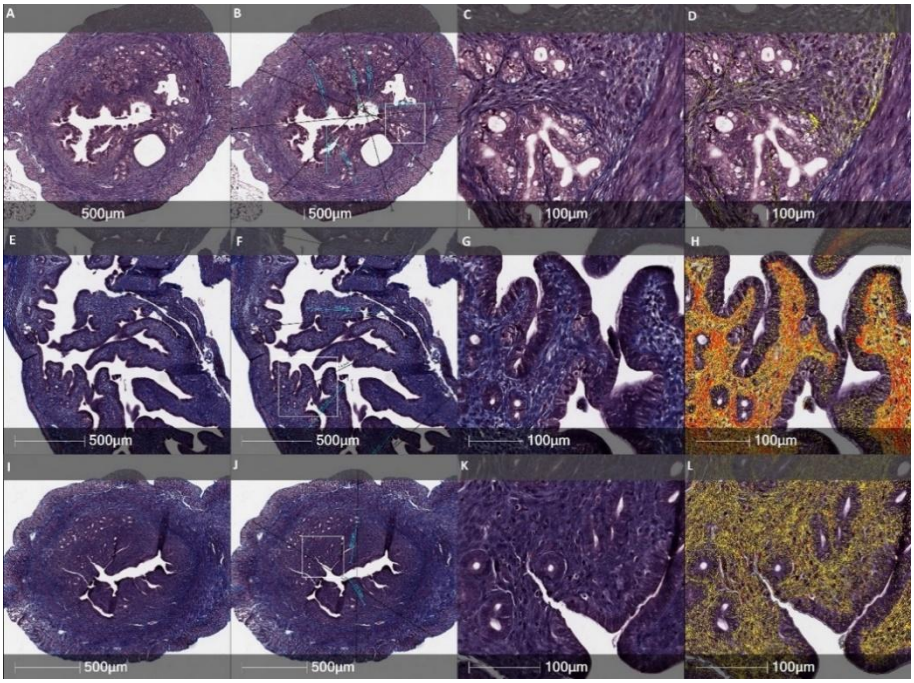
19 paveikslas. Fibrozės išplitimo ir gimdos rago audinių skersmens įvertinimas *Massone trichrome* metodu nudažytuose *in vivo* tyrimo pelių patelių gimdos rago audinių mėginiuose priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo, kai gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu: **A–D** – kontrolinė, **E–H** – Mech, **I–L** – Mech-EndMKL grupės. Kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra, Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, ir Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija. Fibrozės išplitimą atspindi geltona spalva. Viso gimdos rago skersmens (violetinė spalva) ir endometriumo storio (žydra spalva) matavimai pateikti B, F, J paveiksluose. Baltas stačiakampis B, F, J paveiksluose vaizduoja padidinimo sritis C, D, G, H, K, L paveiksluose. Mastelis – 500 µm ir 100 µm. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.



20 paveikslas. Fibrozės išplitimo statistinė analizė *in vivo* tyrimo pelių patelių gimdos rago audiniuose priklausomai nuo skirtingų veiksnių naudojimo ir EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra (*n = 4*), Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, bet neskirta EndMKL terapija (*n = 6*), Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija (*n = 4*), Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija (*n = 3*), ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija (*n = 3*). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD. Statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant *Kruskal-Wallis* ir *Bonferroni* kriterijus; *reiškia p ≤ 0,05. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

Apibendrinant fibrozės intensyvumo vertinimą pelių patelių gimdos rago audiniuose, galima fomuluoti teiginius dėl neigiamos mechaninio poveikio įtakos pelių patelių gimdos rago audiniams įvairiais lygmenimis ir potencialiai efektyvaus EndMKL terapijos taikymo šiais atvejais.

3.6.2. Fibrozės išplitimo analizė pelių patelių, kurioms buvo skirta chemoterapija, grupėje



21 paveikslas. Fibrozės išplitimo ir gimdos rago audinių skersmens įvertinimas *Massone trichrome* metodu nudažytuose *in vivo* tyrimo pelių patelių gimdos rago audinių mėginiuose priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo, kai buvo skirta chemoterapija: **A–D** – kontrolinė, **E–H** – Che, **I–L** – Che-EndMKL grupės. Kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra, Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija. Fibrozės išplitimą atspindi geltona spalva. Viso gimdos rago skersmens (violetinė spalva) ir endometriumo storio (žydra spalva) matavimai pateikti D, H, L pav. Balti stačiakampiai B, F ir J paveiksluose vaizduoja padidinimo sritis atitinkamai C ir D, G ir H, K ir L paveiksluose. Mastelis – 500 µm ir 100 µm. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

Fibrozės išplitimas chemoterapija paveiktose pelių patelių grupėse priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo buvo įvertintas analizuojant *Massone trichrome* metodu nudažytų Che, Che-EndMKL ir kontrolinės grupių

(21 pav. D, H, L) gimdos rago audinių histologinius pjūvius ir naudojant atitinkamus statistinės analizės įrankius (20 pav.) (Bausyte *et al.*, 2023).

Gauti tyrimų rezultatai neparodė statistiškai reikšmingų fibrozės išplitimo skirtumų tarp pelių patelių grupių atskiruose gimdos rago pjūviuose – visame gimdos rago skersmenyje (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 1,62; df = 2; p = 0,45), miometriume-endometriume (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 1,06; df = 2; p = 0,59) ir miometriume (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 1,66; df = 2; p = 0,44) (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 0,35; df = 2; p = 0,84) (20 pav.). Visgi, didžiausias fibrozės intensyvumas buvo pastebėtas Che grupėje (21 pav. H): visame gimdos rago skersmenyje – 16,9 proc. (± 8,4 proc.), miometriume-endometriume – 14,8 proc. (± 11,3 proc.), miometriume – 21,4 proc. (± 9,8 proc.) ir endometriume – 8,4 proc. (± 8,3 proc.) (20 pav.).

Apibendrinant fibrozės intensyvumo vertinimą pelių patelių gimdos rago audiniuose, kai endometriumo patologija buvo sukelta skyrus chemoterapiją, yra matoma teigiama EndMKL terapijos poveikio tendencija, tačiau būtini tolesni šios krypties moksliniai tyrimai.

3.6.3. Pelių patelių gimdos rago kitų histologinių pokyčių įvertinimas

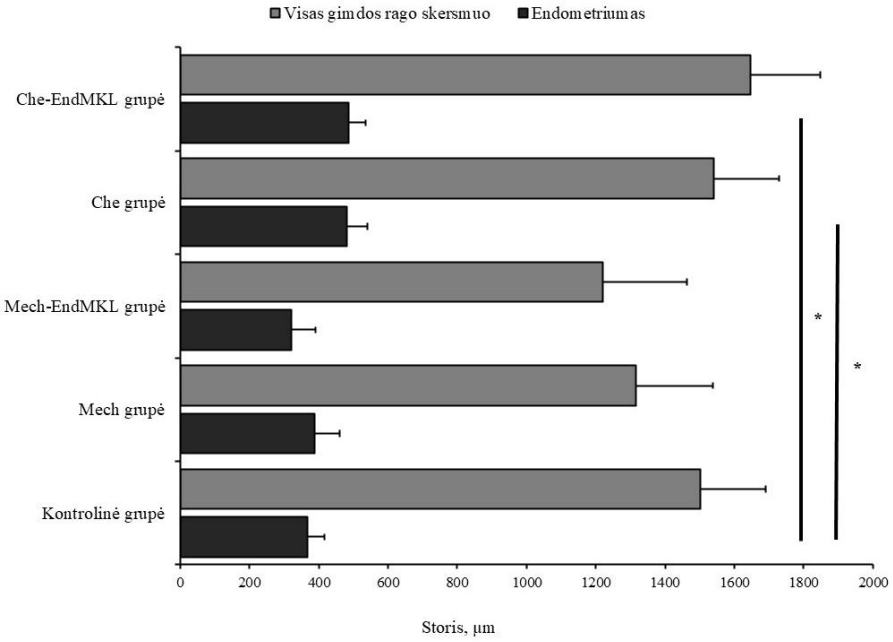
Viso gimdos rago skersmens ir atskirų jo sluoksnių storis buvo įvertintas kontrolinėje (19 pav. B, 21 pav. B), mechaniniu būdu paveiktoje (19 pav. F, J) ir chemoterapiją gavusių (21 pav. F, J) pelių patelių grupėse (Bausyte *et al.*, 2023).

Atliktos statistinės analizės rezultatai parodė tokį *in vivo* tyrimo pelių patelių grupių pasiskirstymą, vertinant nuo siauriausio link plačiausio gimdos rago skersmens: Mech-EndMKL (1220,8 µm ± 241,5 µm), Mech (1315,1 µm ± 222 µm), kontrolinė (1500,7 µm ± 189,7 µm), Che (1539,7 µm ± 190,5 µm) ir Che-EndMKL (1645,3 µm ± 203 µm) grupė (22 pav.).

Remiantis endometriumo storio pokyčių vertinimu *in vivo* modeliuose, plačiausia endometriumo sritis buvo išmatuota Che-EndMKL (485,1 µm ± 50 µm) (21 pav. J), siauriausia – Mech-EndMKL (320,5 µm ± 69,6 µm) (19 pav. J) grupėje. Kontrolinėje grupėje endometriumo storis buvo 367,2 µm ± 50,6 µm (19 pav. B, 21 pav. B) (22 pav.). Neparametrinė vienpusė dispersijos analizė parodė statistiškai reikšmingą endometriumo storio skirtumą tarp kontrolinės ir chemoterapija paveiktų pelių patelių grupių (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 6,56; df = 2; p = 0,04), kai statistiškai reikšmingai siauresnis endometriumas buvo išmatuotas kontrolinėje grupėje (21 pav. B), palyginus su Che (21 pav. F) ir Che-EndMKL (21 pav. J) grupėmis (abiem atvejais *Bonferroni* kriterijus; p < 0,05) (22 pav.).

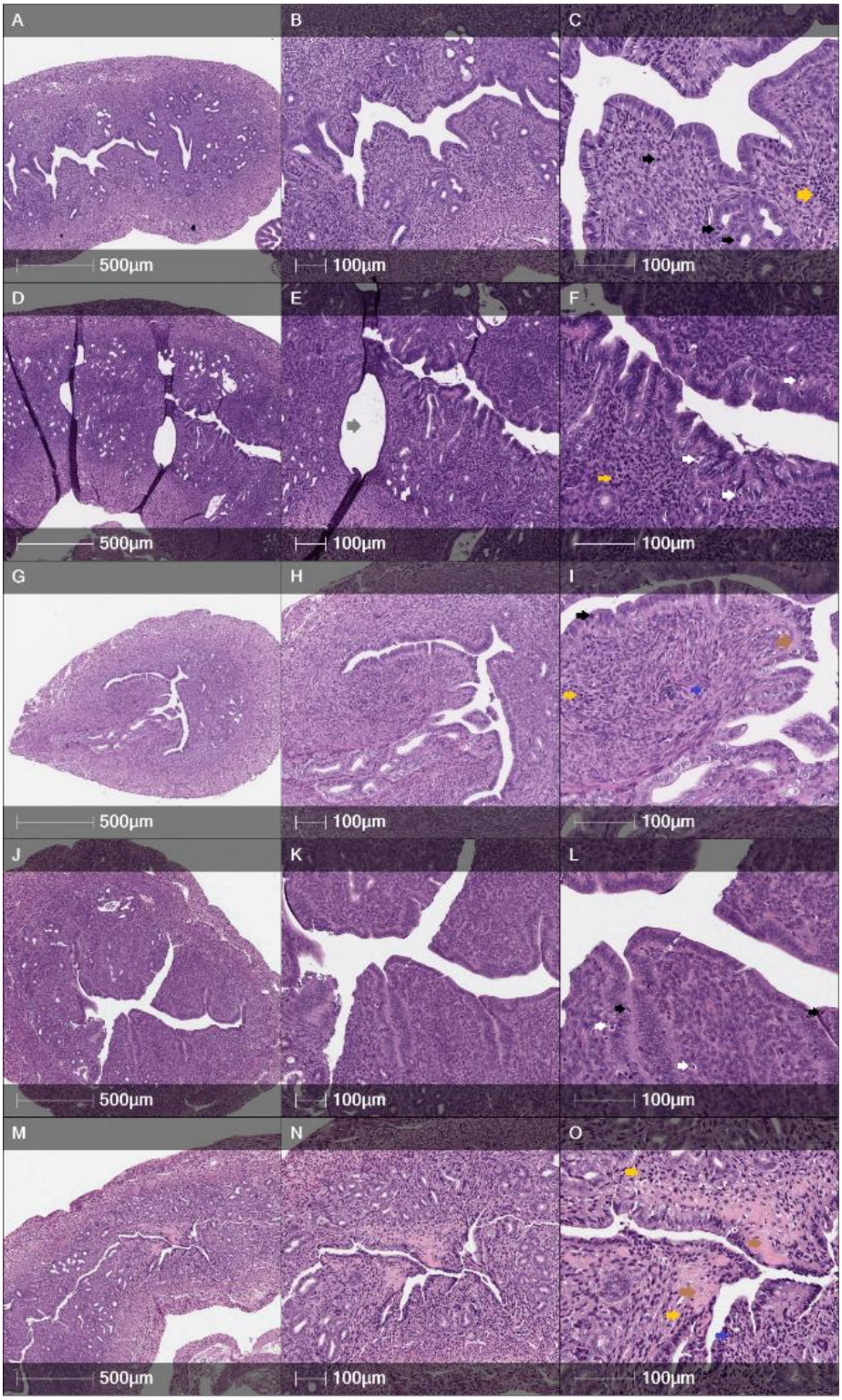
Panašus endometriumo storis (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 1,67; df = 2; p = 0,44; 22 pav.) ir viso gimdos rago skersmuo (*Kruskal-Wallis*

kriterijus; H = 3,72; df = 2; p = 0,16; 22 pav.) buvo išmatuoti kontrolinėje (19 pav. B), Mech (19 pav. F) bei Mech-EndMKL (19 pav. J) grupėse.



22 paveikslas. Viso gimdos rago skersmens ir endometriumo storio matavimų statistinė analizė *in vivo* tyrimo pelių patelių gimdos rago audinių mėginiuose priklausomai nuo skirtingų veiksnių naudojimo ir EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra (*n = 4*), Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, bet neskirta EndMKL terapija (*n = 6*), Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija (*n = 4*), Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija (*n = 3*), ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija (*n = 3*). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD. Statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant *Kruskal-Wallis* ir *Bonferroni* kriterijus; *reiškia p ≤ 0,05. Pagal Bausyte *et al*., 2023.

In vivo tyrimo būdu pelių patelių gimdos rago morfologiniai pokyčiai, atsižvelgiant į sukeltos endometriumo patologijos tipą ir EndMKL terapijos taikymą, buvo vertinti ir plačiau, nudažius ėminius HE metodu (23 pav.).



23 paveikslas. Histologinių pokyčių įvertinimas HE metodu nudažytuose *in vivo*

tyrimo pelių patelių grupių gimdos rago audinių mėginiuose priklausomai nuo skirtingų veiksnių naudojimo ir EndMKL terapijos skyrimo: **A–C** – kontrolinė, **D–F** – Mech, **G–I** – Mech-EndMKL, **J–L** – Che, **M–O** – Che-EndMKL pelių patelių grupės. Kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra, Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija, Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija. **(A–C)** Gausiai išreikšta mitozė epitelyje ir stromoje. Nedaug apoptotinių kūnelių. Polimorfonuklearų (PMN) nematoma. Fibrozės nėra. **(D–F)** Negausiai išreikšta mitozė. Išsiplėtusios endometriumo liaukos. Vidutinis apoptotinių kūnelių kiekis. Vidutinė infiltracija PMN. Fibrozės nėra. **(G–I)** Kompaktiška endometriumo stroma su keliomis mitozėmis. Labai nedaug apoptotinių kūnelių. Nedaug PMN. Nedidelė fibrozė. **(J– L)** Ryški mitozė endometriumo liaukose ir stromoje. Tanki endometriumo stroma. Nedaug apoptozinių kūnelių. Nedidelė infiltracija PMN. Fibrozės nėra. **(M–O)** Ryški stromos fibrozė. Endometriumo liaukos išsiplėtusios. Vidutiniškai ryški mitozė. Vidutinis apoptotinių kūnelių kiekis. Židininė PMN infiltracija. Juoda rodyklė rodo mitozę, balta – apoptotinius kūnus, mėlyna – PMN, geltona – limfocitus, ruda – fibrozę, pilka – liaukų išsiplėtimą. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

Histologinės analizės duomenys parodė tendenciją dėl ryškiausios endometriumo patologijos susiformavimo Mech (23 pav. D–F) ir Mech-EndMKL (23 pav. G–I) grupėse (Bausyte *et al.*, 2023). Atitinkami rezultatai pastebėti ir vertinant endometriumo liaukų išsiplėtimą.

Analizuojant uždegiminių ląstelių infiltraciją pelių patelių gimdos rago audiniuose, kontrolinėje (23 pav. A–C) ir Mech-EndMKL (23 pav. G–I) grupėse buvo matomi pavieniai limfocitai arba jų iš viso nebuvo, o Mech grupėje (23 D–F) pastebėtas vidutinis polimorfonuklearų (PMN) kiekis.

Panašūs rezultatai gauti ir vertinant apoptozę: didžiausia apoptotinių kūnelių infiltracija nustatyta Mech (23 pav. D–F), mažesnė – Mech-EndMKL (23 G–I) ir kontrolinėje (23 pav. A–C) grupėse.

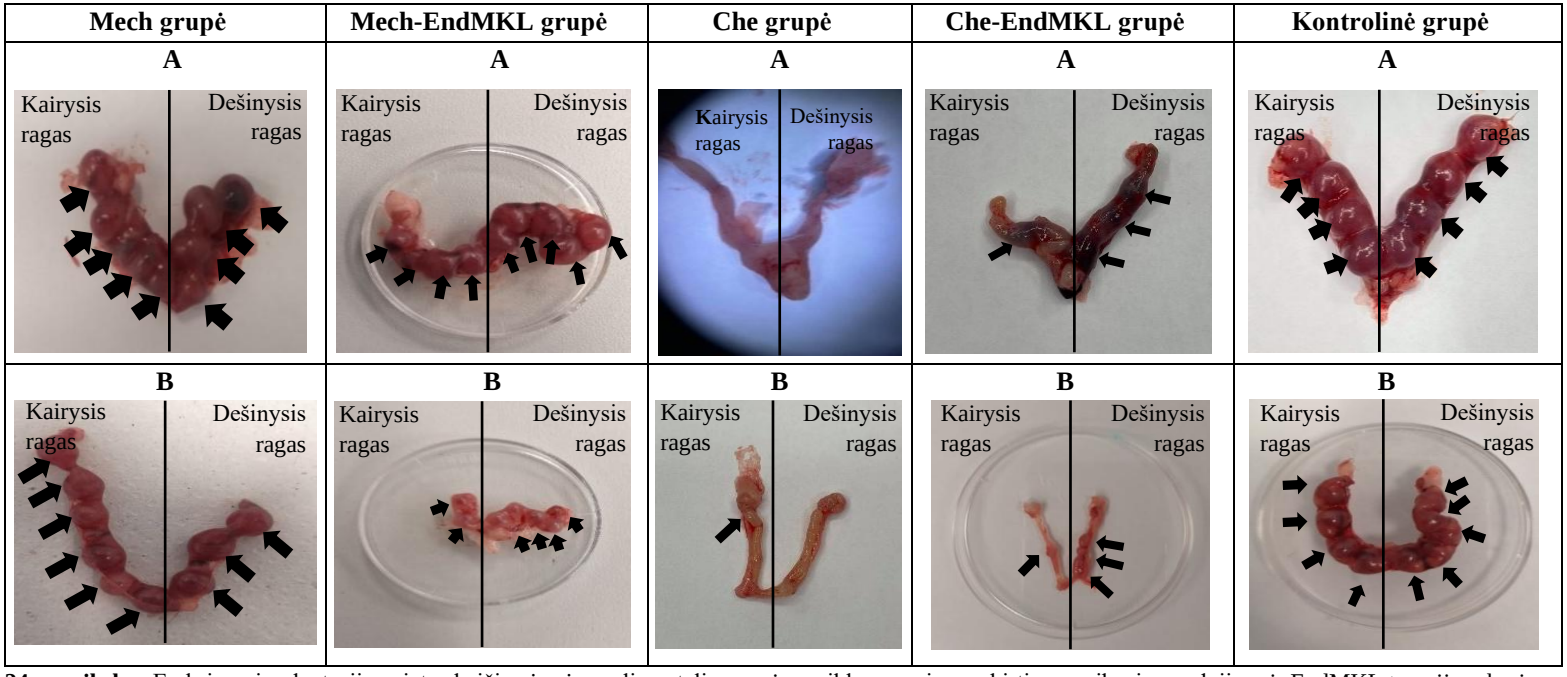
Aukščiau aptartų rodiklių rezultatai chemoterapija paveiktoje pelių patelių grupėje buvo heterogeniški.

Apibendrinti šios dalies rezultatai leidžia daryti prielaidas dėl teigiamo EndMKL terapijos poveikio endometriumo patologijos atveju, tačiau būtina atlikti tolesnius didesnės imties tyrimus, ypač analizuojant chemoterapijos įtaką ir galimas korekcijas.

3.6.4. Savaiminio pastojimo analizė

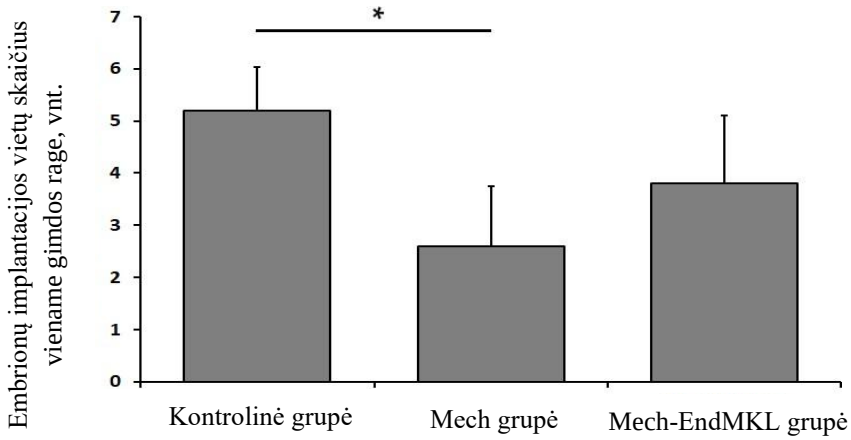
Pagrindinis *in vivo* tyrimo tikslas buvo siekis ištirti EndMKL terapijos poveikį endometriumo patologijos atvejais. Šiuo tikslu buvo įvertinti ir tarpusavyje palyginti embrionų implantacijos vietų skaičiai visose pelių patelių grupėse: kontrolinėje, Mech, Mech-EndMKL, Che ir Che-EndMKL (Bausyte *et al.*, 2023) (24 pav.).

Mechaniniu būdu paveiktoje pelių patelių grupėje embrionų implantacijos vietos buvo suskaičiuotos tik viename gimdos rage, kuriame buvo atlikta procedūra, ir gauti rezultatai palyginti su embrionų implantacijos vietų skaičiumi taip pat viename kontrolinės grupės gimdos rage. Chemoterapijos paveiktoje pelių patelių grupėje embrionų implantacijos vietos suskaičiuotos abiejuose gimdos raguose ir gauti rezultatai palyginti su embrionų implantacijų vietų skaičiumi taip pat dviejuose kontrolinės grupės gimdos raguose. Skaičiavimo metodikų skirtumas atsirado dėl specifinio chemoterapinių vaistų poveikio, kuris pasižymi sistemine citotoksine pažaida lytinei ir reprodukcinei sistemai.



24 paveikslas. Embrionų implantacijos vietų skaičius *in vivo* pelių patelių grupėse priklausomai nuo skirtingų veiksnių naudojimo ir EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra, Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija, Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija. Juoda rodyklė rodo embriono implantacijos vietą pelės patelės gimdos rage. Embriono implantacijos vietų skaičius Mech grupėje: A kairysis ragas (nepaveiktas) – 5, A dešinysis ragas (paveiktas mechaniniu būdu) – 4 ir B kairysis ragas (nepaveiktas) – 6, B dešinysis ragas (paveiktas mechaniniu būdu) – 3, Mech-EndMKL grupėje: A kairysis ragas (nepaveiktas ir neskirta EndMKL) – 4, A dešinysis ragas (paveiktas mechaniniu būdu ir skirta EndMKL) – 5 ir B kairysis ragas (nepaveiktas ir neskirta EndMKL) – 2, B dešinysis ragas (paveiktas mechaniniu būdu ir skirta EndMKL) – 4, Che grupėje: A kairysis ragas – 0, B dešinysis ragas – 0 ir A kairysis ragas – 1, B dešinysis ragas – 0, Che-EndMKL grupėje: A kairysis ragas (neskirta EndMKL) – 1, A dešinysis ragas (skirta EndMKL) – 3 ir B kairysis ragas (neskirta EndMKL) – 1, A dešinysis ragas (skirta EndMKL) – 3 ir kontrolinėje grupėje: A kairysis ragas – 4, A dešinysis ragas – 4 ir B kairysis ragas – 4, B dešinysis ragas – 5. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

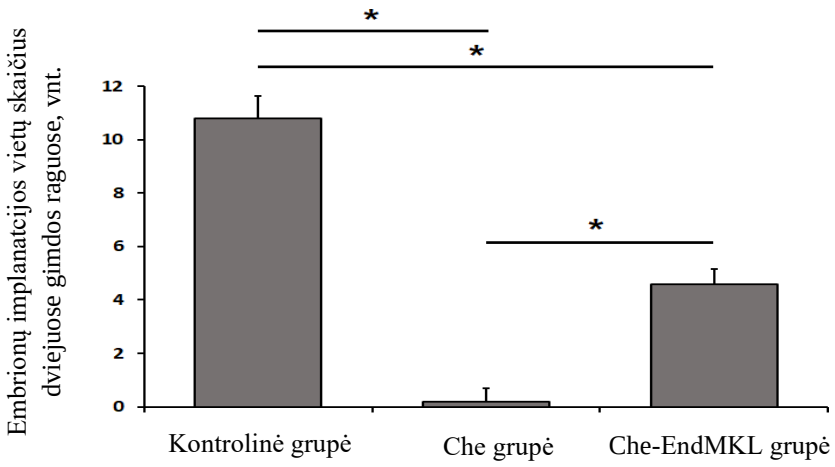
Atlikto tyrimo rezultatai parodė mažesnį embrionų implantacijos vietų skaičių Mech (2,6 vnt. ± 1,1 vnt.) ir Mech-EndMKL (3,8 vnt. ± 1,3 vnt.) grupėse, lyginant su kontroline grupe (5,2 vnt. ± 0,8 vnt.) (25 pav.). Minėti skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 7,72; df = 2; p = 0,02). Embrionų implantacijos vietų skaičius kontrolinėje grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei Mech grupėje (*Bonferroni* kriterijus; p < 0,05), nors kartu nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp kontrolinės ir Mech-EndMKL grupių bei Mech ir Mech-EndMKL grupių (*Bonferroni* kriterijus; p > 0,05) (Bausyte *et al.*, 2023). Visgi, Mech-EndMKL grupėje embrionų implantacijos vietų skaičius buvo didesnis nei Mech grupėje.



25 paveikslas. Embrionų implantacijos vietų skaičiaus viename gimdos rage įvertinimas mechaniniu būdu paveiktoje *in vivo* tyrimo pelių patelių grupėje priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra (*n = 5*), Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu (*n = 5*), ir Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija (*n = 5*). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD. Statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant *Kruskal-Wallis* ir *Bonferroni* kriterijus; *reiškia p ≤ 0,05. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

Tiriant chemoterapija paveiktų pelių patelių savaiminio pastojimo galimybes, nustatytas atitinkamas grupių pasiskirstymas nuo didžiausio embrionų implantacijos vietų skaičiaus gimdos raguose iki mažiausio: kontrolinė (10,8 vnt. ± 0,8 vnt.), Che-EndMKL (4,6 vnt. ± 0,5 vnt.) ir Che (0,2 vnt. ± 0,5 vnt.) grupės (Bausyte *et al*., 2023) (26 pav.). Statistinė analizė

patvirtino statistiškai reikšmingai didesnį embrionų implantacijos vietų skaičių Che-EndMKL grupėje, lyginant su Che grupe (*Kruskal-Wallis* kriterijus; H = 12,89; df = 2; p = 0,002; *Bonferroni* kriterijus; p < 0,001). Taip pat buvo nustatyta, kad embrionų implantacijų vietų skaičius buvo statistiškai reikšmingai didesnis kontrolinėje nei Che-EndMKL grupėje ir Che-EndMKL nei Che grupėje (*Bonferroni* kriterijus; p < 0,05).



26 paveikslas. Embrionų implantacijos vietų skaičiaus dviejuose gimdos raguose įvertinimas chemoterapija paveiktoje *in vivo* tyrimo pelių patelių grupėje priklausomai nuo EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra (*n = 5*), Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija (*n = 5*), ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija (*n = 5*). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD. Statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant *Kruskal-Wallis* ir *Bonferroni kriterijus*; *reiškia p ≤ 0,05. Pagal Bausyte *et al.,* 2023.

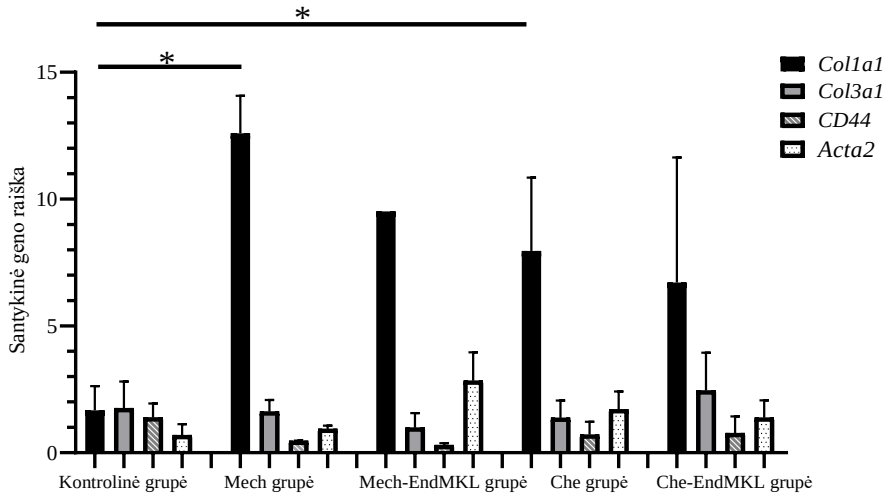
Savaiminio pelių patelių pastojimo vertinimo rezultatai leidžia formuluoti teiginius, kad mechaniniai veiksniai ir chemoterapija gali sukelti endometriumo patologiją, neigiamai paveikiančią pastojimo rezultatus, tačiau kartu yra pastebimas teigiamas EndMKL terapijos poveikis abiejose situacijose.

3.6.5. Fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose svarbių genų raiškos pokyčiai

Doktorantūros studijų metu buvo įvertinta *Col1a1, Col3a1, Acta2* genų, svarbių fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose, ir *CD44* geno,

kurio koduojamas baltymas dalyvaują tarpusavio ląstelių sąveikoje, adhezijoje ir migracijoje bei turinčio sąsajų su užląstelinės matricos molekulių, tokių kaip kolagenas, fibronektinas ir osteopontinas, prisijungimu, raiška (Bausyte *et al.*, 2023) (27 pav.).

RT-kPGR tyrimo rezultatai parodė, kad *Col1a1* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė Mech ir Che grupėse, lyginant su kontroline pelių patelių grupe. Taip pat stebėta mažesnė šio geno raiška atitinkamai Mech-EndMKL ir Che-EndMKL grupėse nei Mech ir Che grupėse. *Col3a1* geno raiška skirtingose pelių patelių grupėse buvo labai panaši, nors Che-EndMKL grupėje ji buvo didesnė nei Che grupėje. *CD44* geno raiška visose endometriumo patologijos pelių patelių grupėse buvo mažesnė, lyginant su kontroline grupe, nors statistiškai reikšmingų skirtumų nepastebėta. Kartu nustatyta didesnė *Acta2* geno raiškos tendencija Mech-EndMKL grupėje nei Mech grupėje.



27 paveikslas. Fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose svarbių genų *Col1a1*, *Col3a1*, *Acta2* ir *CD44* genų raiškos analizė pelių patelių gimdos rago audinių mėginiuose priklausomai nuo skirtingų veiksnių naudojimo ir EndMKL terapijos skyrimo: kontrolinė grupė – pelių patelės, kurioms nebuvo atlikta jokia intervencinė procedūra (*n = 2*), Mech grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu (*n = 2*), Mech-EndMKL grupė – pelių patelės, kurių gimdos rago ertmė buvo paveikta mechaniniu būdu, o po to skirta EndMKL terapija (*n = 1*), Che grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija (*n = 6*), ir Che-EndMKL grupė – pelių patelės, kurioms buvo skirta chemoterapija, o po to – EndMKL terapija (*n = 2*). Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD. Statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant *Mann-Whitney* kriterijų; *reiškia $p \leq 0,05$. Pagal Bausyte *et al.*, 2023.

Atlikto tyrimo duomenys ne tik siejasi su anksčiau nustatytais histologinių tyrimų ir savaiminio pelių patelių pastojimo vertinimo rezultatais, tačiau kartu rodo genetinių bei epigenetinių tyrimų vystymo tikslingumą endometriumo patologijos sukeltų vaisingumo sutrikimų atvejais, siekiant geriau suprasti etiopatogenezinus mechanizmus ir korekcijos galimybes.

3.7. Su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės savijautos ir pastojimo rezultatų sąsajos genų raiškos lygmeniu

Doktorantūros studijų metu 32 moterų, kurioms buvo planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, psichologinė sveikata buvo įvertinta pagal HAD skalę, o vėliau gauti rezultatai palyginti su jų pastojimo dažniu po atliktų pagalbinio apvaisinimo procedūrų ir RT-kPGR metodu ištirtos atitinkamų genų raiškos EndMKL, surinktose iš tų pačių moterų.

Žvalgomojo mokslinio tyrimo dalyvių amžius svyravo nuo 23 iki 41 metų (vidurkis – 33,4 metų), o jų porų nevaisingumo trukmė buvo bent 12 mėnesių laiko (2–19 metų, vidurkis – 6,7 metų).

Daugiau nei pusės moterų KMI buvo normalus (18,5–24,9) (62,5 proc., *n = 20*), 37,5 proc. moterų (*n = 12*) turėjo antsvorį (25–29,9).

Gretutinėmis lytinės ir reprodukcinės sistemos ligomis, iš kurių dažniausia buvo I stadijos (minimali) endometriozė (25 proc., *n = 8*), sirgo 50 proc. (*n = 16*) moterų. Mažiau nei penktadaliui dalyvių buvo diagnozuoti kitų organizmo sistemų sutrikimai (18,8 proc., *n = 6*), tačiau visais atvejais, kai buvo atliekamas mokslinis tyrimas, jie buvo tinkamai kontroliuojami.

Įvertinus moterų reprodukcinės sveikatos anamnezės duomenis, daugiau nei trečdaliui iš jų (40,6 proc., *n = 13*) anksčiau nebuvo skirtas nevaisingumo gydymas ir jos iš karto atitiko indikacijas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklams. Taip pat didžioji dalis moterų neturėjo vaikų (87,5 proc., *n = 28*).

Remiantis HAD skale, 12 iš šiame moksliniame tyrime dalyvavusių moterų (37,5 proc. tiriamosios populiacijos) buvo nustatyti nerimo simptomai, o 1 – depresija (HAD-D poskalės balų vertė – 8), kuriai pasireiškė ir stipraus nerimo simptomai (HAD-N poskalės balų vertė – 13). Bendrai dalyvių jaučiamo nerimo vertės svyravo nuo 0 iki 13 HAD-N poskalės balų (vidurkis – 6,19 ± 3,42), o depresijos – nuo 0 iki 8 HAD-D poskalės balų (vidurkis – 2,13 ± 2,06).

Vertinant šių moterų pastojimo po tyrimo metu atlikto pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo rezultatus, buvo nustatyta, kad

daugiau nei pusė tiriamosios populiacijos pastojo ir joms buvo patvirtintas klinikinis nėštumas (59,4 proc., *n = 19*), o 13 moterų (40,6 proc.) nepastojo.

Remiantis HAD skalės ir klinikinių nėštumų užsimezgimo po skirto vaisingumo sutrikimų gydymo rezultatais, mokslinio tyrimo metu moterys buvo išskirstytos į keturias grupes:

1. moterys, kurios neišreiškė nerimo simptomų ir pastojo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo (nerimo neišreiškusių pastojusių moterų grupė; *n = 10*);
2. moterys, kurioms pasireiškė nerimas ir jos pastojo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo (nerimą išreiškusių pastojusių moterų grupė; *n = 9*);
3. moterys, kurios neišreiškė nerimo simptomų ir nepastojo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo (nerimo neišreiškusių nepastojusių moterų grupė; *n = 10*);
4. moterys, kurioms pasireiškė nerimas ir jos pastojo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo (nerimą išreiškusių nepastojusių moterų grupė; *n = 3*).

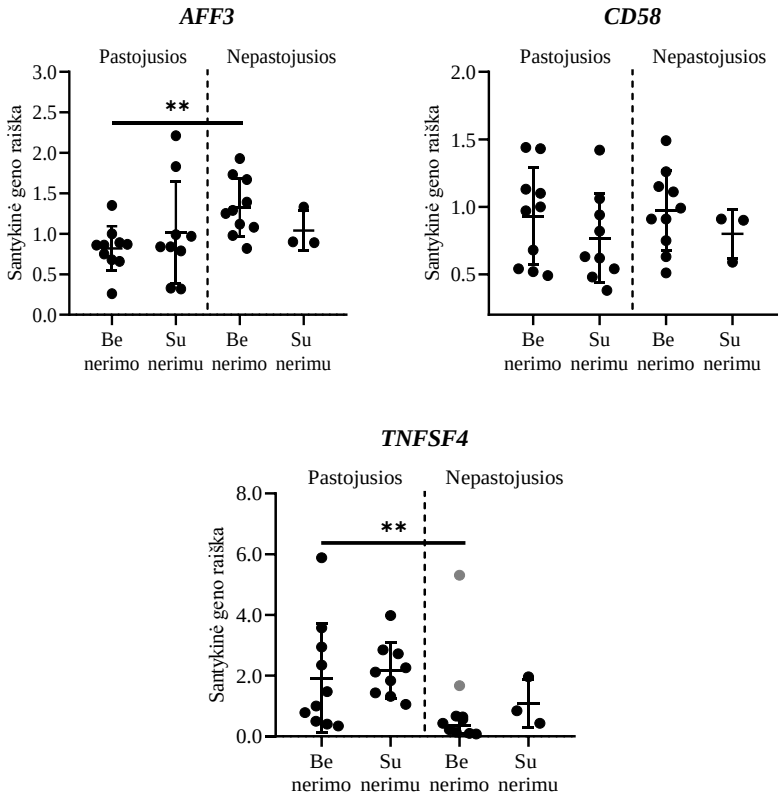
RT-kPGR metodu atlikta šių genų raiškos analizė:

1. genų, susijusių su ląstelės ciklo veiklos ir transkripcijos / transliacijos procesų reguliavimu (*SLC39A1, RBM6, BLCAP, GATAD2B, RNF123, RECQL4*);
2. genų, susijusių su imuninio atsako kontrole (*AFF3, CD58, TNFSF4*);
3. genų, susijusių su tarpląstelinio signalo perdavimo reguliavimu (*ESR1, CRTC2, CXCL8, PPP1R16A, NDN, GRB10, HTR2A, RB1, NR3C1, AXL*);
4. genų, susijusių su ląstelės diferenciacijos kontrole (*PAX8AS1, H19, EFNA5, IGF2*);
5. genų, susijusių su angiogenezės ir hemostazės sistemų, svarbių blastocistos implantacijai endometriume, kontrole (*CYR61, TFP12*);
6. geno, susijusio su ląstelės sekrecija (*MON1A*).

Aktualiausių genų raiškos pokyčiai, atsižvelgiant į su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinę savijautą ir pastojimo rezultatus po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklo, apžvelgiami toliau.

RT-kPGR metodu analizuojant su imuninio atsako reguliavimu susijusių genų raišką, nustatyta, kad *AFF3* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė, o *TNFSF4* – statistiškai reikšmingai mažesnė nerimo nejautusių ir nepastojusių moterų grupėje nei nerimo neišreiškusių ir pastojusių tiriamųjų grupėje (28 pav.). Taip pat buvo pastebėta mažesnės

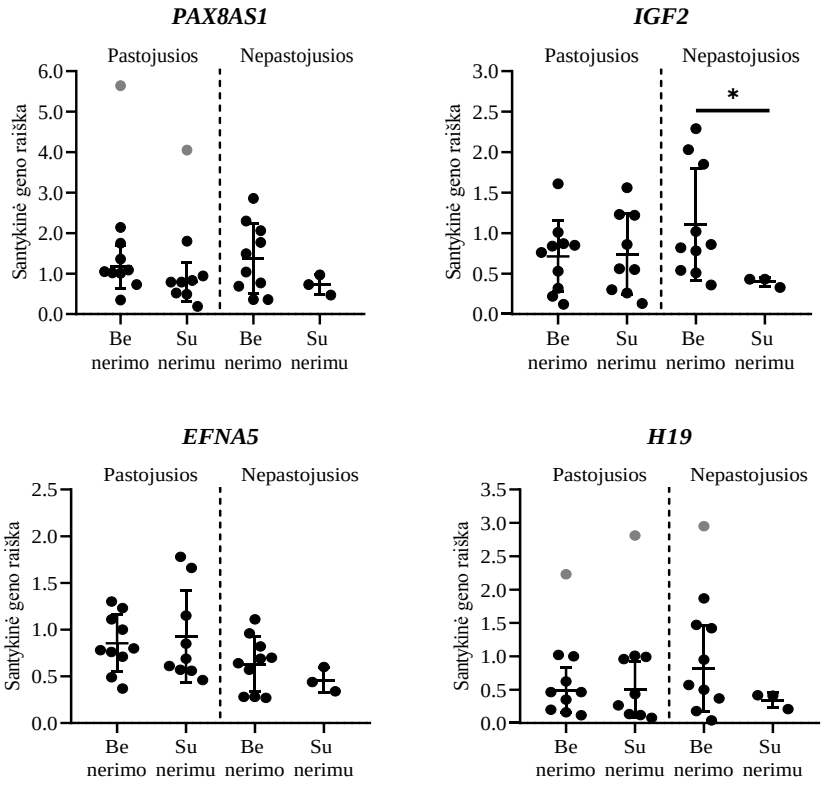
TNFSF4 geno raiškos tendencija nepastojusių moterų grupėje, lyginant su pastojusiomis moterimis, nepriklausomai nuo jų psichologinės savijautos. *TNFSF4* geno raiška statistiškai reikšmingai teigiamai (biologiniu požiūriu) koreliavo su moterų jaučiamo nerimo vertėmis bei pastojimo rezultatais po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų (Priedas Nr. 7). Tuo tarpu *CD58* geno raiška buvo mažesnė nerimą jautusių moterų grupėse, nepriklausomai nuo jų pastojimo rezultatų (28 pav.).



28 paveikslas. Su imuniniu atsaku susijusių genų (*AFF3*, *CD58* ir *TNFSF4*) raiškos, moterų psichologinės savijautos ir pastojimo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų rezultatai. Tyrimo grupės: nerimo neišreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 9*), nerimo neišreiškusių ir nepastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 3*). Genų raiškos analizė atlikta RT-kPGR metodu. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; pilki duomenų taškai rodo nuokrypius pagal ROUT (Q = 5 proc.); **reiškia $p \leq 0{,}01$, remiantis *Mann-Whitney* kriterijumi.

Su ląstelės diferenciacijos kontrole susijusių *PAX8AS1*, *IGF2*, *EFNA5* ir *H19* genų raiškos analizės rezultatai parodė tendenciją, kad jų raiška nerimą išreiškusių ir nepastojusių moterų grupėje buvo mažesnė, lyginant su likusia

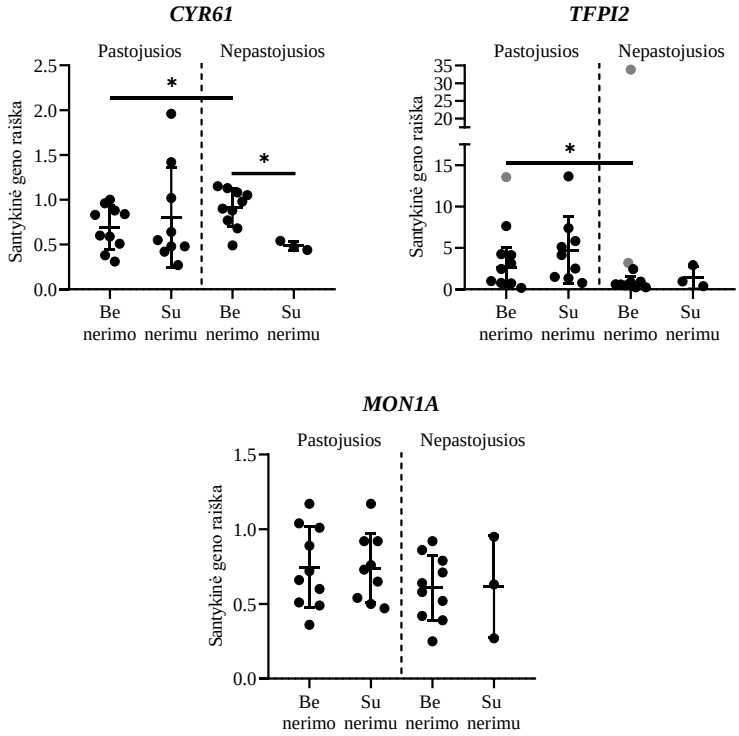
tiriamosios imties dalimi (29 pav.). Stebėta mažesnė *PAX8AS1* geno raiška nerimą išreiškusių moterų grupėse, nepriklausomai nuo jų pastojimo rezultatų. *IGF2* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė nerimo nejautusių ir nepastojusių moterų grupėje, lyginant su nerimą išreiškusiomis ir nepastojusiomis moterimis, o pastarojoje grupėje aptariamo geno raiška apskritai buvo mažiausia. *EFNA5* ir *H19* genų raiška irgi buvo mažiausia nerimą jautusių ir nepastojusių moterų grupėje.



29 paveikslas. Su ląstelės diferenciacija susijusių genų (*PAX8AS1*, *IGF2*, *EFNA5* ir *H19*) raiškos, moterų psichologinės savijautos ir pastojimo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų rezultatai. Tyrimo grupės: nerimo neišreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 9*), nerimo neišreiškusių ir nepastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 3*). Genų raiškos analizė atlikta RT-kPGR metodu. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; pilki duomenų taškai rodo nuokrypius pagal ROUT (Q = 5 proc.); **reiškia $p \leq 0{,}01$, remiantis *Mann-Whitney* kriterijumi.

RT-kPGR metodu atliktos su angiogenezės ir hemostazės sistemų, svarbių embrionų implantacijos endometriume procese, kontrole susijusių *CYR61* ir *TFPI2* genų raiškos analizės duomenimis, *CYR61* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai didesnė nerimo nejautusių ir nepastojusių moterų grupėje nei nerimo neišreiškusių ir pastojusių bei nerimą išreiškusių ir nepastojusių moterų grupėse (30 pav.). Visgi, žemiausia jo vertė nustatyta nerimą jautusių ir nepastojusių moterų grupėje. *TFPI2* geno raiška buvo mažesnė nepastojusių moterų grupėje, lyginant su pastojusiomis, nepriklausomai nuo abiejų moterų grupių psichologinės savijautos, kai statistiškai reikšmingai mažesnė aptariamo geno raiška buvo nustatyta nerimo nejautusių ir nepastojusių moterų grupėje, lyginant su nerimo nejautusiomis ir pastojusiomis tiriamosiomis. Kartu *TFPI2* geno raiška statistiškai reikšmingai teigiamai (biologiniu požiūriu) koreliavo su moterų jaučiamo nerimo vertėmis bei pastojimo rezultatais po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų (Priedas Nr. 7).

Su ląstelės sekrecija siejamo *MON1A* geno raiška skirtingose moterų grupėse buvo panaši (30 pav.).



30 paveikslas. Su angiogenezės ir hemostazės sistemų, svarbių blastocistos implantacijai endometriume, kontrole susijusių genų (*CYR61, TFPI2*) ir su ląstelės

sekrecija susijusio geno (*MON1A*) raiškos, moterų psichologinės savijautos ir pastojimo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų rezultatai. Tyrimo grupės: nerimo neišreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 9*), nerimo neišreiškusių ir nepastojusių moterų grupė (*n = 10*), nerimą išreiškusių ir pastojusių moterų grupė (*n = 3*). Genų raiškos analizė atlikta RT-kPGR metodu. Rezultatai pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± SD; pilki duomenų taškai rodo nuokrypius pagal ROUT (Q = 5 proc.); **reiškia $p \leq 0,01$, remiantis *Mann-Whitney* kriterijumi.

Apibendrinant vaisingumo sutrikimus turinčių moterų psichologinės sveikatos vertinimo HAD skale, jų pastojimo po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų ir RT-kPGR metodu atliktos genų raiškos EndMKL rezultatus, formuojasi įžvalgos, kad moterų jaučiamas nerimas gali daryti įtaką vaisingumo sutrikimų išsivystymui ir jų gydymo rezultatams, o šis poveikis vykti genų raiškos kitimo lygmeniu, tačiau reikalingi tolesni šios krypties tyrimai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Vaisingumo sutrikimai – globalinė problema, paliečianti milijonus vaisingo amžiaus žmonių. Šiuolaikinėse visuomenėse nevaisingumo tema tampa vis aktualesnė ir platesniu požiūriu, kai dėl mažėjančių gimstamumo rodiklių susiduriama su tokiais reikšmingais socialiniais iššūkiais kaip visuomenės senėjimas ir su tuo susiję padariniai. Remiantis 2020 m. paskelbtomis statistinėmis prognozėmis, pasaulio gyventojų skaičius piką turėtų pasiekti 2064 m., o 2100 m. 183 pasaulio šalyse suminis gimstamumo rodiklis bus mažesnis nei reikalingas kartų kaitai užtikrinti (Vollset *et al.,* 2020). Paminėtina, kad Lietuvoje pastarasis rodiklis stabiliai mažėja nuo 2015-ųjų m. ir naujausiais 2022 m. duomenimis tesiekia 1,27, kai palankiausia demografinė pusiausvyra, užtikrinanti kartų kaitą, yra tada, kai jis svyruoja apie 2,1 (Oficialios statistikos portalas, 2022).

Daugėjant atliekamų vaisingumo sutrikimų diagnostikos ir gydymo procedūrų, jau kurį laiką yra pastebima, kad nevaisingumas, kaip bendra sveikatos būklė, turi įtakos ne tik psichologinei žmogaus gerovei, daugeliui jo socialinio gyvenimo sričių, bet ir demografiniams, medicininiams bei ekonominiams visos šalies rodikliams. Dėl šių priežasčių Lietuvoje ir kitose šalyse vis daugiau dėmesio skiriama tinkamai ir laiku atliekamai vaisingumo sutrikimų diagnostikai bei korekcijai.

Nevaisingumo gydymas yra viena sparčiausiai besivystančių medicinos sričių, tačiau skaičiuojama, kad net šiandien 30–40 proc. visų porų lieka bevaikės penkerių metų laikotarpiu nuo diagnozės nustatymo, nepriklausomai nuo to, kad yra išbandžiusios visas galimas pagalbos priemones (Pinborg *et al.,* 2008). Viena pagrindinių to priežasčių, o kartu ir daugiausiai iššūkių keliančių reprodukcinės medicinos sričių – blastocistos implantacijos endometriume sutrikimai, susiję su pastarojo patologija. Tokiais atvejais, kai asmenims (poroms) nepavyksta pastoti išbandžius šiuo metu klinikinėje praktikoje taikomus gydymo metodus, vis dažniau pradedama svarstyti dėl galimybių taikyti kamieninių ląstelių terapiją.

Kamieninių ląstelių skyrimu pagrįsta pažeistų audinių ir organų terapija yra tapusi aktualia regeneracinės medicinos sritimi. Dėl didelio savaiminio atsinaujinimo ir proliferacijos potencialo, daugiakryptės diferenciacijos, parakrininio aktyvumo, imunomoduliuojančio veikimo, santykinai lengvo ir etinių dilemų nekeliančio gavimo plačiausiai pasaulyje naudojamu kamieninių ląstelių modeliu yra įvardijamos MKL, o dažniausiu jų šaltiniu išlieka kaulų čiulpai. Visgi, pastarųjų metų tyrimai rodo, kad

kituose organizmo audiniuose taip pat yra terapiškai aktyvių MKL, o apskritai teigiami šių ląstelių transplantacijos taikymo rezultatai kaulų čiulpų transplantacijos, odos ir akių ligų, ortopedijos ir traumatologijos srityje skatina plėsti tyrimus į kitas medicinos sritis, nors išlieka reikšmingų neatsakytų klausimų apie jų charakterizavimą, savybes bei panaudojimą. Šios išvardintos priežastys paskatino doktorantūros studijų mokslinių darbų kryptimi pasirinkti žmogaus endometriumo kilmės MKL charakteristikos ir jų klinikinio pritaikymo gydant endometriumo patologijos sukeltus vaisingumo sutrikimus galimybių tyrimus.

Pirmasis doktorantūros studijų metu vykdytų mokslinių tyrimų siekis buvo įvertinti MKL išskyrimo iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių bei identifikavimo galimybes. Endometriumo kilmės MKL išskyrimui buvo pasirinkti *Tavakol* su kolegomis ir *Tsolova* su kolegomis sudaryti protokolai (Tavakol *et al.*, 2018; Tsolova *et al.*, 2022), o charakterizuoti – 2006 m. TLTD patvirtinti standartizuoti MKL apibrėžimo kriterijai (Dominici *et al.*, 2006).

Atliktų mokslinių tyrimų metu buvo nustatyta, kad:

1. iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės pasižymi ≥ 95 proc. MKL būdingų paviršiaus molekulių CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ir CD166 raiška ir ≤ 1 proc. kraujodaros kamieninėms ląstelėms būdingų paviršiaus molekulių CD34, CD45 ir CD117 raiška. Taip pat pastebėta teigiama CD140b žymens raiška (Skliutė *et al.*, 2021; Bausyte *et al.*, 2023). Šie rezultatai pasikartojo visuose doktorantūros studijų metu atliktuose moksliniuose tyrimuose ir išliko stabilūs ilgalaikio ląstelių kultivavimo metu. Tai patvirtino ląstelių kamieniškumą ir sutapo su ankstesnių mokslinių tyrimų, nagrinėjusių endometriumo kilmės MKL žymenų raiškos stabilumą ilgalaikio kultivavimo metu, duomenimis. *Somasundaram* mokslinių tyrimų metu vertino endometriumo kilmės MKL žymenų raišką skirtinguose pasažuose – 1-ame, 3-iame, 5-ame ir 10-ame, ir nustatė, kad tiek ankstyviesiems, tiek vėlyviesiems pasažams yra būdinga stabiliai teigiama ląstelių paviršiaus molekulių CD44, CD166, CD117, CD140b, CD146 raiška ir stabiliai neigiama ląstelių paviršiaus molekulių CD34, CD45 ir CD106 raiška (Somasundaram, 2017);
2. iš mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės pasižymi diferenciacija chondrogenine, osteogenine ir adipogenine kryptimis;

3. iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės atitinkamomis sąlygomis gali kibti prie plastiko paviršiaus.

Visų šių vertinimo krypčių rezultatai atitinka 2006 m. TLTD patvirtintus standartizuotus MKL kriterijus (Dominici *et al.*, 2006), tokiu būdu leidžiant teigti, kad iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės gali būti identifikuojamos kaip endometriumo kilmės MKL. Kartu gauti duomenys skatina pažvelgti į šaltinių, skirtų išskirti aptariamas ląsteles, surinkimo metodikas ir diskusijas, susijusias su pastarųjų lokalizacija.

Aukščiau pateikti rezultatai įrodo, kad endometriumo pažaida ir jai analogiškos procedūros (pavyzdžiui, endometriumo biopsija) bei mėnesinių kraujo ėminių surinkimas yra tinkami metodai endometriumo kilmės MKL išgauti. Tokiu būdu paneigiamos vis dar pasitaikančios abejonės dėl šių procedūrų taikymo, motyvuojant, jog MKL yra išsidėsčiusios tik pamatiniame endometriumo sluoksnyje.

Gauti duomenys yra ypač svarbūs kalbant apie mėnesinių kraujo ėminių naudojimą. Galimybė lengvai surinkti santykinai didelius aukštu proliferacijos, savaiminio atsinaujinimo ir diferenciacijos potencialu pasižyminčių MKL kiekius, kartu nesukeliant diskomforto pacientei, nesant anestezijos ir hospitalizacijos poreikio bei išvengiant etinių dilemų, yra vertinga priemonė endometriumo kilmės MKL terapijos taikymui ne tik moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos patologijų atveju, bet ir kitose regeneracinės medicinos srityse. Tačiau būtina pripažinti, kad tiksli endometriumo kilmės MKL lokalizacija *in vivo* modeliuose vis dar yra susijusi su tam tikrais prieštaravimais.

Remiantis daugelio *in vivo* tyrimų duomenimis, yra sutariama dėl MKL išsidėstymo už kraujagyslių ribų esančiose specialiose nišose, o jų lokalizacijai audiniuose ir organuose nustatyti dažnai yra naudojama bendra teigiama ląstelės paviršiaus molekulių CD140b ir CD146 raiška (Crisan *et al.*, 2008). Šie žymenys įvardijami vienais pagrindinių perivaskulinių ląstelių (pericitų) identifikacijos kriterijų. Dėl panašios ląstelių paviršiaus molekulių raiškos ir funkcinių savybių kai kurie mokslininkai terminus „pericitai“ ir „mezenchiminės kamieninės ląstelės“ vartoja sinonimiškai (Davidoff, 2019), o *in vitro* auginamas MKL įvardija tiesiog kaip kontakto su endotelinėmis ląstelėmis ir pamatine membrana netekusiais pericitais arba bent jau pericitų subpopuliacijomis. Beje, mokslinėje erdvėje terminas „endometriumo kilmės MKL“ taip pat pirmą kartą buvo pavartotas po to, kai endometriumo audinio ėminiuose didelį klonogeninį aktyvumą turinčios ląstelės buvo identifikuotos kaip $CD140b^{+}CD146^{+}$ ląstelių populiacija, išsidėsčiusi abiejuose

endometriumo sluoksniuose – funkciniame ir pamatiniame (Schwab & Gargett, 2007). Visgi, kita mokslininkų dalis daro didesnę skirtį tarp šių dviejų ląstelių grupių, juo labiau kad, naujausių tyrimų duomenimis, MKL yra nustatytos, pavyzdžiui, endoste (vidiniame antkaulyje) (Davidoff, 2019). Šie faktai rodo būtinybę tęsti atrankių žymenų, skirtų vienareikšmiškai identifikuoti endometriumo kilmės MKL, išvengiant ląstelių kultūrų heterogeniškumo ir galimų kitų skirtumų tarp *in vitro* ir *in vivo* modelių.

Siekiant įvertinti endometriumo kilmės MKL terapijos veiksmingumą endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo atveju, svarbu ištirti šių ląstelių diferenciacijos decidualine kryptimi galimybes.

Decidualizacija yra endometriumo audinio pasikeitimas, būtinas tam, kad blastocistos stadijos embriono implantacijos jame sąlygos būtų optimalios. Patologiniai šio proceso pokyčiai yra vieni pagrindinių veiksnių, lemiančių endometriumo receptyvumo, o kartu blastocistos implantacijos sutrikimus, kurių klinikinė išraiška yra vaisingumo sutrikimai ir nepalankios nėštumo baigtys. Todėl, siekiant nustatyti endometriumo kilmės MKL terapijos potencialą vaisingumo sutrikimų korekcijos atvejais, būtina suprasti jų transformacijos iš nediferencijuotos į decidualinę būseną sąlygas, žinoti pokyčius patvirtinančius kriterijus ir jų interpretavimą.

Endometriumo stromos ląstelių diferenciaciją decidualine kryptimi reguliuoja daugelis veiksnių, iš kurių pagrindiniais įvardijami antrinis informacijos nešiklis viduląstelinis cAMP ir kiaušidžių folikulų grūdėtosiose ląstelėse gaminamas steroidinis hormonas P4 (Makieva *et al.,* 2018; Okada *et al.,* 2018). cAMP ir hormono P4 įtaka endometriumo ląstelių decidualizacijai bei receptyvumui pasireiškia ne tik tiesiogiai, bet ir netiesiogiai, pavyzdžiui, aktyvuojant tokius veiksnius kaip HOXA10, FOXO1, HAND2, kurie yra atsakingi už transkripcijos, tarpląstelinių signalų perdavimo reguliavimą ir genų veiklą (Okada *et al.,* 2018).

Įrodyta, kad *in vitro* sąlygomis mitybinėje terpėje vien tik dėl individualaus cAMP poveikio reikšmingai padidėja vieno iš pagrindinių sėkmingą endometriumo kilmės MKL diferenciaciją decidualine kryptimi įrodančių kriterijų – PRL baltymo koncentracija. Analizuojant skirtingų mokslinių tyrimų metodologiją, galima rasti informacijos apie nediferencijuotų endometriumo kilmės MKL decidualizaciją *in vitro* modeliuose 4 dienas naudojant tik 0,5 mM db-cAMP produktą (Tamura *et al.*, 2012). Kartu yra pastebėta, kad PRL baltymo koncentracija mitybinėje terpėje dar labiau išauga dėl papildomo progesterono preparatų skyrimo. Todėl daugeliu atvejų endometriumo kilmės MKL diferenciacija decidualine kryptimi indukuojama naudojant skirtingus sintetinius cAMP analogus

junginyje su MPA (Gellersen & Brosens, 2003; Aghajanova *et al.*, 2009; Katoh *et al.*, 2018; Logan *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2020). Remiantis šiais duomenimis, doktorantūros studijų metu endometriumo kilmės MKL diferenciacijai decidualine kryptimi buvo naudotas 8-bromo-cAMP ir MPA junginys, o endometriumo kilmės MKL diferenciacija decidualine kryptimi įvertinta pagal dažniausiai pasitaikančius kriterijus – ląstelių morfologijos, atitinkamų genų raiškos ir baltymų koncentracijos pokyčius. Kiekvienas iš jų detaliau aptariamas tolesnėje apžvalgoje.

Atliktuose moksliniuose tyrimuose endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi kriterijai buvo įvertinti dviem etapais – praėjus 3 dienoms ir 6 dienoms nuo indukcijos pradžios. Nepriklausomai nuo šaltinio, iš kurio buvo išskirtos endometriumo kilmės MKL, ir išskirtų ląstelių diferenciacijos trukmės, visais atvejais pastebėtas ląstelių morfologijos pokytis decidualinių ląstelių linkme – endometriumo kilmės MKL vietoj fibroblastus primenančio, verpstės formos ląstelių fenotipo įgijo „epitelioidinių“ ląstelių išvaizdą. Įvertinus įvykusiai decidualizacijai patvirtinti naudojamų pagrindinių žymenų – *PRL, WNT4* ir *IGFBP1* genų raiškos bei IGFBP1 ir PRL baltymų koncentracijos pokyčius, taip pat buvo gauti teigiami rezultatai. Tai yra, nustatyta išvardytų kriterijų verčių didėjimo tendencija. Šie rezultatai sutampa su ankstesnių mokslinių tyrimų rezultatais (Matsumoto *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2012; Kautz *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2022). Pavyzdžiui, *Saleh* ir kolegų mokslinio darbo rezultatai parodė padidėjusią *PRL* ir *IGFBP1* genų raišką bei jų koduojamų baltymų kiekį decidualine kryptimi diferencijuotose endometriumo kilmės MKL, lyginant jas su nediferencijuotomis kontrolinėmis ląstelėmis (Saleh *et al.*, 2011).

Doktorantūros studijų metu atliktų tyrimų duomenys ne tik patvirtina endometriumo kilmės MKL diferenciacijai decidualine kryptimi naudotų adaptuotų protokolų efektyvumą, pačių ląstelių diferenciacijos potencialą, bet ir atskleidžia naujos reikšmingos informacijos. Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi vertinimo rezultatai, praėjus 3 dienoms ir 6 dienoms nuo indukcijos pradžios, buvo panašūs. Galimybė pasiekti efektyvią decidualizaciją dvigubai trumpesniu, tai yra 3 dienų trukmės, laikotarpiu galėtų būti itin reikšminga informacija vaisingumo sutrikimų diagnostikos ir gydymo srityse, siekiant optimizuoti procesus.

Studijuojant atliktuose tyrimuose taip pat buvo įvertinti endometriumo kilmės MKL, išskirtų iš mėnesinių kraujo ėminių, diferenciaciją decidualine kryptimi apibrėžiančių *PRL, PGR, ESR1, IGFBP1 ir FOXO1* genų raiškos, su ląstelių kamieniškumu ir savaiminio atsinaujinimo savybėmis siejamų *NOTCH1, NANOG, WNT4, KLF4, OCT4, SOX2* ir

LIN28A genų raiškos bei su angiogeneze siejamų *HIF1A, VEGFR2* ir *VEGFR3* genų raiškos skirtumai priklausomai nuo moterų sveikatos: moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų, grupėje (kontrolinė grupė), ir moterų, kurioms buvo planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, grupėje (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė).

Endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi analizės rezultatai parodė išvardytų genų raiškos padidėjimą decidualizacijos procese nepriklausomai nuo moters lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės bei diferenciacijos trukmės, atliepiant ir ankstesnes įžvalgas, tačiau kartu buvo pastebėti tam tikri subtilūs skirtumai tarp grupių.

Pirma, *PRL, ESR1, IGFBP1* ir *FOXO1* genų raiška buvo mažesnė moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne – IVF/ICSI arba atšildytų embrionų perkėlimo gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, lyginant su lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos neturinčių moterų grupe, praėjus 3 dienoms, ir išskyrus *ESR1* geną, praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos decidualine kryptimi pradžios. Tai galima paaiškinti šių genų charakteristika. Pavyzdžiui, *FOXO1* genas dėl gebėjimo reguliuoti su apoptozės skatinimu, ląstelių diferenciacija, vystymusi, DNR pažaidų taisymu bei apsauga nuo oksidacinės pažaidos susijusių genų veiklą dažnai nurodomas kaip vienas iš pagrindinių ląstelių gyvavimą ir veiklą kontroliuojančių veiksnių. Endometriume baltymo FOXO1 veikla yra ypač svarbi dėl jo galimybės reguliuoti su hormonu P4 susijusią ląstelių diferenciaciją, mėnesinių ciklišķumą bei motinos ir vaisiaus apsaugą nuo oksidacinės pažaidos (Kajihara *et al*., 2013). Pagrindiniu decidualizacijos proceso iniciatoriumi įvardijamas hormonas E2 veikia per *ESR1* geno koduojamus receptorius, o *PRL* ir *IGFBP1* genų koduojami baltymai apskritai yra pagrindiniai endometriumo ląstelių diferenciacijos decidualine kryptimi žymenys. Antra, nors gauti rezultatai atskleidė, kad ląstelių kamieniškumą ir savaiminį atsinaujinimą atspindinčių genų raiška išliko stabili tiek ankstyvųjų, tiek vėlyvųjų pasažų metu, tokiu būdu įrodant ląstelių gebėjimą daugintis bei savaime atsinaujinti ilgalaikio kultivavimo metu nepriklausomai nuo moters reprodukcinės sveikatos, tačiau būta ir skirtumų. Pastebėtos didesnės *KLF4* ir *WNT4* genų raiškos tendencijos kontrolinėje grupėje nei moterų, kurioms planuotas pagalbinis apvaisinimas, grupėje nepriklausomai nuo ląstelių diferenciacijos trukmės. Šie rezultatai atitinka ir tam tikrų tarptautinių mokslinių tyrimų duomenis. Pavyzdžiui, *Franco* su kolegomis atlikto eksperimentinio darbo rezultatai parodė, kad *WNT4* geno slopinimas yra susijęs su endometriumo decidualizacijos patologiniais pokyčiais, lemiančiais

embriono implantacijos endometriume sutrikimus dėl endometriumo stromos ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir atsako į hormono P4 veikimą pažaidų (Franco *et al.,* 2011). Sumažėjusi *KLF4* geno raiška gali įspėti apie endometriume slopinamą autofagijos procesą, kuris yra svarbus užtikrinti tinkamą decidualizaciją (Popli *et al.,* 2022). Didesnė kitų su ląstelių kamieniškumu ir savaiminiu atsinaujinimu siejamų genų – *NANOG* ir *NOTCH1* raiška kontrolinėje grupėje viso diferenciacijos proceso metu, esant statistiškai reikšmingam padidėjimui praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su neaiškios kilmės nevaisingumo grupe, taip pat leidžia daryti prielaidą dėl geresnio endometriumo regeneracijos ir diferenciacijos užtikrinimo pirmojoje grupėje. Tai galėtų sietis ir su atvirkštiniais *REX1* geno raiškos rezultatais, kai yra žinoma, kad esant normalioms sąlygoms ir prasidėjus ląstelių diferenciacijai *REX1* geno raiška reikšmingai greitai sumažėja (J. Wang *et al.,* 2006). Trečia, angiogenezę reguliuojančių *HIF1A, VEGFR2* ir *VEGFR3* genų raiškos rezultatai taip pat buvo didesni su nevaisingumu nesusidūrusių moterų grupėje, o tai leidžia daryti prielaidą, kad endometriumo kilmės MKL dalyvauja formuojantis uteroplacentinei kraujotakai ir užtikrinant jos veiklą.

Apibendrinti šios mokslinių tyrimų dalies rezultatai pagrindžia teiginį apie genetinių veiksnių įtaką endometriumo receptyvumo, nėštumo užsimezgimo bei tolesnio vystymosi procesams ir skatina tęsti šios krypties mokslinius tyrimus, siekiant gerinti vaisingumo sutrikimų diagnostiką ir gydymą.

Ląstelių ciklo reguliavimas turi daug įtakos jų gyvybingumui ir funkcionalumui. Tai yra itin svarbu kalbant apie endometriumo kilmės MKL, nes jos turi išlaikyti didelį proliferacinį, savaiminio atsinaujinimo ir diferenciacijos potencialą, reikalingą endometriumo regeneracijai per kiekvieną mėnesinių ciklą.

Molekuliniu lygmeniu senstančiose ląstelėse ir (arba) reaguojant į stresorius yra aktyvinami su DNR pažeidimo atsaku susiję baltymai, iš kurių vienas svarbiausių yra p53. Po stimuliacijos pastarasis reguliuoja daugelio tikslinių genų, susijusių su ląstelių ciklo sustabdymu, DNR atkūrimu, ląstelių senėjimu ir apoptoze, raišką (Fischer, 2017). Mokslinių tyrimų rezultatai rodo, kad p53 baltymas atlieka lemiamą vaidmenį palaikant genomo vientisumą (Williams & Schumacher, 2016), o jo funkcijos sutrikimai tiesiogiai ir netiesiogiai skatina chromosomų nestabilumą bei ląstelių senėjimą (He *et al.*, 2018). Pagrindinis p53 taikinys – nuo ciklinų priklausomas kinazės inhibitorius p21, kuris irgi yra siejamas su ląstelės ciklo sustabdymu esant DNR pažaidai (El-Deiry *et al.*, 1993; Waldman *et al.*, 1995; Bunz *et al.*, 1998).

Doktorantūros studijų metu atliktuose moksliniuose tyrimuose lytinės ir reprodukcinės patologijos neturinčių moterų grupėje (kontrolinė grupė) buvo pastebėtas statistiškai reikšmingai didesnis p53 baltymo santykinis lygis praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi nei nediferencijuotose MKL, o neaiškios kilmės nevaisingumo moterų grupėje (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė) statistiškai reikšmingas padidėjimas nustatytas praėjus jau ir 3 dienoms nuo decidualizacijos pradžios. Atvirkštiniai rezultatai gauti atlikus p21 baltymo santykinio lygio analizę: jo kiekis kontrolinėje grupėje buvo statistiškai reikšmingai didesnis, praėjus tiek 3 dienoms, tiek 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje šis skirtumas nustatytas tik praėjus 6 dienoms nuo decidualizacijos pradžios.

Aptiktos p53 ir p21 baltymų santykinio lygio pokyčių tendencijos rodo stabilią organizmo veiklos kontrolę siekiant užtikrinti sklandų ląstelių diferenciacijos procesą su nevaisingumu nesusidūrusių moterų grupėje. Statistiškai reikšmingas p53 ir p21 baltymų santykinio lygio padidėjimas abiejose moterų grupėse dažniau pastebėtas praėjus 6 dienoms nei 3 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL, galėtų sudaryti prielaidas optimaliu endometriumo kilmės MKL diferenciacijos decidualine kryptimi intervalu įvardyti 3 dienų laikotarpį. Ypač, prisimenant kitu doktorantūros studijų metu nustatytą sėkmingą endometriumo kilmės MKL decidualizaciją praėjus 3 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos pradžios. Šią hipotezę patvirtinus didesnės imties moksliniais tyrimais, būtų gauti klinikiniu požiūriu itin reikšmingi rezultatai, kai siekiama greitesnės terapijos taikymo koreguojant nevaisingumą.

Diskusijas skatinantys duomenys buvo nustatyti nagrinėjant ir kitų ląstelės ciklo reguliavime ir apoptozėje dalyvaujančių baltymų santykinį lygį.

Remiantis anksčiau atliktų mokslinių tyrimų rezultatais, padidėjęs baltymo Bax santykinis lygis skatina DNR fragmentaciją ir ląstelių apoptozę (Wei *et al.,* 2001), o ciklinas A2 dažnai yra įvardijamas pagrindiniu ląstelės ciklo reguliatoriumi, susijusiu su DNR replikacija ir ciklo perėjimu į mitozės stadiją (Silva Cascales *et al.*, 2021).

Doktorantūros studijų rezultatai parodė, kad Bax baltymo santykinis lygis kontrolinėje grupėje išliko stabilus visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje nuolat didėjo, esant statistiškai reikšmingam pokyčiui praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL.

Paminėtina, kad visais atvejais Bax baltymo lygis buvo didesnis moterims, neturinčioms lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų. Kartu vertinant ciklino A2 baltymo kiekio pokyčius, buvo nustatytas stabilus, statistiškai reikšmingas pastarojo reikšmės mažėjimas visą MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laiką neaiškios kilmės nevaisingumo moterų grupėje.

Apibendrinti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad ląstelės ciklo reguliavime ir apoptozėje dalyvaujantys baltymai gali daryti įtaką vaisingumo sutrikimų išsivystymui, nes moters lytinei ir reprodukcinei sveikatai užtikrinti yra svarbi aktyvi jų veikla. Tai sudaro pagrindą plėtoti mokslinius tyrimus, siekiant išsiaiškinti papildomas nevaisingumo diagnostikos ir korekcijos galimybes, tobulinti turimas priemones ir prognozuoti pastojimo tikimybę.

Kalbant apie MKL terapijos taikymo klinikinėje praktikoje galimybes nepriklausomai nuo kilmės šaltinio, didžiausią susirūpinimą kelia galimi jų pokyčiai *in vitro* salygomis. Siekiant surinkti reikiamą MKL kiekį, būtinas kartotinis jų pasidalijimas, išvengiant genetinio ir epigenetinio stabilumo sutrikimų, nes kamieninių ląstelių terapijai galima naudoti tik stabilias ląstelių populiacijas (S. Sharma & Bhonde, 2020). Juo labiau kad jau yra mokslinių tyrimų rezultatų, rodančių ilgalaikio kultivavimo neigiamą poveikį MKL morfologijai, funkcinėms savybėms ir bendrai ląstelių kokybei (Neri, 2019).

Kaip jau minėta, tinkama endometriumo regeneracija yra svarbi normaliam moters mėnesinių ciklo vyksmui ir reprodukcijai. Reikšmingą regeneracijos proceso dalį sudaro audinių specifinių ląstelių savybių išsaugojimas visu ląstelės gyvavimo laikotarpiu, reguliuojant savaiminį atsinaujinimą, proliferaciją ir diferenciaciją (Chiacchiera *et al.*, 2020). Šiuos procesus lemia specifinė genų raiška, kontroliuojama epigenetinių modifikacijų, kurios keičia chromatino struktūrą per DNR modifikacijas ir histonų modifikacijas (acetilinimą, metilinimą ir fosforilinimą) bei genų prieinamumą tam tikriems transkripcijos veiksniams.

Doktorantūros studijų metu buvo analizuoti epigenetinio reguliavimo žymenų – Ezh2, Suz12, H3K27me3, HDAC1, HyperAcH4 baltymų, susijusių su pagrindinėmis histonų modifikacijos galimybėmis, santykinio lygio pokyčiai MenMKL diferenciacijos metu.

Western blot metodu abiejose grupėse – moterų, kurios neturėjo lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų, grupėje (kontrolinė grupė) ir moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklas dėl neaiškios kilmės nevaisingumo, grupėje (neaiškios kilmės nevaisingumo grupė), buvo nustatytas mažesnis Ezh2 bei Suz12 baltymų santykis lygis praėjus 3 ir 6 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos decidualine kryptimi, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL. Statistiškai

reikšmingi skirtumai abiejų baltymų santykinio lygio pokyčių atvejais buvo kontrolinėje grupėje. Tiriant baltymo H3K27me3 santykinį lygį gauti atitinkami rezultatai: jo kiekis buvo statistiškai reikšmingai didesnis neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje, lyginant su kontroline, praėjus 3 dienoms nuo diferenciacijos indukcijos. Šiuos rezultatus galima paaiškinti jau žinomomis Ezh2, Suz12 ir H3K27me3 baltymų charakteristikomis bei jų tarpusavio sąsajomis.

Ezh2, Suz12 ir Eed yra *Polycomb* represinio komplekso (PRC) 2 subvienetai. Ezh2 įvardijamas pagrindiniu komponentu, o Suz12 ir Eed – svarbiais komplekso stabilumui ir Ezh2 metiltransferaziniam aktyvumui komponentais (Pasini *et al.*, 2004). PRC2 kartu su PRC1 yra histonų modifikatoriai ir sudaro bendrą *Polycomb* grupės (PcG) baltymų kompleksą. PRC2 katalizuoja histono H3K27 mono-, di- ir trimetilinimą PcG reguliuojamuose genuose (Nekrasov *et al.*, 2007) ir tokiu būdu inicijuoja transkripcijos represiją, o PRC1 palaiko represyvią chromatino būseną (Van Kruijsbergen *et al.*, 2015).

Moters mėnesinių ciklo metu vykstant endometriumo ląstelių diferenciacijai decidualine kryptimi, Ezh2 baltymo santykinis lygis palaipsniui mažėja ir sukelia H3K27me3 baltymo kiekio sumažėjimą pagrindinių decidualizaciją reguliuojančių genų *PRL* ir *IGFBP1* transkripcijos pradžios vietose (Grimaldi *et al.*, 2011; Liu, Huang, *et al.*, 2020). Tai yra labai svarbu reakcijai į antrinį informacijos nešiklį viduląstelinį cAMP ir hormoną P4 (atskirai arba bendrai), nes H3K27me3 histonų modifikacija yra nukreipta inicijuoti ir palaikyti su diferenciacija susijusių genų transkripcijos represinę būseną, siekiant išlaikyti kamieninių ląstelių pliuripotenciją (Boyer *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2015). Todėl stabiliai aukštas arba net didėjantis baltymų Ezh2, Suz12 ir H3K27me3 santykinis lygis ląstelių diferenciacijos metu gali neigiamai paveikti šį procesą, o kartu endometriumo receptyvumą ir blastocistos implantaciją jame. Priešingai, su aktyvia transkripcija susijusiame euchromatine (aktyvioje chromatino struktūroje) yra gausu chromatiną aktyvuojančių histonų modifikacijų, tokių kaip histonų acetilinimas.

Baltymų acetilinimas kontroliuoja chromatino struktūrą ir transkripcijos aktyvumą. Daugeliui transkripcijos koaktyviklių būdingas baltymų acetilazės aktyvumas, korepresoriams – baltymų deacetilazės aktyvumas. Tai patvirtina ir papildomi tyrimai. Pavyzdžiui, specifinio HDAC1 baltymo inhibitoriaus trichostatino A (TSA) santykinio lygio padidėjimas skatina pagrindinių decidualizacijos žymenų – PRL ir IGFBP1 baltymų kiekio didėjimą (Sakai *et al.*, 2003; Estella *et al.*, 2012).

Atliktuose moksliniuose tyrimuose buvo nustatytas didesnis HDAC1 baltymo santykinis lygis kontrolinėje nei su nevaisingumu susidūrusių moterų grupėje visu MenMKL diferenciacijos decidualine kryptimi laikotarpiu, o neaiškios kilmės nevaisingumo grupėje pastebėtas statistiškai reikšmingai didesnis jo santykinis lygis praėjus 6 dienoms nuo diferenciacijos pradžios, lyginant su nediferencijuotomis MenMKL. Atvirkštiniai rezultatai gauti HyperAcH4 baltymo santykinio lygio analizėje.

Apibendrinant epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų santykinio lygio rezultatus, matomos histonų modifikacijų ir vaisingumo sutrikimų išsivystymo galimos sąsajos, tačiau reikalingi tolesni didesnių imčių tyrimai, ypač histonų acetilinimo atveju.

Toliau tęstuose eksperimentiniuose darbuose buvo įtrauktas *in vivo* tyrimas, kuriame atlikta lyginamoji analizė tarp sveikų pelių patelių grupės (kontrolinė grupė) ir endometriumo patologiją turinčių pelių patelių grupių, priklausomai nuo endometriumo kilmės MKL terapijos skyrimo, remiantis histologiniais ir genetiniais tyrimais bei vizualiniu savaiminio pastojimo įvertinimu, skaičiuojant embrionų implantacijos vietas. Endometriumo patologija pelių patelėms buvo sukelta mechaniniu būdu arba skiriant chemoterapiją. Tolesnėje apžvalgoje plačiau panagrinėti šios dalies rezultatai.

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad Mech pelių patelių grupėje fibrozės intensyvumas buvo statistiškai reikšmingai didesnis visame gimdos rago skersmenyje ir atskiruose jo sluoksniuose – miometriume bei miometriume-endometriume, palyginus su Mech-EndMKL pelių patelių grupe. Ši tendencija pasikartojo ir chemoterapija paveiktų pelių patelių grupėse, kai didžiausias fibrozės išplitimas buvo Che grupėje, palyginti su Che-EndMKL ir kontroline grupėmis.

Gautus rezultatus galima paaiškinti žinomomis bendromis MKL savybėmis, būdingomis ir endometriumo kilmės MKL, – dideliu savaiminio atsinaujinimo, proliferacijos ir diferenciacijos potencialu, parakrininiu aktyvumu bei imunomoduliuojančiu poveikiu (Jimenez-Puerta *et al.,* 2020; Wiśniewska *et al.,* 2021; Wu *et al.,* 2022). Bendra jų sintezė sukuria palankias sąlygas sulėtinti fibrozės progresavimą ir (arba) atkurti pažeistus audinius, skatinant ląstelių regeneraciją, slopinant uždegiminius procesus ir apoptozę jose bei remodeliuojant užląstelinę matricą (L. Qin *et al.,* 2023).

Endometriumo kilmės MKL gebėjimas slopinti uždegiminius ir apoptozę skatinančius procesus audiniuose detaliau nagrinėtas ir *in vivo* tyrime.

Mech pelių patelių grupės gimdos rago audiniuose buvo nustatyta didesnė uždegiminių ląstelių, tokių kaip PMN ir limfocitai, bei apoptozinių

kūnelių infiltracija, lyginant su Mech-EndMKL ir kontroline grupėmis. Visgi, jų dažnis chemoterapija paveiktose pelių patelių grupėse buvo gana išsibarstęs. Tai gana netikėta, nes yra įrodyta, kad chemoterapija pasižymi tiesioginiu ir netiesioginiu neigiamu poveikiu endometriumui. Tiesioginis poveikis dažniausiai pasireiškia per endometriumo atipijos indukciją, o netiesioginis, sukeliant vieną iš pagrindinių ir itin sudėtingų moterų lytinės bei reprodukcinės sistemos patologijų – priešlaikinio kiaušidžių išsekimo sindromą, kuriam būdinga hipoestrogenizmas ir galiausiai endometriumo atrofija (Torrealday *et al.*, 2017; Spears *et al.*, 2019; Mauri *et al.*, 2020). Prieštaringi rezultatai pasikartojo atlikus viso pelių patelių gimdos rago skersmens ir endometriumo storio matavimus, ypač palyginus chemoterapija paveiktų ir kontrolinių pelių patelių grupes. Endometriumo storis kontrolinėje grupėje buvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei Che ir Che-EndMKL pelių patelių grupėse. Be to, gimdos rago skersmuo kontrolinėje grupėje buvo mažesnis nei chemoterapiją gavusių pelių patelių grupėse, nepriklausomai nuo endometriumo kilmės MKL terapijos skyrimo.

Šiuos diskusijas keliančius pastebėjimus būtų galima paaiškinti bent pora priežasčių – ilgesnio chemoterapijos veikimo laiko poreikiu ir standartizuotu histologijos ėminių paruošimu vertinimui, kai mėginiai būtų tiriami nepriklausomai nuo gimdos rago storio (šiuo atveju analizei buvo atrinkti storiausi pavyzdžiai po atliktų histologinių pjūvių). Gauti rezultatai skatina tolesnius mokslinius šios srities tyrimus, dėmesį skiriant ir optimalios metodologijos išgryninimui.

Svarbiausias *in vivo* tyrimo etapas buvo savaiminio skirtingų pelių patelių grupių pastojimo įvertinimas nustatant embrionų implantacijos vietų skaičių gimdos rage (-uose). Pelių patelių grupėje, kurioje endometriumo patologija buvo sukelta mechaniniu būdu, embrionų implantacijos vietos buvo skaičiuotas viename gimdos rage, o chemoterapija – dviejuose gimdos raguose.

Abiejose skirtingais patologiniais veiksniais paveiktose ir endometriumo kilmės MKL terapijos negavusiose pelių patelių grupėse embrionų implantacijos vietų skaičius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei kontrolinėje grupėje. Tačiau svarbiausia, kad tai atvejais, kai mechaniniu būdu arba chemoterapija paveiktoms pelių patelėms buvo atlikta endometriumo kilmės MKL transplantacija, jų savaiminio pastojimo vertimo rezultatai buvo geresni nei šios terapijos negavusių analogiškų pelių patelių grupėse, esant statistiškai reikšmingam skirtumui tarp Che ir Che-EndMKL grupių. Šie rezultatai gali būti paaiškinami keliomis priežastimis, kurios yra aktualios ir blastocistos implantacijai moters endometriume.

Pirma, fibrozės paveiktam endometriumui yra būdingas jungiamojo audinio išvešėjimas užląstelinėje matricoje, sutrikusi epitelizacija ir angiogenezė, o kiekviena iš šių priežasčių atskirai bei visos kartu yra linkusios sukelti sąaugų formavimąsi gimdos ragų (pelių patelėms) arba gimdos (moterims) ertmėse, o tai lemia embriono implantacijos endometriume sutrikimus (Deans & Abbott, 2010; Cai *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2019). Antra, apoptozė yra programuota ląstelės žūtis, vykstanti keliais etapais. Ją aktyvavus, ląstelė netenka sąlyčio su kitomis ląstelėmis, susitraukia, vyksta branduolio chromatino kondensacija, specifiniai fermentai skaido citoplazmos baltymus ir branduolio DNR, kol galiausiai ląstelės turinys pasidalija į atskiras, membranos gaubiamas pūsleles, vadinamas apoptoziniais kūneliais (Battistelli & Falcieri, 2020). Pastaruosiuose gali būti įvairių ląstelių komponentų, kaip mikrobranduoliai, chromatino liekanos, citozolio dalys, suskaidyti baltymai, DNR fragmentai arba net nepažeistos organelės bei kiti metabolitai, neigiamai paveikiantys įvairių genų ir jų koduojamų produktų raišką (Battistelli & Falcieri, 2020; Medina et al., 2020; Zeng *et al.*, 2020). Kartu apoptozinių ląstelių susiformavimo bei pašalinimo disbalansas gali sukelti uždegiminius ir imuninius procesus, kenkiančius embriono implantacijai endometriume, ir (arba) nėštumo komplikacijas vėlesniuose etapuose tiek *in vivo* modeliuose, tiek moters organizme (Fadok *et al.*, 1998; Savill *et al.*, 2002; Maderna & Godson, 2003). Galiausiai, fagocitai (PMN ir mononuklearai) yra pirmoji imuninio atsako grandis, vykdanti organizmo apsaugą nuo įvairių antigenų ir pašalinanti apoptozinius kūnelius. PMN reikšmė užsimezgant ir vystantis nėštumui yra vertinama nevienareikšmiškai. Šios ląstelės atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant tinkamą placentos vystymąsi ir moters organizmo toleranciją embrionui bei vaisiui, tačiau sutrikus imunoreguliacinėms funkcijoms ir (arba) atsakui į uždegimą gali būti susijusios su blastocistos implantacijos endometriume ir nėštumo vystymosi komplikacijomis (Bert *et al.*, 2021). NK ląstelės, T ir B limfocitai taip pat yra įvardijami kaip veiksniai, darantys neigiamą įtaką moters lytinei ir reprodukcinei sveikatai bei skatinantys ir (arba) prisidedantys prie tokių nepalankių nėštumo baigčių, kaip kartotiniai blastocistos implantacijos sutrikimai ir kartotiniai savaiminiai persileidimai (Robertson *et al.*, 2018; Marron & Harrity, 2019; Csabai *et al.*, 2020). Tam tikrų mokslinių tyrimų duomenimis, didesnis nei įprastai NK ląstelių kiekis gimdos audiniuose yra susijęs su prastesne aplinka blastocistos stadijos embriono implantacijai endometriume (X. Chen *et al.*, 2017; Kuon *et al.*, 2017; Odendaal & Quenby, 2021). Pavyzdžiui, 60 mokslinių straipsnių metaanalizės duomenimis, statistiškai reikšmingai didesnis gimdos NK ląstelių kiekis buvo nustatytas

kartotinius embriono implantacijos sutrikimus patyrusių moterų grupėje (p = 0,046, 604 moterys) ir kartotinius persileidimus patyrusių moterų grupėje (p = 0,02, 1100 moterys) nei kontrolinėje moterų grupėje (Von Woon *et al.*, 2022).

Papildomas *in vivo* tyrimo žingsnis buvo fibrozės formavimosi ir žaizdų gijimo procesuose dalyvaujančių genų raiškos pokyčių įvertinimas, atsižvelgiant į endometriumo kilmės MKL terapijos taikymą.

Analizuojant skirtingų pelių patelių grupių rezultatus pastebėta, kad *Col1a1* geno raiška buvo mažesnė Mech-EndMKL ir Che-EndMKL grupėse nei Mech ir Che grupėse ir statistiškai reikšmingai didesnė pastarosiose, lyginant su kontroline grupe. *Col1a1* genas koduoja pagrindinį I tipo kolageno komponentą – fibrilinį kolageną, randamą daugelyje jungiamųjų audinių. Kartu buvo nustatyta didesnė *Acta2* geno, koduojančio lygiųjų raumenų aktiną – alfa 2 aktiną, raiška mechaniniu būdu sukeltos endometriumo patologijos pelių patelių grupėje, kuriai buvo skirta EndMKL terapija, lyginant su analogiškai paveikto endometriumo pelių patelių grupe, kuriai EndMKL terapija neskirta. Aktino baltymai ne tik yra būtini ląstelių struktūrai, bet ir dalyvauja jų judrumo, vientisumo palaikymo ir tarpląstelinių signalų perdavimo procesuose. Atsižvelgiant į abiejų genų raiškos pokyčių vertinimo rezultatus, galima kelti prielaidą, kad endometriumo kilmės MKL terapija gali slopinti arba net visiškai sustabdyti fibrozės vystymąsi, daryti teigiamą įtaką endometriumo struktūrinėms ir funkcinėms charakteristikoms.

Apibendrinant *in vivo* tyrime gautus histologinių ir genetinių tyrimų, pelių patelių savaiminio pastojimo vertinimo duomenis, matomos prielaidos žengti link endometriumo kilmės MKL terapijos taikymo klinikiniuose tyrimuose ir praktikoje. Kartu daugiasluoksnis mokslinio tyrimo modelis skatina plėsti mokslinius tyrimus, skiriant dėmesį skirtingų metodologijų derinimui ir siekiant įvairiapusės nevaisingumo srities klausimų analizės. Viena iš tokių krypčių galėtų būti ir dažnesnė bei gilesnė psichologinio profilio vertinimo įtrauktis.

Bendrosios populiacijos tyrimuose jau yra įrodyta emocinės sveikatos įtaka fizinei savijautai. Nors moksliniai darbai, nagrinėjantys moters psichologinės gerovės ir reprodukcinės sveikatos sąsajas, irgi yra pradėti, tačiau neigiami išgyvenimai neretai dar vertinami tik kaip nevaisingumo ir (arba) nepalankių nėštumo baigčių padarinys. Geresnis šių procesų sąlyčio suvokimas ir įgytų žinių praktinis pritaikymas galėtų turėti teigiamos įtakos gydant vaisingumo sutrikimus. Todėl doktorantūros studijų metu buvo suformuluota hipotezė, kad psichologinė savijauta, jaučiamos emocijos galėtų

būti nevaisingumo bei pagalbinio apvaisinimo rezultatų veiksnys, o jų tarpusavio sąsajos išryškėti per genų raiškos profilio pokyčius.

Stresas – visuma apsauginių organizmo reakcijų, kylančių kaip atsakas į išorinių sąlygų pokytį ir (arba) vidinių stresorių pasireiškimą ir nukreiptų organizmo homeostazei išlaikyti bei išgyvenamumo tikimybei pagerinti (Ray *et al.*, 2017). Reaguojant į stresą vyksta kelių lygmenų pokyčiai – fiziologiniai (nervų, imuninės ir endokrininės sistemų), psichologiniai (emociniai ir kognityviniai) ir elgsenos. Priklausomai nuo stresoriaus intensyvumo, veiksnio trukmės ir organizmo atsparumo, stresas gali būti naudingas, pavyzdžiui, skatinti dėmesio koncentraciją, medžiagų apykaitą, arba žalingas – išprovokuoti nerimo sutrikimus, slopinti imuninę sistemą ir sukelti kitų organizmo sistemų patologinius pokyčius. Su streso pasireiškimu glaudžiai susiję nerimo sutrikimai, savo ruožtu, taip pat gali sukelti patologinius fizinės ir psichinės sveikatos pokyčius bei neigiamai paveikti elgseną.

Remiantis HAD skale, 37,5 proc. moterų, kurioms planuotas pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklas dėl poros nevaisingumo, buvo nustatyti nerimo sutrikimo simptomai. Nors dar reikia didesnės imties statistinių tyrimų, gauti rezultatai atitinka tarptautinių tyrimų duomenis, rodančius, kad su vaisingumo sutrikimais susiduriančių moterų tarpe nerimo sutrikimų dažnis siekia 25–36 proc., ir leidžia formuoti prielaidą apie nerimo sutrikimų kaip svarbaus psichologinės sveikatos veiksnio vaidmenį nevaisingumo temos kontekste.

Tolesniame etape gauti moterų psichologinės sveikatos, joms atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų dėl neaiškios kilmės nevaisingumo ir genų raiškos rezultatai leidžia įžvelgti tam tikras nerimo poveikio tendencijas aktualioms organizmo sistemoms ir procesams.

Doktorantūros studijų metu analizuojant su imuniniu atsaku susijusių genų raišką, buvo nustatyta mažesnė *TNFSF4* geno raiška nepastojusių nei pastojusių po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų moterų grupėje, esant statistiškai reikšmingam skirtumui tarp nerimo nejautusių tiriamųjų. Tai galėtų būti siejama su *TNFSF4* geno koduojamo baltymo, kuris yra svarbus antigeną pristatančių T limfocitų sąveikai bei jų adhezijai prie endotelio, veikla, kai dėl sutrikusio imuninio atsako neigiama įtaka daroma ir blastocistos implantacijai endometriume. Taip pat šioje vietoje galėtų būti svarbi streso (nerimo) poveikio trukmės skirtis. Trumpalaikis stresas mobilizuoja ir aktyvina imuninės sistemos ląsteles, tačiau ilgalaikė tokia būsena slopina imuninę sistemą, sukeldama imunosupresiją ir prisidėdama prie kitų sveikatos sutrikimų išsivystymo.

AFF3 bei *CD58* genų raiškos vertinimo atvejai kol kas neleidžia daryti nuoseklių išvadų dėl galimų sąsajų tarp moterų psichologinės sveikatos, pastojimo sėkmės ir genų raiškos.

Su ląstelių diferenciacija susijusių *PAX8AS1, EFNA5, IGF2* ir *H19* genų raiškos tyrimas parodė mažesnę jų raišką nerimą jautusių ir nepastojusių po pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų moterų grupėje, lyginant su pastojusiomis. Taigi, galima daryti prielaidą, kad sumažėjęs ląstelių diferenciacijos potencialas gali bloginti nėštumo užsimezgimo tikimybę, o nustatytos sąsajos – būti paveiktos moters psichologinės savijautos. Šių genų įtaką vaisingumo sutrikimų išsivystymui aiškintina jų vaidmeniu blastocistos implantacijos endometriume ir embriogenezės procesuose.

Pirma, *PAX8AS1* geno veikla yra siejama ne tik su daugelio žmogaus organų ir audinių formavimusi embriogenezės laikotarpiu, tačiau ir su tolesniais sklandžios jų veiklos užtikrinimo procesais, apimančiais ir ląstelių proliferaciją bei diferenciaciją (Poleev *et al.*, 1992). Antra, sumažėjusi *EFNA5* geno raiška lemia prastesnį organizmo atsaką į embriono ląstelių išskiriamą žCG, apimant sumažėjusią genų *PGR, PTGS2, ADAMTS4, TNFAIP6, EREG* ir *BTC* raišką, ovuliacijos sutrikimus ir galiausiai – vaisingumo sutrikimų išsivystymą (Buensuceso *et al.*, 2016). Trečia, *IGF2* geno veikla skatina embriono ir endometriumo sinchronijos ir sėkmingos blastocistos implantacijos endometriume procesus (Zhou *et al.*, 2021), daro poveikį folikulų augimui, kiaušialąsčių brendimui, embriono ir vaisiaus vystymuisi bei atlieka vieną svarbiausių vaidmenų užtikrinant efektyvią fetoplacentinę kraujotaką (T.-H. Wang *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019; Muhammad *et al.*, 2020). Ketvirta, atliekant *in vivo* tyrimus buvo pastebėta, kad nuslopinus *H19* geno raišką pelių patelių modeliuose, vyksta greitesnė folikulų atrezija, sumažėja antimiulerinio hormono (AMH) gamyba ir išskyrimas, todėl tokių pelių patelių vaisingumas sutrinka, palyginti su kontroline grupe (C. Qin *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2020).

Tiriant su angiogenezės ir hemostazės sistemomis, svarbiomis blastocistos implantacijos endometriume procese, susijusių *CYR61* ir *TFPI2* genų raiškos skirtumus priklausomai nuo moterų psichologinės savijautos ir joms atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų rezultatų, gauti heterogeniški duomenys, tačiau tam tikras sąsajas galima įžvelgti. Juo labiau kad jau yra pasirodžiusių mokslinių tyrimų duomenų apie streso ir nerimo gebėjimą aktyvuoti koaguliacinę ir fibrinolizinę organizmo sistemas (Geiser *et al.*, 2008).

CYR61 geno koduojamas baltymas priklauso ląstelių tarpusavio ryšių tinklo šeimai (CCN), todėl dalyvauja daugelyje ląstelių gyvybingumui ir

funkcionavimui svarbių procesų – ląstelių proliferacijoje, diferenciacijoje, migracijoje, adhezijoje ir užląstelinės matricos gamyboje (Yang *et al.*, 2017). Neretai jis yra siejamas ir su angiogenezės procesu. Pavyzdžiui, kalbant apie nėštumo užsimezgimą ir vystymąsi, yra žinoma, kad *CYR61* geno mutacija gali sukelti moters placentos angiogenezės, o kartu ir vaisingumo sutrikimus (Mo *et al.*, 2002). *In vivo* tyrime taip pat patvirtinta, kad didelė *CYR61* geno raiška gali pagerinti pastojimo rezultatus dėl endometriumo ir miometriumo regeneracijos bei angiogenezės indukcijos (Z. Li *et al*., 2019).

Doktorantūros studijų mokslinių darbų rezultatai parodė, kad *CYR61* geno raiška buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi nerimo neišreiškusių ir nepastojusių moterų grupėje, lyginant jas su nerimo neišreiškusiomis ir pastojusiomis bei nerimą išreiškusiomis ir nepastojusiomis moterimis, nors mažiausia jo vertė buvo nustatyta nerimą jautusių ir nepastojusių tiriamųjų grupėje. Pastarasis pokytis galėtų atspindėti sumažėjusios *CYR61* geno raiškos neigiamą įtaką endometriumo decidualizacijai ir blastocistos implantacijai per aukščiau išvardytų procesų sutrikimus.

Geno *TFPI2* raiškos tyrimų rezultatai atskleidė mažesnes jo vertes nepastojusių moterų grupėje, lyginant su pastojusiomis, nepriklausomai nuo abiejų moterų grupių psichologinės savijautos, kai statistiškai reikšmingas skirtumas buvo tarp nerimo nejautusių tiriamųjų. Gauti rezultatai gali būti paaiškinti keliomis priežastimis.

Pirma, yra nustatyta, kad TFPI2 baltymas reikšmingai slopina kraujo plazmoje esančio hidrolazių klasės fermento – plazmino aktyvumą (Kobayashi *et al.*, 2023). Plazminas dalyvauja skaidant fibriną, tirpdant krešulius ir inaktyvuojant tokius kraujo krešėjimo faktorius kaip V, VIII, IX ir X. Todėl TFPI2 baltymas yra svarbus hemostazės stabilizavimui nėštumo ir gimdymo metu, nes slopina kraujavimą ir prisideda prie su tuo susijusių nėštumo, vaisiaus ir motinos komplikacijų rizikos mažinimo. Antra, yra manoma, kad sumažėjęs TFPI2 baltymo kiekis gali lemti ir tarpląstelinių signalų perdavimo procesų bei ląstelių tarpusavio sąveikos sutrikimus (Bashiri *et al.*, 2014). Visgi, norint nustatyti nuoseklias sąsajas tarp *TFPI2* geno raiškos, moterų psichologinės sveikatos ir pastojimo sėkmės, mokslinius tyrimus reikėtų tęsti. Juo labiau, kad tiek *TFPI2* geno raiškos, tiek jau anksčiau aptarto su imunine sistema siejamo *TNFSF4* geno raiškos koreliacijos su moterų jaučiamo nerimo vertėmis ir pastojimo rezultatais po vaisingumo sutrikimų gydymo duomenys skatina kelti diskusiją net dėl skirtingo trumpalaikių ir ilgalaikių neigiamų psichologinių išgyvenimų poveikio.

Doktorantūros studijų metu atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad *TFPI2* ir *TNFSF4* genų raiška statistiškai reikšmingai didėjo stiprėjant moterų

jaučiamam nerimui, nors, kita vertus, didesnė šių genų raiška buvo siejama su dažnesniu nėštumų užsimezgimu po atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų. Nustatytus skirtumus bent iš dalies būtų galima paaiškinti jau šiuo metu turimomis žiniomis.

Pirma, trumpalaikio streso ir (arba) nerimo metu organizme yra inicijuojama „kovok – pulk“ reakcija, kurios sudedamosios dalys, priešingai nei ilgalaikio streso ir (arba) nerimo metu, yra padidėjęs imuniteto stiprumas ir intensyvesnė koaguliacija (Preckel & Von Känel, 2004; Dhabhar, 2009; Chu *et al.*, 2024). Antra, HAD skalė yra linkusi labiau atspindėti trumpalaikius neigiamus psichologinius išgyvenimus. Visgi, siekiant išsamesnių atsakymų, būtina tęsti atitinkamos krypties eksperimentinius darbus, didinant tyrimų imtis, naudojant jautresnius psichikos sveikatos vertinimo instrumentus bei diferencijuojant situacinių (trumpalaikio streso ir (arba) nerimo) ir asmenybinių (ilgalaikio streso ir (arba) nerimo) savybių reikšmę organizmui bei nėštumo užsimezgimui.

Apibendrinant doktorantūros studijų metu atliktų skirtingų krypčių mokslinių tyrimų rezultatus, galima teigti, kad endometriumo kilmės MKL dėl didelio savaiminio atsinaujinimo, proliferacijos ir daugiakryptės diferenciacijos potencialo, kai kartu yra išlaikomas genetinis bei epigenetinis stabilumas ilgalaikio ląstelių kultivavimo metu, bei sąlyginai lengvo, didelių sąnaudų nereikalaujančio ir etinių dilemų nekeliančio MKL gavimo turi potencialą, suvienijus daugiadalykės specialistų komandos kompetencijas, tapti veiksminga klinikine terapija ir pažangių biotechnologijų dalimi sudėtingos biopsichosocialinės problemos – nevaisingumo diagnostikos bei gydymo procesuose. Ypač tai pasakytina apie endometriumo kilmės MKL, išskirtas iš mėnesinių kraujo ėminių.

IŠVADOS

1. Moterų, neturinčių lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų, ir moterų, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas, remiantis anamneze, objektyvios apžiūros, instrumentinių ir laboratorinių tyrimų rezultatais, endometriumo audinio ir (arba) mėnesinių kraujo ėminiai yra tinkamas šaltinis endometriumo kilmės MKL išskirti ir atlikti tolesnius tyrimus.
2. Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtos ląstelės atitinka 2006 m. TLTD patvirtinus standartizuotus MKL apibrėžimo kriterijus. Išskirtos ląstelės pasižymėjo teigiama (≥ 95 proc.) MKL paviršiaus molekulių – CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 ir CD166 raiška ir neigiama (≤ 1 proc.) kraujodaros kamieninių ląstelių paviršiaus žymenų – CD34, CD45 ir CD117 raiška, joms buvo būdinga diferenciacija chondrogenine, osteogenine ir adipogenine kryptimis, jos kibo prie plastiko paviršiaus atitinkamomis sąlygomis.
3. Iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių išskirtoms MKL yra būdingas panašiai aukštas proliferacijos ir diferenciacijos decidualine kryptimis potencialas. EndMKL dvigubėjimo laikas ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų metu buvo 2,5 d. ± 0,3 d., o MenMKL – 3 d. ± 0,2 d. be statistiškai reikšmingo skirtumo. Endometriumo kilmės MKL sėkmingai diferencijavo decidualine kryptimi praėjus 3 ir 6 dienoms po atliktos indukcijos 8-bromo-cAMP ir MPA junginiu.
4. Endometriumo kilmės MKL decidualizacijos metu vykstantys genų raiškos, epigenetinio modifikavimo ir baltymų lygio pokyčiai yra susiję su endometriumo decidualizacija, receptyvumu ir vaisingumo sutrikimų išsivystymu. Didesnė decidualizaciją atspindinčių genų *PRL*, *ESR1*, *IGFBP1* ir *FOXO1*, su ląstelių kamieniškumu ir savaiminiu atsinaujinimu susijusių genų *KLF4, WNT4, NANOG* ir *NOTCH1* bei angiogenezei svarbių genų *HIF1A*, *VEGFR2* ir *VEGFR3* raiška ir mažesnė pliuripotencijos žymens – *REX1* geno raiška buvo nustatyta moterims, neturinčioms lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų. Histonų potransliacinės modifikacijos tyrimai atskleidė statistiškai reikšmingą baltymo H3K27me3 raiškos padidėjimą praėjus 3 dienoms nuo decidualizacijos indukcijos neaiškios kilmės nevaisingumo moterų grupėje. Epigenetinio reguliavimo žymenų Ezh2 ir Suz12 santykinis lygis statistiškai reikšmingai sumažėjo moterims, neturinčioms lytinės ir reprodukcinės sveikatos sutrikimų, visu endometriumo kilmės MKL decidualizacijos laikotarpiu, o statistiškai reikšmingų pokyčių neaiškios

kilmės nevaisingumo moterų grupėje nebuvo stebėta. Abiejose moterų grupėse endometriumo kilmės MKL decidualizijos metu didėjo ląstelės ciklo reguliavimui svarbių p53, p21 baltymų santykinis lygis, tačiau neaiškios kilmės nevaisingumo moterų grupėje išliko stabiliai mažesnis.

5. Endometriumo patologijos sukelto nevaisingumo *in vivo* modeliuose endometriumo kilmės MKL terapijos skyrimas yra susijęs su palankesnės mikroaplinkos blastocistos stadijos embriono implantacijai endometriume atkūrimu, skatinant pastarojo regeneraciją, slopinant fibrozės intensyvumą ir mažinant uždegiminių ląstelių bei apoptozinių kūnelių infiltraciją. Mech-EndMKL pelių patelių grupėje buvo nustatytas didesnis embrionų implantacijos vietų skaičius (3,8 vnt. ± 1,3 vnt.) nei Mech pelių patelių grupėje (2,6 vnt. ± 1,1 vnt.). Taip pat statistinė analizė patvirtino statistiškai reikšmingai didesnį embrionų implantacijos vietų skaičių Che-EndMKL pelių patelių grupėje (4,6 vnt. ± 0,5 vnt.), lyginant su Che pelių patelių grupe (0,2 vnt. ± 0,5 vnt.) ($p < 0,001$).
6. Nerimas gali daryti įtaką vaisingumo sutrikimams ir pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne procedūrų rezultatams genų raiškos pokyčių lygmeniu. Nustatyta, kad nerimą jautusių ir nepastojusių moterų grupėje buvo mažesnė su imuniniu atsaku susijusio geno *TNFSF4*, su ląstelių diferenciacija susijusių genų *PAX8AS1*, *EFNA5*, *IGF2* ir *H19* bei su angiogenezės ir kraujo krešėjimo sistemų veiklos kontrole susijusių genų *CYR61* bei *TFPI2* raiška, lyginant su nerimo nejautusių ir pastojusių moterų grupe.

REKOMENDACIJOS / ATEITIES TYRIMAI

1. Atrankių žymenų, skirtų vienareikšmiškai identifikuoti endometriumo kilmės MKL, surinktų iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių, nustatymas.
2. Mokslinių tyrimų, nagrinėjančių epigenetinio modifikavimo galimybes endometriumo kilmės MKL decidualizacijos metu, tęsimas.
3. *In vivo* ir klinikinių tyrimų, siekiant nustatyti optimalią endometriumo kilmės MKL terapijos skyrimo endometriumo patologijos sukelto arba su juo susijusio nevaisingumo atveju metodiką, vykdymas, vadovaujantis gydymo veiksmingumu ir būtinybe išvengti nepageidaujamų reakcijų bei komplikacijų.
4. Teorinėmis žiniomis ir praktiniais įrodymais grįstų gairių bei rekomendacijų sudarymas dėl endometriumo kilmės MKL taikymo endometriumo patologijos sukeltų arba su juo susijusių vaisingumo sutrikimų atvejais.
5. Psichologinės sveikatos įtakos vaisingumo sutrikimų išsivystymui ir nevaisingumo gydymo rezultatams tyrimų tęsimas, naudojant jautresnius psichikos sveikatos vertinimo instrumentus, diferencijuojant situacinių ir asmenybinių savybių reikšmę, bei atliekant longitudinius tyrimus.
6. Endometriumo kilmės MKL, surinktų iš endometriumo audinio ir mėnesinių kraujo ėminių, tyrimų plėtra moterų sveikatos būklės vertinimo, o sutrikimų bei ligų atvejais – jų korekcijos srityse.

SUMMARY

INTRODUCTION

Infertility is seen as a major global health problem with the latest World Health Organization (WHO) statistics estimating that approximately 1 in 6 people of reproductive age worldwide have experienced some form of fertility disorders at least once in their lifetime (World Health Organization, 2023). This health issue is not confined to a pathology of sexual and reproductive health, but also encompasses a complex psychological condition that can have a negative impact on an individual's well-being, activities, and relationships and can also lead to experiences of stigmatization. Infertility has been identified by WHO as the fifth highest serious global disability among young people (Deshpande & Gupta, 2019).

The ability to conceive and carry a fetus to term is a complex and challenging process: the most critical stage involves blastocyst implantation in the endometrium. This unique biological phenomenon is the combined result of a well-organized set of processes involving functioning of the endocrine and immune systems, cell adhesion, invasion and migration, and the interaction of genes and their regulating factors, while maintaining the importance of the individual expression of each factor. The qualitative parameters of the blastocyst, endometrial decidualization and receptivity, and embryo–endometrial synchrony are particularly important (Gellersen & Brosens, 2014; Shaodi *et al.*, 2020). Moreover, while blastocyst quality has long been considered the most important factor, recent results from preimplantation genetic studies have shown that there is only about 50% probability of conception after transfer of a euploid blastocyst during an assisted reproductive technology cycle (Craciunas et al., 2019; Casper, 2020). This discovery has inspired further research into the characteristics and role of the endometrium in the context of reproductive medicine, leading to the development of a new approach.

Pathological anatomical and/or functional changes in the endometrium at the time of blastocyst implantation can significantly contribute to the development of fertility disorders and adverse pregnancy outcomes, so it is crucial to be able to enact timely and effective correction. While a wide range of methods are currently available to address the situation, they receive a lot of criticism from medical professionals and patients: the results of the treatment are rather scattered with the remaining possibility of risks and complications, some opportunities can be prohibitively expensive

and ethically unacceptable to individuals and/or couples. Finally, in many cases, these methods do not address the fundamental causes of infertility and adverse pregnancy outcomes. In the light of these reasons, the search for more effective and acceptable medical care options remains ongoing.

The positive results of stem cell-based therapy in other medical fields have led to the launch of researchers on its potential for the treatment of fertility disorders caused by endometrial pathology. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have received the most attention due to their high potential for multilineage differentiation, self-renewal, sustained proliferation and paracrine activity, along with their immunomodulatory activity and avoidance of ethical dilemmas.

Currently, a growing number of research suggests that endometrium-derived MSCs, isolated from samples of endometrial tissue (EndMSCs), and endometrium-derived MSCs, isolated from samples of menstrual blood (MenMSCs), can provide a promising path towards correcting infertility caused by endometrial pathology as well as, more generally, autologous regenerative medicine (Abuwala & Tal, 2021). In particular, MenMSCs are receiving a lot of attention due to the relatively easy method to collect large volumes of cells without invasive procedures.

However, before the introduction of endometrium-derived MSCs for the treatment of fertility disorders in clinical practice, it is essential to address outstanding questions in important areas such as their heterogeneity, differentiation and immunogenicity, their ability to proliferate and to maintain genomic and epigenetic stability.

The aim of this work is to evaluate the molecular characteristics of human endometrium-derived MSCs and their therapeutic application in *in vivo* models of fertility disorders.

Objectives:

1. To select women according to established criteria, whose endometrial tissue and menstrual blood samples will be submitted for the isolation and further analysis of endometrium-derived MSCs;
2. To characterize the cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples according to standardized criteria for defining MSCs;
3. To evaluate and compare the proliferation and differentiation into decidual cells potential of EndMSCs and MenMSCs;

4. To study the changes in gene expression, epigenetic modification, and protein level occurring during differentiation of endometrium-derived MSCs in the decidual direction;
5. To determine the effects of endometrium-derived MSCs-based therapy on the endometrium, blastocyst implantation, and pregnancy development in different *in vivo* models of endometrial pathology;
6. To assess the influence of women's psychological health on fertility disorders and the results of assisted reproductive technologies performed on them at the level of gene expression.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL RELEVANCE

The use of MSCs in research on the aetiopathogenesis of fertility disorders and the analysis of their therapeutic potential is becoming increasingly common, although it still poses many challenges, lacking consistency and clarity of results. This is particularly true for one of the least studied types of MSCs to date – endometrium-derived MSCs.

During the doctoral studies, the characterization and therapeutic properties of endometrium-derived MSCs have been investigated from a multidisciplinary perspective, progressing from the initial stage of collecting endometrial tissue and menstrual blood samples as potential sources of MSCs to the final stage of using isolated and identified endometrium-derived MSCs to correct endometrial-factor induced infertility *in vivo*. While this is the first research cycle of this kind in Lithuania, it should be noted that the obtained results and insights are complementary to data from international research.

Firstly, the results of the research confirm that these cells are also present in the functional endometrial layer, dispelling the doubts raised in national and international field about the use of endometrial scratching to isolate endometrium-derived MSCs. Second, it has been shown that cells isolated from menstrual blood samples fulfill the standardized criteria for defining MSCs proposed by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) of the year 2006 (Dominici *et al.*, 2006), making menstrual blood samples a suitable source for the collection of MSCs. Thirdly, the research has contributed to the knowledge on the main characteristics of endometrium-derived MSCs, such as proliferation and differentiation potential, genomic and epigenetic stability, heterogenity and immunogenic activity. Fourthly, the doctoral studies have established a new research model in this field,

combining the assessment of endometrial morphological changes, gene expression and spontaneous pregnancy in different *in vivo* models of endometrial-factor induced infertility depending on the administration of endometrium-derived MSCs-based therapy, and the obtained results form the basis for clinical trials. Finally, it was shown tendencies that women expressed anxiety can be not only a consequence of infertility, but also a causal factor in the development of fertility disorders and affect the results of assisted reproductive technologies.

In conclusion, the results of conducted research confirm the potential of EndMSC- and MenMSCs-based therapy for the correction of endometrial-factor induced fertility disorders, the use of these cells in experimental models of fertility disorders, and the basis for the development of new biotechnological solutions and the continuation of previous ones. Also, the doctoral studies have highlighted the multifaceted nature of infertility and the need for a collaboration between multidisciplinary team in order to achieve optimal and timely diagnostic and therapeutic outcomes for fertility disorders.

Defensible claims:

1. Endometrial tissue and menstrual blood are suitable sources for the isolation of endometrium-derived MSCs;
2. Isolated MSCs from endometrial tissue and menstrual blood samples confirm the standardized criteria for defining MSCs;
3. EndMSCs and MenMSCs have a similar potential for cell proliferation and differentiation in the decidual direction;
4. Changes in the expression of decidualization-related genes (*PRL*, *ESR1*, *IGFBP1*, and *FOXO1*) and levels of proteins related to cell cycle regulation (p53 and p21) occurring during decidual differentiation of endometrium-derived MSCs affect endometrial decidualization, receptivity and, finally, the development of fertility disorders;
5. Endometrium-derived MSCs-based therapy is effective in endometrial-factor induced infertility in *in vivo* models;
6. Women expressed anxiety is not only a consequence, but also a causal factor in the development of fertility disorders and the results of assisted reproductive technology cycles.

1. METHODOLOGY

1.1. General information

The research works conducted during the doctoral studies were the components of the biomedical research "Investigations of the Therapeutic Potential of Human Endometrium-derived Mesenchymal Stem Cells", approved by the decision of Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (29/06/2018) No 158200-18/7-1049-550.

Criteria for the inclusion of participants:

1. The woman is scheduled to undergo an assisted reproductive technology procedure (*in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) or thawed embryo transfer cycle) due to unexplained infertility (in the case of collecting endometrial tissue samples and menstrual blood samples):
   1.1. Is aged between 18 and 45 years;
   1.2. The duration of a couple's infertility is at least 12 months;
   1.3. Agrees to inform the researcher of any change in her health, diagnostic procedures, treatment methods and results of the applied treatment.
2. The woman does not have disorders of the sexual and reproductive system (in the case of collecting menstrual blood samples):
   2.1. Is aged between 20 and 35 years;
   2.2. Agrees to inform the researcher of any change in her health, diagnostic procedures, treatment methods and results of the applied treatment.

Criteria for the exclusion of participants:

1. The woman is diagnosed with non-malignant endometrial pathology, such as uterine body polyp(s);
2. The woman has been diagnosed in the last 5 years with an oncological and/or rare disease;
3. The woman has been diagnosed with another medical condition that may negatively affect her fertility, infertility treatment and which is not currently adequately controlled and/or treated;
4. The woman has been taking exogenous hormonal drugs such as gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists, etc.;

5. The woman abuses or has an addiction to alcohol, narcotic, psychotropic and/or other toxic substances and/or has other harmful habits;
6. The woman does not agree to inform the researcher of any change in her health, diagnostic procedures, treatment methods and results of the applied treatment.

1.2. Performing an endometrial scratching

The endometrial scratching was performed for women scheduled for IVF/ICSI or thawed embryo transfer cycle due to unexplained infertility at Santaros Fertility Center, the Center of Obstetrics and Gynaecology, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos (VUH SK).

This procedure was usually performed on days 19–25 of the menstrual cycle (approximately 7 days before the beginning of the new menstrual cycle; in the case of irregular menstrual cycles, this was decided individually). During the procedure, the obstetrician gynaecologist inserted a 3 mm diameter endometrial pipette, "The Pipet Curet™" (CooperSurgical, Inc. 95 Corporate Drive Trumbull, CT 06611 USA) and using a special technique (moving the endometrial pipette back and forth in a circular motion while aspirating the endometrial tissue) superficially scratched the endometrium.

The collected endometrial tissue samples were delivered under appropriate conditions to the Department of Molecular Cell Biology, the Institute of Biochemistry, Vilnius University Life Sciences Center (VU LSC), for further evaluation.

1.3. Collection of menstrual blood samples

Women's menstrual blood samples were collected from two groups: women scheduled for IVF/ICSI or thawed embryo transfer cycle for unexplained infertility at Santaros Fertility Center, the Center of Obstetrics and Gynaecology (VUH SK), and women with no sexual and reproductive health problems.

On the second–third bleeding day of the menstrual cycle, the participants collected blood in silicone menstrual cups – DivaCup, which were then handed over to the researcher.

The collected menstrual blood samples were analyzed immediately, and in cases where they were collected in VUH SK, the samples were

delivered under appropriate conditions to the Department of Molecular Cell Biology, the Institute of Biochemistry (VU LSC), for further evaluation.

1.4. Isolation and cultivation of EndMSCs and MenMSCs

Isolation of EndMSCs from endometrial samples collected at the time of endometrial scratching and isolation of MenMSCs from menstrual blood samples were carried out in accordance with the corresponding protocols of Tavakol *et al.* (2018) and Tsolova *et al.* (2022).

Isolated EndMSCs and MenMSCs, respectively, were washed two times with sterile phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and after that seeded into 25/75 cm^2 cell culture plastic flasks ($1.6x10^4$ cells/cm^2) containing Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a 100 U/ml penicillin – 100 µg/ml streptomycin solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the plastic flasks were transferred to a 37 °C thermostat with 5% CO_2. When the first colonies appeared (passage 0), the culture medium was changed and non-adherent cells were removed. Cultivation of the adherent cells was continued in fresh culture medium up to cell density at 90% confluency and, once this was reached, the cells were transferred to the next passage. Subsequent cultivation was continued following the same methodology. Finally, these cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in DMEM/F12 complete medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cell number and viability were assessed at the time of each cell passage by staining with 0.4% trypan blue (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) and observation under a light microscope (counting using a hemocytometer).

The population doubling level (PDL) of EndMSCs and MenMSCs was estimated by monitoring cells proliferation at different passages and calculated according to the appropriate formula (1):

$$PDL(X) = 3{,}32\ (log\left(\frac{Total\ viable\ cells\ at\ harvest}{Total\ viable\ cells\ at\ seed}\right)) + PDL(X-1), \qquad (1)$$

where X – passage number.

1.5. Characterization and differentiation of EndMSCs and MenMSCs

EndMSCs and MenMSCs isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples, respectively, were characterized according to the standartized criteria for defining MSCs approved by ISCT of the year 2006 (Dominici *et al*, 2006).

It was performed analysis of these cell surface markers expression:

1. MSCs markers: CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 and CD166;
2. Hematopoietic stem cells markers: CD34, CD45 and CD117.

After incubation with antibodies, these cells were washed with PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), resuspended and, if flow cytometry was not performed immediately, fixed in 100 µl of PBS with 2% PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The analysis of the expression of cell surface markers was performed using a Partec flow cytometer (Sysmex Corporation, Kobe, Hioko, Japan) with Flowing Software 2 software.

Differentiation of endometrium-derived MSCs was performed according to validated protocols in adipogenic, osteogenic, chondrogenic and decidual directions.

Decidualization was induced using RPMI 1640 (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) with 2% carbon-treated BSA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin and streptomycin solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 mM 8-bromo-cAMP (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) and 1 µM medroxyprogesterone acetate (MPA) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The cells were grown in differentiation medium for up to 3 and 6 days, and the outcome was assessed by changes in cell morphology, as observed by light microscopy "EVOS™" (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and RT-qPCR and ELISA methods.

1.6. Gene expression analysis by RT-qPCR

RNA from endometrium-derived MSCs was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using chloroform and isopropanol according to the manufacturer's instructions.

Female mice uterine horn samples for RT-qPCR analysis were prepared using a commercially available Quick-DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription into complimentary DNA (DNA) was performed using SensiFAST™ cDNA (Bioline, London, UK), LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), or Luna® Universal One-Step the reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR was performed using the SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline Memphis, TN, USA) and the Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) on the Rotor-Gene™ 6000 Real-time Analyzer System (Corbett Life Science, QIAGEN, Hilden, Germany). RT–qPCR was repeated for 40 cycles for all genes and samples.

Gene expression levels by RT-qPCR were standardized to *GAPDH* (in human gene assays) or *18S* (in female mice gene assays) gene expression level. The relative expression of genes was estimated by the comparative ΔΔCt method.

1.7. Total protein isolation and Western blot analysis

Proteins from endometrium-derived MSCs were extracted by using 0.05% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA) solution (Gibco, Life Technologies, NY, USA) on cells. Collected cells (1–1.5 × 10^6 cells for one sample) were then washed 2 times with ice-cold PBS solution (Genaxxon bioscience, Ulm, Germany) and incubated with benzonase (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min. on ice. After this, sodium dodecyl sulfate (SDS) lysis buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol (DTT), 2% SDS, 10% glycerol, and traces of bromphenol blue) was added. The homogenized samples were incubated at 95 °C for 5 min. and centrifugated at 20.000 × g for 15 min., at 4 °C. The ready-to-use samples were immediately subjected to electrophoresis or stored in a freezer at -20 °C.

Proteins were fractionated on 7–15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using Tris-glycine buffer.

Western blot analysis was performed using antibodies against p53, p21, cyclin A2, BCL-2-associated X protein (Bax), CCAAT-enhancer-binding protein beta (CEBPβ), enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2), suppresor of zeste 12 (Suz12), histone deacetylase 1 (HDAC1), HyperAcH4, and H3K27me3. Antibodies against GAPDH (Abcam, Cambridge, UK) were used

as a protein loading control. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies against mouse or rabbit antibodies (DAKO, Glostrup, Denmark) were used.

Target proteins were enhanced using chemiluminescence detection with Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Detection was performed using ChemiDocTM XRS + System with Image LabTM Software (BIORAD, Hercules, CA, USA). Relative density of target proteins was determined with ImageJ software (NIH, MD, USA).

1.8. Protein determination by ELISA

After 6 days of decidualization, cell culture medium from endometrium-derived MSCs was collected and the concentration of proteins prolactin (PRL) and insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP1) was measured using ELISA.

To determine the concentration of PRL, DiaMetra Prolactin ELISA Kit and protocol (DiaMetra S.r.l, Italy) was used. For IGFBP1 concentration determination Mediagnost IGFBP-1 ELISA Kit and protocol was used (Mediagnost, Germany).

96 Cell ELISA microplate with loaded samples was measured using Infinite M200 Pro plate reader with i-control 1.5 software (Tecan, Männedorf, Switzerland). Optical density was detected at 450 and 630 nm wavelengths and a calibration curve was graphed based on the given standards of known concentrations. Then PRL and IGFBP1 concentrations (ng/ml) were calculated.

1.9. *In vivo* study

1.9.1. General information

The *in vivo* research "Possibilities of Using Stem Cells for Endometrial Regeneration" was conducted in the Department of Biological Models of the Institute of Biochemistry, VU LSC (Veterinary Approval No LT 59-13-001, LT 60-13-001, LT 61-13-004), with the permission of the State Food and Veterinary Service (SFVS) of the Republic of Lithuania, No G2-115 (20/05/2019). To enable the use of genetically modified mice for research purposes, Permit No RN-33 of 08/04/2020 of the Ministry of Environment of the Republic of Lithuania was obtained. All experiments and related procedures were carried out in accordance with the guidelines for the welfare

of experimental animals referred to in Directive 2010/63/EU and with the requirements for the handling of experimental animals regulated by Order No B1-866 of the Director of the SFVS dated 31 October 2012.

Female mice of the NOD.CB-17-Prkdc scid/Rj line, aged 6 weeks and weighing 18 g ± 0.5 g, purchased from JANVIE LABS (France), were involved. These female mice were quarantined for 7 days after arrival at VU LSC. Laboratory animals were kept in individual, adapted cages in a controlled environment.

In the *in vivo* study, EndMSCs were isolated from women scheduled for assisted reproductive technology cycles due to couple infertility. Endometrial pathology was induced mechanically or by chemotherapy. The changes in the tissues of the uterine horn and the effectiveness of EndMSCs-based therapy were evaluated based on:

1. The intensity of fibrosis;
2. Other histological changes;
3. The result of spontaneous conception;
4. Analysis of the expression of *Col1a1*, *Col3a1*, *Acta2*, and *CD44* genes related to fibrosis and wound healing.

1.9.2. Grouping of female mice

The uterine horn pathology was mechanically induced in 23 female mice. In anaesthetized mice, the abdominal cavity was surgically opened and the tip of a 21-gauge needle was gently inserted into the junction between the right and left uterine horns, aiming it at the right uterine horn cavity. The right uterine horn was wounded in a "back and forth circular" motion until hyperemia was reached (about 10 times), while maintaining the integrity of the uterine horn. In all cases, it was performed on only one side of the uterine horn.

Chemotherapy was administered to 24 female mice. The anaesthetized female mice received a single intraperitoneal infusion of 120 mg/kg of cyclophosphamide (Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany) and 30 mg/kg of busulfan (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Friedberg, Germany).

After 7 days, female mice from both groups were separated into the following groups:

1. The group of female mice that were euthanized and their uterine horns were submitted for evaluation of evaluation of gene expression and histological changes using hematoxylin and eosin (HE) and Masson Trichrome staining;

2. The group of female mice that were stayed for two weeks with male mice to assess the possibility of spontaneous conception. After the scheduled time, these female mice were euthanized and their fertility was assessed visually by the number of embryo implantation sites in the prepared uterine horns;
3. The group of female mice to evaluate the effect of EndMSCs-based therapy in induced endometrial pathology. 7 days after induction of endometrial pathology, a specially prepared EndMSCs suspension (0.5×10^6 cells/20 μl PBS) was directly injected into the right uterine horn of female mice. After 7 days, this group was further separated:
    3.1. The group of female mice that were euthanized and their uterine horn samples were submitted for evaluation of gene expression and histological changes using HE and Masson Trichrome staining;
    3.2. The group of female mice that were stayed for two weeks with male mice to assess the possibility of spontaneous conception. After the scheduled time, the female mice were euthanized and their fertility was assessed visually by taking into account the number of embryo implantation sites in the prepared uterine horns.

Female mice groups:

1. The control female mice group/the Control group – the group of female mice that did not receive any intervation;
2. The Che female mice group/the Che group – the group of female mice affected by chemotherapy;
3. The Che-EndMSCs female mice group/the Che-EndMSCs group – the group of female mice affected by chemotherapy and received EndMSCs-based therapy;
4. The Mech female mice group/the Mech group – the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected;
5. The Mech-EndMSCs female mice group/the Mech-EndMSCs group – the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected and received EndMSCs-based therapy.

1.10. Assessment of women's psychological well-being

The psychological well-being of women undergoing IVF/ICSI or thawed embryo transfer cycles for unexplained infertility was assessed using the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS).

It is a fourteen-item scale with 7 items each for anxiety and depression subscales. Scoring for each item ranges from 0 (no impairment) to 3 (severe impairment). A subscale score ≥ 8 denotes anxiety or depression.

The Cronbach's αlfa for the anxiety subscale of the HADS was 0.799 and for the depression subscale was 0.694.

1.11. Statistical data analysis

Statistical analysis of the data was performed using GraphPadPrism software (GraphPad Software, USA).

Statistical reliability was assessed using an analysis of variance (ANOVA test), Bonferroni, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and Tukey tests and t-test (Holm-Sidak method). Data were presented as mean ± SD calculated from multiple (usually 3) independent measurments. Statistical significance was marked as follows: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***).

To determine the relationship between the psychological health of women diagnosed with unexplained infertility, the results of assisted reproductive technologies, and gene expression, a correlational analysis – the Spearman rank correlation was used.

2. RESULTS

2.1. Characteristics of endometrium-derived MSCs

The isolation of MSCs from endometrial tissue and menstrual blood samples followed protocols developed by *Tavakol* and colleagues (2018) and *Tsolova* and colleagues (2022). These isolated cells were characterized based on adapted standardized criteria for the identification of MSCs stated by ISCT of the year 2006 (Dominici *et al.*, 2006).

Firstly, the surface markers of cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples were assessed by flow cytometry (Valatkaitė *et al.*, 2021) (Figure 1 A):

1. A positive expression of cell surface markers CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166, which are characteristic of MSCs was detected. ≥ 95% of the cell population was strongly positive for these markers. The positive expression of cell surface markers CD44, CD73, CD90, and CD105 reflects the type of MSCs, whereas the positive expression of cell surface markers CD146 and CD166 is characteristic of stromal cells;
2. A negative expression of cell surface markers CD34, CD45, and CD117, which are characteristic for hematopoietic stem cells were detected. The expression of hematopoietic stem cell specific surface markers was ≤ 1%.

There was no statistically significant difference in the expression of cell surface markers between early (2-7th) and late (15-19th) passages.

Secondly, menstrual blood samples positively assessed the differentiation of isolated cells in osteogenic and chondrogenic directions but had low potential for adipogenic differentiation (Figure 1 B) (Skliutė *et al.*, 2021; Valatkaitė *et al.*, 2021). Thirdly, cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples adhered to plastic (Skliutė *et al.*, 2021; Valatkaitė *et al.*, 2021).

Taken together, the above results suggest that cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples fulfill the standardized criteria for the identification of MSCs as stated by the ISCT of the year 2006 (Dominici *et al.*, 2006).

Examination of EndMSCs showed that the cell doubling-time of early and late passages was very similar and approximately 2.5 ± 0.3 days (Figure 1 C) (Valatkaitė *et al.*, 2021). The cell doubling-time of MenMSCs was

approximately 3 ± 0.2 days and did not differ significantly between early and late passages (Figure 1 C) (Valatkaitė *et al.*, 2021).

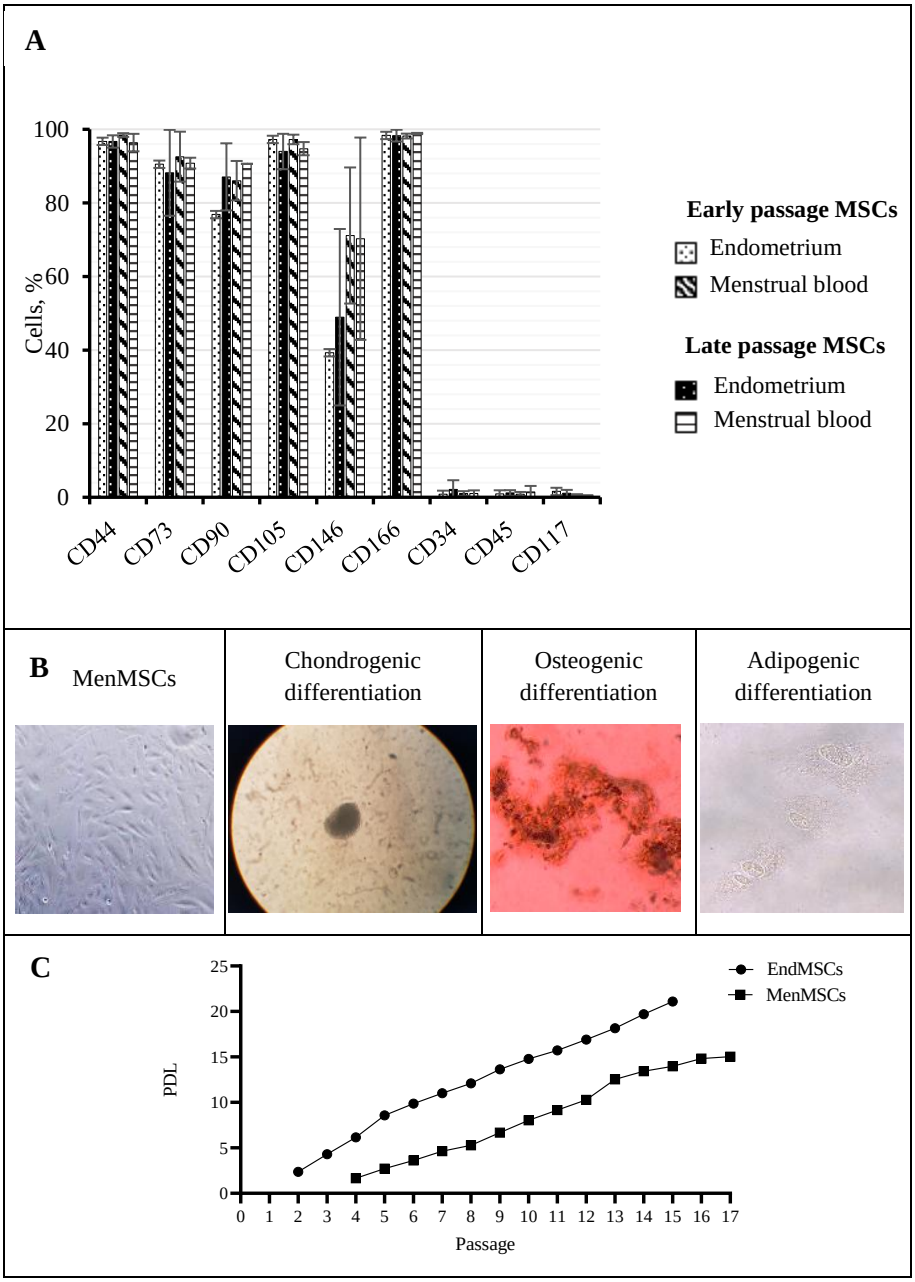


Figure 1. Characterization of endometrium-derived MSCs. **(A)** Analysis of the expression of cell surface markers of cells isolated from endometrial tissue and

menstrual blood samples stated on the International Society for Cellular Therapy (ISCT) approved standardized MSCs identification criteria (Dominici *et al.*, 2006). The expression of MSCs-specific surface markers CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166 and the expression of hematopoietic stem cells specific surface markers CD34, CD45, and CD117 were assessed in early (2-7th) and late (15-19th) passages by flow cytometry method. Results are presented as mean ± SD (*n = 3*). **(B)** Differentiation of MenMSCs in chondrogenic, osteogenic and adipogenic directions. MenMSCs – the control cells. Chondrogenic differentiation was assessed after 32 days of cultivation based on changes in morphology. Osteogenic differentiation was assessed after 21 days of cell culture using Alizarin Red staining. Adipogenic differentiation was assessed after 14 days of cell culture using Oil Red O staining. **(C)** *In vitro* proliferation potential of EndMSCs and MenMSCs. The graph represents the population doubling level (PDL) of growing cells to passage 15th (EndMSCs) and passage 17th (MenMSCs). According to Skliutė, Baušytė *et al.* (2021) and Valatkaitė, Baušytė *et al.*, (2021).

2.2. Assessment of decidual differentiation of endometrium-derived MSCs

2.2.1. Cell morphology

On the 3rd and 6th days of differentiation, endometrium-derived MSCs isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples and induced in the decidual direction changed morphology from spindle-shaped, fibroblast-like cells to oval, epithelial-like cells, compared with undifferentiated EndMSCs and MenMSCs (Valatkaitė *et al.*, 2021).

No statistically significant differences were observed between the different days of assessment, or when comparing different women's groups, i.e. women with planned assisted reproductive technologies due to unexplained infertility and women without sexual and reproductive system disorders.

2.2.2. Analysis of the expression of decidualization-related genes

The expression of decidualization markers – *IGFBP1*, *PRL,* and *WNT4* genes in endometrial tissue and menstrual blood samples of decidual differentiated MSCs was found to be upregulated in all three of these genes when compared to undifferentiated MSCs (Valatkaitė *et al.*, 2021).

When analyzing the differences in the expression of *PRL*, *WNT4,* and *IGFBP1* genes between periods of different decidualization durations (3 days or 6 days), no statistically significant differences were observed.

Results from the expression of genetic markers of decidualization between different sources of endometrium-derived MSCs showed only significantly higher expression of the *IGFBP1* gene after 6 days from the induction of EndMSCs differentiation in the decidual direction compared to the analogous duration of MenMSCs differentiation in the decidual direction.

Analyzing gene expression differences depending on women's sexual and reproductive health was found that the expression of *ESR1*, *FOXO1*, *IGFBP1,* and *PRL* genes was lower in women scheduled for assisted reproductive technologies due to unexplained infertility compared to women without sexual and reproductive system disorders, regardless of the duration of decidual differentiation of MenMSCs (Skliutė *et al.*, 2021). In the group of women with unexplained infertility the expression of *PRL*, *ESR1*, and *FOXO1* genes was significantly higher in on the 6th day of decidualization, compared to the 3rd day.

2.2.3. Evaluation of changes in the concentrations of PRL and IGFBP1 proteins

Changes in the levels of PRL and IGFBP1 proteins important for decidualization, in samples extracted from endometrial tissue and menstrual blood samples were assessed by ELISA.

On the 6th day of decidual differentiation of endometrium-derived MSCs, levels of both proteins were found to be increased compared to undifferentiated MSCs, although a statistically significant difference was observed only in the case of the PRL protein during the early passage of EndMSCs (Valatkaitė *et al.*, 2021).

Also, no statistically significant differences were observed when comparing changes in PRL and IGFB1 protein concentrations between different sources of endometrium-derived MSCs.

2.3. Results of the expression of stemness and self-renewal genes, and angiogenesis-related genes

In both groups of women – without sexual and reproductive health disorders and who were intended to undergo assisted reproduction technologies due to unexplained infertility, the tendency of higher expression of stemness and self-

renewal genes (*KLF4*, *LIN28A*, *NOTCH1*, *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, and *WNT4*) was detected on 3rd and 6th days after the induction of decidual differentiation, as compared to undifferentiated MenMSCs (Skliutė *et al.*, 2021).

Evaluating the influence of decidualization duration, it was found that the expression of the *REX1* gene in the group of women without sexual and reproductive system disorders, and the expression of *KLF4*, *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, and *REX1* genes in the group of women with unexplained infertility was significantly lower after 3 days from the induction, compared to 6 days.

Meanwhile, analyzing the differences in the gene expression depending on women's sexual and reproductive health, it was found that *KLF4* gene expression on day 0 and after 3 and 6 days, *WNT4* gene expression, after 3 and 6 days, *NANOG* gene expression after 3 days, and *NOTCH1* gene expression at day 0 and after 6 days from induction of decidualization was higher and *REX1* gene expression was lower on day 0 and after 3 and 6 days from the induction of decidualization in the group of women without sexual and reproductive health disorders.

It was demonstrated that the expression of angiogenesis-related genes (*HIF1*, *VEGFR2*, and *VEGFR3*) increased during decidualization in both groups of women – without sexual and reproductive health disorders and who were intended to undergo assisted reproduction technologies due to unexplained infertility. Also, significantly higher gene expression after 6 days compared to 3 days was observed for the *VEGFR2* gene in both groups of women and for the *VEGFR3* gene in the group of women with unexplained infertility. Moreover, significantly higher expression of the *HIF1A* gene was observed in the group of women without sexual and reproductive health disorders on day 0 and after 6 days, and of *VEGFR2* and *VEGFR3* genes after 3 days and 6 days from the induction of decidualization, compared to the results of women with unexplained infertility at the corresponding time.

2.4. Analysis of the relative level of proteins involved in cell cycle and epigenetic regulation

A significantly higher relative level of p53 protein was found 6 days after the induction of differentiation in the decidual direction, compared to undifferentiated MenMScs, in the group of women without sexual and reproductive health disorders. A statistically significant increase of p53 protein was observed after 3 days and 6 days after the beginning of decidualization in the group of women with unexplained infertility.

The relative level of p21 protein in the group of women without sexual and reproductive health disorders was statistically significantly higher after 3 days and 6 days after the induction of differentiation in the decidual direction compared to undifferentiated MSCs. In the group of women with unexplained infertility, this difference was found 6 days after the induction of decidualization.

Changes in the relative level of other analyzed proteins involved in cell cycle and epigenetic regulation also reflect the tendency of their influence on the receptivity of the endometrium and the development of fertility disorders.

A summary of the key steps in the molecular regulation of decidualization of endometrium-derived MSCs after considering all the results of doctoral studies and theoretical knowledge is presented in Figure 2.

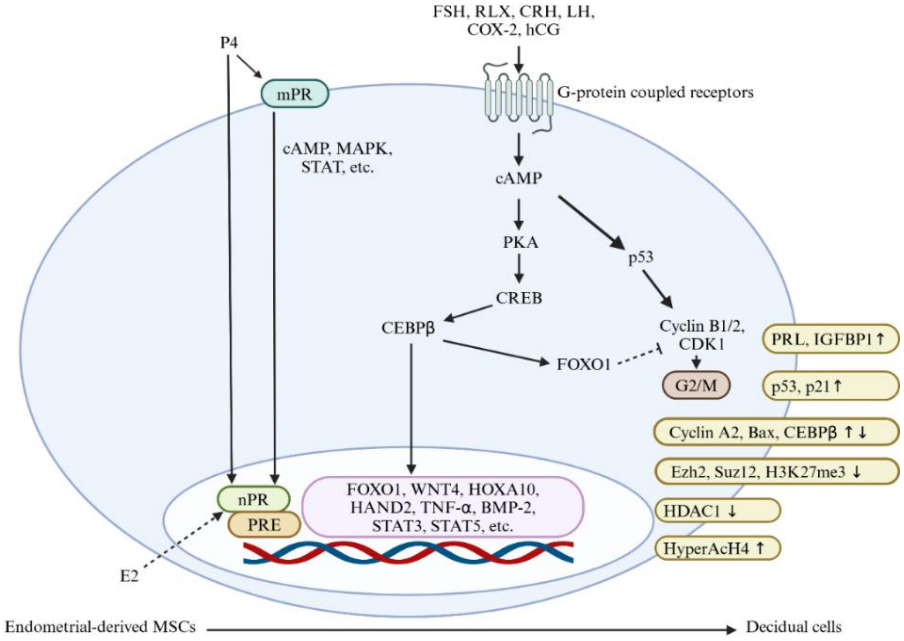


Figure 2. Molecular regulatory mechanism of endometrium-derived MSCs differentiation in the decidual direction. mPR – membrane progesterone receptor, nPR – nuclear progesterone receptor, PRE – progesterone response element. Created with *Biorender.com.*

2.5. *In vivo* study

2.5.1. Histological changes

Assessment of fibrosis intensity in groups of female mice with mechanically induced endometrial pathology showed significant differences in the prevalence of fibrosis between the groups of control, Mech and Mech-EndMSCs female mice in the entire diameter of the uterine horn (Kruskal-Wallis test; $H = 8.38$; $df = 2$; $p = 0.02$), myometrium-endometrium (Kruskal-Wallis test; $H = 7.28$; $df = 2$; $p = 0.03$), and myometrium (Kruskal-Wallis test; $H = 7.53$; $df = 2$; $p = 0.02$) layers (Bausyte *et al.*, 2023).

The intensity of fibrosis across the entire diameter of the uterine horn and in its individual layers – myometrium-endometrium and myometrium – was higher in the group of Mech female mice compared to the Mech-EndMSCs female mice group (Bonferroni test; $p < 0.05$). In contrast, the extent of fibrosis in the endometrium was significantly similar between all study groups (Kruskal-Wallis test; $H = 5.58$; $df = 2$; $p = 0.06$), with the widest area of fibrosis observed in the Mech female mice group and the narrowest in the Mech-EndMSCs female mice group.

Assessment of fibrosis in systemic chemotherapy induced endometrium pathology showed that, although no statistically significant differences were found, the highest fibrosis intensity was observed in the group of Che female mice: 16.9% (± 8.4%) in the entire diameter of the uterine horn, 14.8% (± 11.3%) in the myometrium-endometrium, 21.4% (± 9.8%) in the myometrium and 8.4% (± 8.3%) in the endometrium (Bausyte *et al.*, 2023).

Also, EndMSCs-based therapy had a demonstrably positive effect on the repair of damaged uterine horns, including reducing the intensity of inflammatory cells such as lymphocytes and polymorphonuclear cells (PMNs) and the number of apoptotic bodies (Bausyte *et al.*, 2023).

2.5.2. Evaluation of spontaneous conception

The results of the research showed a lower number of embryo implantation sites in the Mech female mice group (2.6 ± 1.1 units) and the Mech-EndMSCs female mice group (3.8 ± 1.3 units) compared to the control group (5.2 ± 0.8 units) (Bausyte *et. al.*, 2023) (Figure 3). The differences between these groups were statistically significant (Kruskal-Wallis test; $H = 7.72$; $df = 2$; $p = 0.02$).

The number of embryo implantation sites was higher in the Mech-EndMSCs female mice group than in the Mech female mice group.

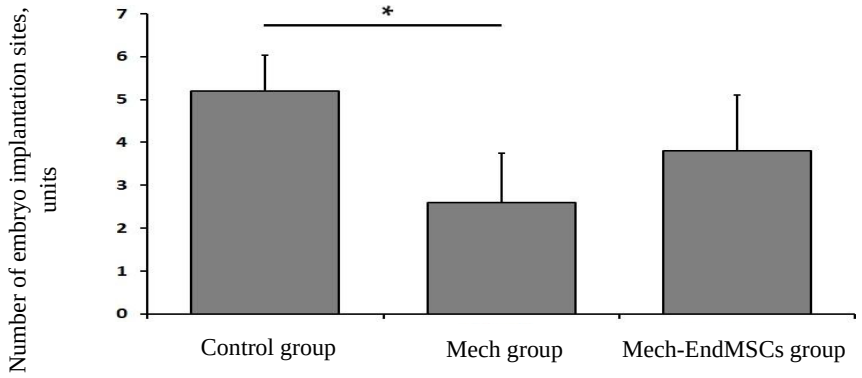


Figure 3. Fertility assessment of the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected, according to the number of embryo implantation sites in the one uterine horn: the Control group – the group of female mice that did not receive any intervation (*n = 5*), the Mech group – the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected (*n = 5*), and the Mech-EndMSCs group – the group of female mice whose uterine horn was mechanically affected and received EndMSCs-based therapy (*n = 5*). Results are presented as mean ± SD. Statistical significance was evaluated using Kruskal-Wallis test and Bonferroni test; *denotes $p \leq 0.05$. Bausyte *et al.*, 2023.

When investigating the spontaneous conception of female mice affected with chemotherapy, the following groups were observed, ranging from the highest number of embryo implantation sites in the uterine horn to the lowest: the control (10.8 ± 0.8 units), the Che-EndMSCs (4.6 ± 0.5 units) and the Che (2.8 ± 0.8 units) female mice group (Bausyte *et al.*, 2023) (Figure 4). Statistical analysis confirmed the differences in these results (Kruskal-Wallis test; $H = 12.89$; $df = 2$; $p = 0.002$; Bonferroni test; $p < 0.001$). It was also found that the number of embryo implantation sites was significantly higher in the control group than in the Che-EndMSCs female mice group and in the Che-EndMSCs female mice group than in the Che female mice group (Bonferroni test; $p < 0.05$).

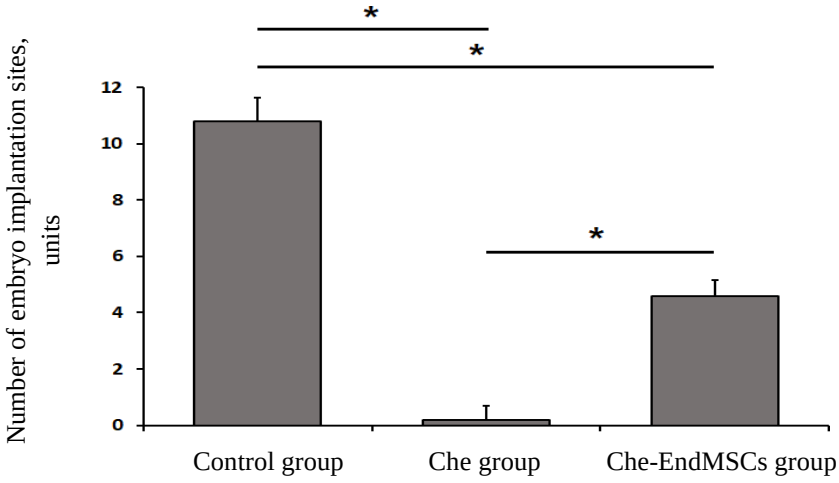


Figure 4. Fertility assessment of the group of female mice affected by chemotherapy, accordingly to the number of embryo implantation sites in both of uterine horns: the Control group – the group of female mice that did not receive any intervation (*n = 5*), the Che group – the group of female mice affected by chemotherapy (*n = 5*), and the Che-EndMSCs group – the group of female mice affected by chemotherapy and received EndMSCs-based therapy (*n = 5*). Results are presented as mean ± SD. Statistical significance was evaluated using Kruskal-Wallis and Bonferroni tests; *denotes $p \leq 0.05$. Bausyte *et al.*, 2023.

Results of *Acta2*, *CD44*, *Col1a1*, and *Col3a1* genes, related to fibrosis and wound healing, expression were reflected in histology changes and outcomes of conception (Bausyte *et al.*, 2023).

2.6. Assessment of correlations between women's psychological well-being, pregnancy rate, and gene expression

32 women were investigated. 12 women expressed considerable symptoms of anxiety and 1 woman showed symptoms of depression. 19 women conceived after the cycle of assisted reproductive technologies due to unexplained infertility.

Based on the scores of the HADS and the outcome after assisted reproductive procedures, women were divided into four groups accordingly: the group of women who conceived and did not present any considerable symptoms of anxiety (*n = 10*), the group of conceived women who had expressed considerable symptoms of anxiety (*n = 9*), the group of non-

conceived women who did not present any considerable symptoms of anxiety (*n = 10*), and the group of non-conceived women who had expressed considerable symptoms of anxiety (*n = 3*).

Analyzing the expression of immune response-related genes, was seen a tendency of lower *TNFSF4* gene expression in the group of non-conceived women compared to conceived women with anxiety. Also, *TNFSF4* gene expression was statistically significant and positively correlated (biologically) with the scores of anxiety expressed by women and the results of conception after treatment cycles.

The results of the expression of cell differentiation-related genes – *PAX8AS1*, *EFNA5*, *IGF2*, and *H19*, showed a tendency for their lower expression in the group of non-conceived women with anxiety compared to the rest of the research population.

The expression of genes related to angiogenesis and hemostasis systems showed the lowest value of the *CYR61* gene in the group of non-conceived women with anxiety. Meanwhile, *TFPI2* gene expression was lower in the group of non-conceived women compared to conceived women, when significantly lower expression of the gene was found in the groups of women without anxiety. Also, *TFP1* gene expression was statistically significant and positively correlated (biologically) with the scores of anxiety expressed by women and the results of conception after treatment cycles.

DISSCUSION

Fertility disorders have become a widespread issue, impacting millions of individuals of reproductive age worldwide. In modern societies, infertility has gained increasing attention within the broader context of declining fertility rates, which contribute to significant social challenges, including an ageing population and its related consequences.

Infertility treatment is one of the fastest-growing medical specialties. Still, it is estimated that 30–40% of all couples remain childless for five years from diagnosis nevertheless treatment. When individuals or couples are unable to conceive after undergoing standard clinical treatments, the use of stem cell therapy is being considered more frequently.

The doctoral studies found the following results:

1. The cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples have ≥ 95% expression of specific surface molecules CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166 of MSCs and ≤ 1% expression of specific surface markers CD34, CD45, and CD117 of hematopoietic stem cells. They are also characterized by a positive expression of CD140b (Skliutė *et al.*, 2021; Bausyte *et al.*, 2023);
2. The cells from endometrial tissue and menstrual blood adhere to plastic surfaces under appropriate conditions;
3. The cells from menstrual blood display chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation capabilities.

The findings are consistent with the MSCs criteria approved by the ISCT in 2006 (Dominici *et al.*, 2006).

Further studies conducted during the doctoral studies also examined the expression of *PRL, PGR, ESR1, IGFBP1,* and *FOXO1* genes, which define decidual differentiation in endometrium-derived MSCs, differences in the expression of *NOTCH1, NANOG, WNT4, KLF4, OCT4, SOX2*, and *LIN28A* genes related to cell stemness and self-renewal properties, and in the expression of *HIF1A, VEGFR2, VEGFR3,* and *HIF1A* genes related to angiogenesis.

In the research, regardless of the source from which endometrium-derived MSCs were isolated and the duration of differentiation of isolated cells (3 days or 6 days), the changes in the expression of *PRL*, *WNT4*, and *IGFBP1* genes and the concentration of IGFBP1 and PRL proteins used to confirm decidualization, showed a tendency of their increasing values. These

results are consistent with international studies (Matsumoto *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2012; Kautz *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2022). Moreover, the obtained data confirm the effectiveness of these protocols used to differentiate endometrium-derived MSCs in the decidual direction, and reveal new significant information. The ability to achieve effective decidualization in twice as short, i.e. 3 days, can be valuable information in the fields of diagnosis and treatment of fertility disorders to optimize processes.

Changes in cell morphology also confirmed the differentiation of endometrium-derived MSCs in the decidual direction.

Moreover, the expression of *PRL, ESR1, IGFBP1,* and *FOXO1* genes was lower in women undergoing assisted reproduction technologies for unexplained infertility, compared to the the group of women without sexual and reproductive health disorders, particularly 3 days after the induction of decidualization and, except for the *ESR1* gene, 6 days after the induction of decidualization. This suggests that discussed genes can have a potential influence on endometrial decidualization, receptivity, and women's reproductive health.

Higher *KLF4* and *WNT4* gene expression tendencies were observed in the group of women without sexual and reproductive health disorders, compared to women undergoing assisted reproduction technologies, corresponding to the international research data. Decreased expression of these genes is associated with pathological changes in endometrial decidualization, leading to disorders of embryo implantation due to damage to endometrial stromal cells proliferation, differentiation and response of hormonal regulation (Franco *et al.*, 2011; Popli *et al.*, 2022).

The *NANOG* and *NOTCH1* genes, associated with cell stemness and self-renewal, were expressed at higher levels in the group of women without sexual and reproductive health disorders throughout the process of decidualization, with a significant increase 3 days after the induction, compared to women's diagnosed with unexplained infertility. This points to better endometrial regeneration and differentiation in the first group.

Higher expression levels of angiogenesis-related genes (*HIF1A, VEGFR2,* and *VEGFR3*) were found in the group of women without sexual and reproductive health disorders, implying that endometrium-derived MSCs play a role in uteroplacental circulation formation and maintenance.

Cycle regulation of cells has many effects on their viability and functionality. Accordingly, it is essential for successful conception and has been evaluated in the doctoral studies. Changes in the relative levels of analyzed proteins involved in the cell cycle and epigenetic regulation show

their importance for the successful and stable process of endometrial decidualization and encourage further research in this area.

An *in vivo* study compared the effect of endometrium-derived MSCs-based therapy for female mice with differently caused (mechanically or with chemotherapy) endometrial pathology.

Taken together, the histological and genetic data obtained in the *in vivo* study and the evaluation of spontaneous conception in female mice suggest that clinical research about endometrium-derived MSCs-based therapy can move further. It was observed that MSCs can decrease fibrosis progression, promote cell regeneration, inhibit inflammation and apoptosis in the endometrium, and create a favorable environment for embryo implantation.

According to the HAD scale, 37.5% of women who underwent assisted reproductive technologies due to unexplained infertility had symptoms of anxiety disorders. Although a larger sample is still needed, the results are in line with international studies showing that the prevalence of anxiety disorders in women with fertility problems ranged from 25% to 36%, suggesting the role of anxiety disorders as a significant psychological health factor in the context of the topic of infertility.

The expression of immune response-related *TNFSF4* gene, cell differentiation-related genes, such as *PAX8AS1*, *EFNA5*, *IGF2*, and *H19*, and genes related to the control of angiogenesis and blood coagulation system activity, such as *CYR61* and *TFPI2*, show a tendency that these genes may be significant in the etiopathogenesis of infertility, while stress management can improve fertility.

Furthermore, the correlation between women's well-being, results of assisted reproductive technologies, and the expression of *TNFSF4* and *TFP12* genes highlight the difference between short-term and long-term effects of stress on fertility, where short-term stress can mobilize the organism.

Overall the results of the different lines of research carried out during the doctoral studies showed, that endometrium-derived MSCs have a high potential for self-renewal, proliferation, and multilineage differentiation, while at the same time maintaining genetic and epigenetic stability during long-term cell cultivation. These characteristics together with the relatively simple, low-cost, and avoiding ethical dilemma collection of MSCs can lead to these cells potentially becoming an effective clinical therapy and part of the advanced biotechnology in the diagnosis and treatment of the complex biopsychosocial problem – infertility. This is particularly important when talking about MenMSCs.

CONCLUSIONS

1. Endometrial tissue and menstrual blood samples collected from women without sexual and reproductive health disorders and/or women diagnosed with unexplained infertility (based on women's medical history, objective examination, instrumental and laboratory tests) are a suitable source for the isolation of endometrium-derived MSCs and further investigations.
2. The cells isolated from endometrial tissue and menstrual blood samples confirm the standard criteria for the definition of MSCs, as stated by ISCT in 2006. Isolated cells were ≥ 95% positive for cell surface markers of MSCs (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, and CD166) and ≤ 1% negative for cell surface markers of hematopoietic stem cells (CD34, CD45, and CD117), showed chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation, and adhered to the plastic under the relevant conditions.
3. EndMSCs and MSCs are characterized by similarly high proliferation and potency of decidualization. The cell doubling-time of EndMSCs in early and late passages was 2.5 ± 0.3 days, and the cell doubling-time of MenMSCs in early and late passages was 3 ± 0.2 days, without a statistically significant difference. Endometrium-derived MSCs successfully differentiated in the decidual direction after 3 and 6 days after induction with a combination of 8-bromo-cAMP and MPA.
4. Changes in the gene expression, epigenetic modification, and protein level occurring during decidualization of endometrium-derived MSCs are related to endometrial decidualization, receptivity, and the development of fertility disorders. Higher expression of decidualization-related genes (*PRL, ESR1, IGFBP1,* and *FOXO1*), genes related to cell stemness and self-renewal (*KLF4, WNT4, NANOG,* and *NOTCH1*), and angiogenesis-related (*HIF1A, VEGFR2,* and *VEGFR3*), and lower expression of the pluripotency marker – the *REX1* gene was found in the group of women without sexual and reproductive health disorders. Histone post-translational modification studies revealed a significant increase in H3K27me3 protein expression after 3 days from the induction of decidualization in a group of women with unexplained infertility. The expression of epigenetic regulatory markers Ezh2 and Suz12 was significantly lower in women without sexual and reproductive health disorders

throughout decidualization of endometrium-derived MSCs. Still, no statistically significant changes were observed in the group of women with unexplained infertility. In both groups of women, the relative level of p53, and p21 proteins important for cell cycle regulation increased during decidualization of endometrium-derived MSCs. Still, they remained stably lower in the group of women with unexplained infertility.

5. Results from *in vivo* models with endometrium pathology showed that endometrium-derived MSCs-based therapy induces a more favorable microenvironment for blastocyst implantation by increasing endometrium regeneration, inhibiting the intensity of fibrosis and reducing the infiltration of inflammatory cells and apoptotic bodies. A higher number of embryo implantation sites was in the Mech-EndMSCs female mice group (3.8 ± 1.3 units) compared to the Mech female mice group (2.6 ± 1.1 units). Also, statistical analysis confirmed a significantly higher number of embryo implantation sites in the Che-EndMSCs female mice group (4.6 ± 0.5 units) compared to the Che female mice group (2.8 ± 0.8 units) ($p < 0.001$).
6. Anxiety can influence fertility disorders and results of assisted reproductive technologies at the level of gene expression changes. It was found that in the group of women who expressed anxiety and did not conceive, the expression of immune response-related *TNFSF4* gene, cell differentiation-related genes (*PAX8AS1*, *EFNA5*, *IGF2*, and *H19*), and genes related to the control of angiogenesis and blood coagulation system activity (*CYR61* and *TFPI2*), was lower compared to women who did not express anxiety and conceived.

RECOMMENDATIONS

1. To determine selective markers for unambiguously identifying of endometrium-derived MSCs collected from endometrial tissue and menstrual blood samples.
2. To continue the research examining the possibilities of epigenetic modification during decidualization of endometrium-derived MSCs.
3. To conduct *in vivo* and clinical studies to determine the optimal methodology for endometrium-derived MSCs-based therapy in infertility caused by endometrial pathology.
4. To create guidelines and recommendations based on theoretical knowledge and practical evidence regarding using endometrium-derived MSCs in fertility disorders caused by endometrial pathology or related to it.
5. To continue the research on the influence of psychological health for fertility disorders and the results of infertility treatment, using more sensitive mental health assessment instruments, differentiating the importance of situational and personal characteristics, and conducting longitudinal studies.
6. To develop studies of endometrium-derived MSCs collected from endometrial tissue and menstrual blood samples, in the areas of assessment of women's health status, and the case of disorders and diseases, their correction.

CURRICULUM VITAE

Personal details

- Name, surname: Raminta Baušytė.
- Tel. no. +370 620 86826.
- Email: raminta.bausyte@gmc.vu.lt, raminta.bausyte@santa.lt, raminta.bausyte@gmail.com.

Education

- 10/2018 – 09/2024. *Doctoral studies.* The Department of Molecular Cell Biology, the Institute of Biochemistry, VU LSC. Vilnius, Lithuania.
- 09/2013 – 06/2017. *Qualification of an obstetrician gynaecologist.* The Department of Obstetrics and Gynaecology, the Faculty of Medicine, VU. Vilnius, Lithuania.
- 09/2007 – 06/2013. Master‘s degree in medicine and medical qualification. The Faculty of Medicine, VU. Vilnius, Lithuania.

Certificates

- Assisted reproductive technologies and cryobank, in 2017.
- Laboratory animal science, in 2021.

Scientific experience

- 10/2020 – 06/2022. *Junior Research Fellow in projects:*
  - “Advanced Technologies for Innovative Infertility Treatment” (No. 01.2.2-MITA-K-702-12-0004, 2021-2023). The Department of Molecular Cell Biology, the Institute of Biochemistry, VU LSC. Vilnius, Lithuania;
  - “Evaluation of Mesenchymal Stem Cell Exosomes for the Treatment of Drug-resistant Depression” (No. MSF-LMT-3/2020/). The Department of Molecular Cell Biology, the Institute of Biochemistry, VU LSC. Vilnius, Lithuania.

Work experience

- 08/2017 – now. *Obstetrician gynaecologist.* Santaros Fertility Center, the Center of Obstetrics and Gynaecology, VUH SK. Vilnius, Lithuania.

Academic activity

- 09/2024 – now. *Lecturer*. The Department of Obstetrics and Gynaecology, the Faculty of Medicine, VU. Vilnius, Lithuania.
- 01/2021 – now. *Lecturer*. The Faculty of Philosophy, VU. Vilnius, Lithuania.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. AAGL Practice Report: Practice Guidelines on Intrauterine Adhesions Developed in Collaboration With the European Society of Gynaecological Endoscopy (ESGE). (2017). *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, *24*(5), 695–705. https://doi.org/10.1016/j.jmig.2016.11.008
2. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., AlTalabani, A. A., & Knawy, B. A. (2013). Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi of Human Term Placenta. *Stem Cell Reviews and Reports*, *9*(1), 16–31. https://doi.org/10.1007/s12015-012-9385-4
3. Abuwala, N., & Tal, R. (2021). Endometrial stem cells: Origin, biological function, and therapeutic applications for reproductive disorders. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *33*(3), 232–240. https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000702
4. Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, *12*(6), 731–746. https://doi.org/10.1093/humupd/dml004
5. Aghajanova, L., Hamilton, A., Kwintkiewicz, J., Vo, K. C., & Giudice, L. C. (2009). Steroidogenic Enzyme and Key Decidualization Marker Dysregulation in Endometrial Stromal Cells from Women with Versus Without Endometriosis1. *Biology of Reproduction*, *80*(1), 105–114. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070300
6. Bagade, T., Thapaliya, K., Breuer, E., Kamath, R., Li, Z., Sullivan, E., & Majeed, T. (2022). Investigating the association between infertility and psychological distress using Australian Longitudinal Study on Women's Health (ALSWH). *Scientific Reports*, *12*(1), 10808. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15064-2
7. Bai, X., Liu, J., Cao, S., & Wang, L. (2019). Mechanisms of endometrial fibrosis and the potential application of stem cell therapy. *Discovery Medicine*, *27*(150), 267–279
8. Bashiri, A., Heo, H. J., Ben-Avraham, D., Mazor, M., Budagov, T., Einstein, F. H., & Atzmon, G. (2014). Pregnancy complicated by obesity induces global transcript expression alterations in visceral and subcutaneous fat. *Molecular Genetics and Genomics*, *289*(4), 695–705. https://doi.org/10.1007/s00438-014-0841-5

9. Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, *9*(1), 21. https://doi.org/10.3390/biology9010021
10. Bausyte, R., Vaigauskaite - Mazeikiene, B., Borutinskaite, V., Valatkaite, E., Besusparis, J., Valkiuniene, R. B., Kazenaite, E., Ramasauskaite, D., & Navakauskiene, R. (2023). Human endometrialved mesenchymal stem/stromal cells application in endometrial-factor induced infertility. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1227487. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1227487
11. Bert, S., Ward, E. J., & Nadkarni, S. (2021). Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. *Immunology*, *164*(4), 665–676. https://doi.org/10.1111/imm.13392
12. Bjelland, I., Dahl, A. A., Haug, T. T., & Neckelmann, D. (2002). The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale. *Journal of Psychosomatic Research*, *52*(2), 69–77. https://doi.org/10.1016/S0022-3999(01)00296-3
13. Boonyaratanakornkit, V., Scott, M. P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S. M., Maller, J. L., Miller, W. T., & Edwards, D. P. (2001). Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif that Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases. *Molecular Cell*, *8*(2), 269–280. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00304-5
14. Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, *441*(7091), 349–353. https://doi.org/10.1038/nature04733
15. Bozorgmehr, M., Gurung, S., Darzi, S., Nikoo, S., Kazemnejad, S., Zarnani, A.-H., & Gargett, C. E. (2020). Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 497. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00497
16. Bu, Z., Hu, L., Su, Y., Guo, Y., Zhai, J., & Sun, Y.-P. (2020). Factors related to early spontaneous miscarriage during IVF/ICSI treatment: An analysis of 21,485 clinical pregnancies. *Reproductive BioMedicine Online*, *40*(2), 201–206. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.11.001

17. Buensuceso, A. V., Son, A. I., Zhou, R., Paquet, M., Withers, B. M., & Deroo, B. J. (2016). Ephrin-A5 Is Required for Optimal Fertility and a Complete Ovulatory Response to Gonadotropins in the Female Mouse. *Endocrinology*, *157*(2), 942–955. https://doi.org/10.1210/en.2015-1216
18. Bui, A. H., Timmons, D. B., & Young, S. L. (2022). Evaluation of endometrial receptivity and implantation failure. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *34*(3), 107–113. https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000783
19. Bui, B. N., Torrance, H. L., Janssen, C., Cohlen, B., De Bruin, J. P., Den Hartog, J. E., Van Der Linden, P. J. Q., Deurloo, K. L., Maas, J. W. M., Van Oppenraaij, R., Cantineau, A., Lambalk, C. B., Visser, H., Brinkhuis, E., Van Disseldorp, J., Schoot, B. C., Lardenoije, C., Van Wely, M., Eijkemans, M. J. C., & Broekmans, F. J. M. (2018). Does endometrial scratching increase the rate of spontaneous conception in couples with unexplained infertility and a good prognosis (Hunault > 30%)? Study protocol of the SCRaTCH-OFO trial: a randomized controlled trial. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *18*(1), 511. https://doi.org/10.1186/s12884-018-2160-z
20. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to Sustain G $_2$ Arrest After DNA Damage. *Science*, *282*(5393), 1497–1501. https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1497
21. Buser, A. C., Gass-Handel, E. K., Wyszomierski, S. L., Doppler, W., Leonhardt, S. A., Schaack, J., Rosen, J. M., Watkin, H., Anderson, S. M., & Edwards, D. P. (2007). Progesterone Receptor Repression of Prolactin/Signal Transducer and Activator of Transcription 5-Mediated Transcription of the β-Casein Gene in Mammary Epithelial Cells. *Molecular Endocrinology*, *21*(1), 106–125. https://doi.org/10.1210/me.2006-0297
22. Cai, H., Li, H., & He, Y. (2016). Interceed and Estrogen Reduce Uterine Adhesions and Fibrosis and Improve Endometrial Receptivity in a Rabbit Model of Intrauterine Adhesions. *Reproductive Sciences*, *23*(9), 1208–1216. https://doi.org/10.1177/1933719116632923
23. Campitiello, M. R., De Franciscis, P., Mele, D., Izzo, G., Sinisi, A., Delrio, G., & Colacurci, N. (2011). Endometrial LGR7 expression during menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, *95*(8), 2511–2514. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.124
24. Cao, Y., Sun, H., Zhu, H., Zhu, X., Tang, X., Yan, G., Wang, J., Bai, D., Wang, J., Wang, L., Zhou, Q., Wang, H., Dai, C., Ding, L., Xu, B., Zhou, Y., Hao, J., Dai, J., & Hu, Y. (2018). Allogeneic cell therapy using

umbilical cord MSCs on collagen scaffolds for patients with recurrent uterine adhesion: A phase I clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 192. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0904-3

25. Casper, R. F. (2020). Frozen embryo transfer: Evidence-based markers for successful endometrial preparation. *Fertility and Sterility*, *113*(2), 248–251. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.008
26. Chan, R. W. S., Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2004). Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells1. *Biology of Reproduction*, *70*(6), 1738–1750. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109
27. Chen, L., Qu, J., & Xiang, C. (2019). The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 1. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1105-9
28. Chen, L., Xiang, B., Wang, X., & Xiang, C. (2017). Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 9. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0453-6
29. Chen, X., Mariee, N., Jiang, L., Liu, Y., Wang, C. C., Li, T. C., & Laird, S. (2017). Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: Establishment of a reference range. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *217*(6), 680.e1-680.e6. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.09.010
30. Chiacchiera, F., Morey, L., & Mozzetta, C. (2020). Editorial: Epigenetic Regulation of Stem Cell Plasticity in Tissue Regeneration and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 82. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00082
31. Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Awosika, A. O., & Ayers, D. (2024). Physiology, Stress Reaction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541120/
32. Cordeiro, M. R., Carvalhos, C. A., & Figueiredo-Dias, M. (2022). The Emerging Role of Menstrual-Blood-Derived Stem Cells in Endometriosis. *Biomedicines*, *11*(1), 39. https://doi.org/10.3390/biomedicines11010039
33. Craciunas, L., Gallos, I., Chu, J., Bourne, T., Quenby, S., Brosens, J. J., & Coomarasamy, A. (2019). Conventional and modern markers of endometrial receptivity: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *25*(2), 202–223. https://doi.org/10.1093/humupd/dmy044
34. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N.,

Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Bűhring, H.-J., Giacobino, J.-P., Lazzari, L., … Péault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 301–313. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003

35. Csabai, T., Pallinger, E., Kovacs, A. F., Miko, E., Bognar, Z., & Szekeres-Bartho, J. (2020). Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. *Frontiers in Immunology*, *11*, 349. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00349
36. Cui, C.-H., Uyama, T., Miyado, K., Terai, M., Kyo, S., Kiyono, T., & Umezawa, A. (2007). Menstrual Blood-derived Cells Confer Human Dystrophin Expression in the Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy via Cell Fusion and Myogenic Transdifferentiation. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(5), 1586–1594. https://doi.org/10.1091/mbc.e06-09-0872
37. d'Hauterive, S. P., Close, R., Gridelet, V., Mawet, M., Nisolle, M., & Geenen, V. (2022). Human Chorionic Gonadotropin and Early Embryogenesis: Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1380. https://doi.org/10.3390/ijms23031380
38. Davidoff, M. S. (2019). The Pluripotent Microvascular Pericytes Are the Adult Stem Cells Even in the Testis. In A. Birbrair (Ed.), *Pericyte Biology in Different Organs* (Vol. 1122, pp. 235–267). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11093-2_13
39. Deans, R., & Abbott, J. (2010). Review of Intrauterine Adhesions. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, *17*(5), 555–569. https://doi.org/10.1016/j.jmig.2010.04.016
40. Deshpande, P., & Gupta, A. (2019). Causes and prevalence of factors causing infertility in a public health facility. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *12*(4), 287. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_140_18
41. Dhabhar, F. S. (2009). A hassle a day may keep the pathogens away: The fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology*, *49*(3), 215–236. https://doi.org/10.1093/icb/icp045
42. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905

43. Du, L., Lv, R., Yang, X., Cheng, S., Xu, J., & Ma, T. (2016). Hypoxia enhances the protective effects of placenta-derived mesenchymal stem cells against scar formation through hypoxia-inducible factor-1α. *Biotechnology Letters*, *38*(6), 931–939. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2067-6
44. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, *75*(4), 817–825. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90500-P
45. Estella, C., Herrer, I., Atkinson, S. P., Quiñonero, A., Martínez, S., Pellicer, A., & Simón, C. (2012). Inhibition of Histone Deacetylase Activity in Human Endometrial Stromal Cells Promotes Extracellular Matrix Remodelling and Limits Embryo Invasion. *PLoS ONE*, *7*(1), e30508. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030508
46. Evans, J., Salamonsen, L. A., Winship, A., Menkhorst, E., Nie, G., Gargett, C. E., & Dimitriadis, E. (2016). Fertile ground: Human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(11), 654–667. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.116
47. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, *5*(7), 551–562. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400404
48. Farahzadi, R., Valipour, B., Montazersaheb, S., & Fathi, E. (2023). Targeting the stem cell niche micro-environment as therapeutic strategies in aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1162136. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1162136
49. Fernandes, M. S., Pierron, V., Michalovich, D., Astle, S., Thornton, S., Peltoketo, H., Lam, E. W.-F., Gellersen, B., Huhtaniemi, I., Allen, J., & Brosens, J. J. (2005). Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *Journal of Endocrinology*, *187*(1), 89–101. https://doi.org/10.1677/joe.1.06242
50. Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, *36*(28), 3943–3956. https://doi.org/10.1038/onc.2016.502
51. Franco, H. L., Dai, D., Lee, K. Y., Rubel, C. A., Roop, D., Boerboom, D., Jeong, J., Lydon, J. P., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K., & DeMayo, F. J. (2011). WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation

and decidualization in the mouse. *The FASEB Journal*, *25*(4), 1176–1187. https://doi.org/10.1096/fj.10-175349

52. Gan, L., Duan, H., Xu, Q., Tang, Y.-Q., Li, J.-J., Sun, F.-Q., & Wang, S. (2017). Human amniotic mesenchymal stromal cell transplantation improves endometrial regeneration in rodent models of intrauterine adhesions. *Cytotherapy*, *19*(5), 603–616. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.003
53. Gao, L., Huang, Z., Lin, H., Tian, Y., Li, P., & Lin, S. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Restore Functional Endometrium in the Rat Model for Severe Asherman Syndrome. *Reproductive Sciences*, *26*(3), 436–444. https://doi.org/10.1177/1933719118799201
54. Gargett, C. E., Nguyen, H. P. T., & Ye, L. (2012). Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *13*(4), 235–251. https://doi.org/10.1007/s11154-012-9221-9
55. Geiser, F., Meier, C., Wegener, I., Imbierowicz, K., Conrad, R., Liedtke, R., Oldenburg, J., & Harbrecht, U. (2008). Association between Anxiety and Factors of Coagulation and Fibrinolysis. *Psychotherapy and Psychosomatics*, *77*(6), 377–383. https://doi.org/10.1159/000151518
56. Gellersen, B., & Brosens, J. (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *Journal of Endocrinology*, *178*(3), 357–372. https://doi.org/10.1677/joe.0.1780357
57. Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews*, *35*(6), 851–905. https://doi.org/10.1210/er.2014-1045
58. Giri, S. K., Nayak, B. L., & Mohapatra, J. (2021). Thickened Endometrium: When to Intervene? A Clinical Conundrum. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, *71*(3), 216–225. https://doi.org/10.1007/s13224-020-01415-4
59. Grimaldi, G., Christian, M., Steel, J. H., Henriet, P., Poutanen, M., & Brosens, J. J. (2011). Down-Regulation of the Histone Methyltransferase EZH2 Contributes to the Epigenetic Programming of Decidualizing Human Endometrial Stromal Cells. *Molecular Endocrinology*, *25*(11), 1892–1903. https://doi.org/10.1210/me.2011-1139
60. Guo, Z., Xu, X., Zhang, L., Zhang, L., Yan, L., & Ma, J. (2020). Endometrial thickness is associated with incidence of small-for-gestational-age infants in fresh in vitro fertilization–intracytoplasmic

sperm injection and embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, *113*(4), 745–752. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.014

61. Han, Y., Yang, J., Fang, J., Zhou, Y., Candi, E., Wang, J., Hua, D., Shao, C., & Shi, Y. (2022). The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 92. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0
62. Hanna, R., Pang, Y., Thomas, P., & Zhu, Y. (2006). Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors α and β in transfected cells. *Journal of Endocrinology*, *190*(2), 247–260. https://doi.org/10.1677/joe.1.06694
63. Harris, L. K., Crocker, I. P., Baker, P. N., Aplin, J. D., & Westwood, M. (2011). IGF2 Actions on Trophoblast in Human Placenta Are Regulated by the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor, Which Can Function as Both a Signaling and Clearance Receptor1. *Biology of Reproduction*, *84*(3), 440–446. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088195
64. Hasanpoor-Azghdy, S. B., Simbar, M., & Vedadhir, A. (2014). The emotional-psychological consequences of infertility among infertile women seeking treatment: Results of a qualitative study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *12*(2), 131–138
65. He, Q., Au, B., Kulkarni, M., Shen, Y., Lim, Kah. J., Maimaiti, J., Wong, Cheng. Kit., Luijten, Monique. N. H., Chong, H. C., Lim, E. H., Rancati, G., Sinha, I., Fu, Z., Wang, X., Connolly, John. E., & Crasta, K. C. (2018). Chromosomal instability-induced senescence potentiates cell non-autonomous tumourigenic effects. *Oncogenesis*, *7*(8), 62. https://doi.org/10.1038/s41389-018-0072-4
66. Heremans, R., Jan, Z., Timmerman, D., & Vankelecom, H. (2021). Organoids of the Female Reproductive Tract: Innovative Tools to Study Desired to Unwelcome Processes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 661472. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661472
67. Higienos institutas. (2016). https://stat.hi.lt/user-report-view.aspx?group_id=16
68. Hosoya, S., Yokomizo, R., Kishigami, H., Fujiki, Y., Kaneko, E., Amita, M., Saito, T., Kishi, H., Sago, H., Okamoto, A., & Umezawa, A. (2023). Novel therapeutic strategies for injured endometrium: Intrauterine transplantation of menstrual blood-derived cells from infertile patients. *Stem Cell Research & Therapy*, *14*(1), 297. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03524-z

69. Hu, J., Song, K., Zhang, J., Zhang, Y., & Tan, B.-Z. (2019). Effects of menstrual blood-derived stem cells on endometrial injury repair. *Molecular Medicine Reports*, *19*(2), 813–820. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9744
70. Hua, Q., Zhang, Y., Li, H., Li, H., Jin, R., Li, L., Xiang, Y., Tian, M., Wang, J., Sun, L., & Wang, Y. (2022). Human umbilical cord blood-derived MSCs trans-differentiate into endometrial cells and regulate Th17/Treg balance through NF-κB signaling in rabbit intrauterine adhesions endometrium. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 301. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02990-1
71. Huang, B., Li, G., & Jiang, X. H. (2015). Fate determination in mesenchymal stem cells: A perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0018-0
72. Jimenez-Puerta, G., Marchal, J., López-Ruiz, E., & Gálvez-Martín, P. (2020). Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(2), 445. https://doi.org/10.3390/jcm9020445
73. Jing, S., Li, X., Zhang, S., Gong, F., Lu, G., & Lin, G. (2019). The risk of placenta previa and cesarean section associated with a thin endometrial thickness: A retrospective study of 5251 singleton births during frozen embryo transfer in China. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *300*(5), 1227–1237. https://doi.org/10.1007/s00404-019-05295-6
74. Kajihara, T., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2013). The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Medical Molecular Morphology*, *46*(2), 61–68. https://doi.org/10.1007/s00795-013-0018-z
75. Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randeva, H. S., & Thomas, P. (2006). Progesterone Signaling in Human Myometrium through Two Novel Membrane G Protein-Coupled Receptors: Potential Role in Functional Progesterone Withdrawal at Term. *Molecular Endocrinology*, *20*(7), 1519–1534. https://doi.org/10.1210/me.2005-0243
76. Kasius, A., Smit, J. G., Torrance, H. L., Eijkemans, M. J. C., Mol, B. W., Opmeer, B. C., & Broekmans, F. J. M. (2014). Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: A systematic review and meta-

analysis. *Human Reproduction Update*, *20*(4), 530–541. https://doi.org/10.1093/humupd/dmu011

77. Katoh, N., Kuroda, K., Tomikawa, J., Ogata-Kawata, H., Ozaki, R., Ochiai, A., Kitade, M., Takeda, S., Nakabayashi, K., & Hata, K. (2018). Reciprocal changes of H3K27ac and H3K27me3 at the promoter regions of the critical genes for endometrial decidualization. *Epigenomics*, *10*(9), 1243–1257. https://doi.org/10.2217/epi-2018-0006
78. Kautz, E., De Carvalho Papa, P., Reichler, I. M., Gram, A., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2015). In vitro decidualisation of canine uterine stromal cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0066-4
79. Kaya Okur, H. S., Das, A., Taylor, R. N., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2016). Roles of Estrogen Receptor-α and the Coactivator MED1 During Human Endometrial Decidualization. *Molecular Endocrinology*, *30*(3), 302–313. https://doi.org/10.1210/me.2015-1274
80. Kiani, Z., Simbar, M., Hajian, S., & Zayeri, F. (2021). The prevalence of depression symptoms among infertile women: A systematic review and meta-analysis. *Fertility Research and Practice*, *7*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s40738-021-00098-3
81. Kilic, S., Yuksel, B., Pinarli, F., Albayrak, A., Boztok, B., & Delibasi, T. (2014). Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(8), 975–982. https://doi.org/10.1007/s10815-014-0268-2
82. Klimas, V., Drejerienė, E., Gricius, R., Amšiejienė, A., Žiobakas, R., Baušytė, R., Sabaitytė, E. (2019). Nevaisingumo diagnostikos ir gydymo metodika
83. Kobayashi, H., Matsubara, S., & Imanaka, S. (2023). The role of tissue factor pathway inhibitor 2 in the coagulation and fibrinolysis system. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *49*(7), 1677–1683. https://doi.org/10.1111/jog.15660
84. Kong, Y., Shao, Y., Ren, C., & Yang, G. (2021). Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 474. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02526-z
85. Kuon, R., Weber, M., Heger, J., Santillán, I., Vomstein, K., Bär, C., Strowitzki, T., Markert, U. R., & Toth, B. (2017). Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, *78*(4), e12721. https://doi.org/10.1111/aji.12721

86. Lee, Y. J., & Yi, K. W. (2018). Bone marrow-derived stem cells contribute to regeneration of the endometrium. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, *45*(4), 149–153. https://doi.org/10.5653/cerm.2018.45.4.149
87. Lensen, S. F., Armstrong, S., Gibreel, A., Nastri, C. O., Raine-Fenning, N., & Martins, W. P. (2021). Endometrial injury in women undergoing in vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2021*(6). https://doi.org/10.1002/14651858.CD009517.pub4
88. Lessey, B. A. (2011). Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, *96*(3), 522–529. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.1095
89. Lessey, B. A., & Young, S. L. (2019). What exactly is endometrial receptivity? *Fertility and Sterility*, *111*(4), 611–617. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.009
90. Li, B., Zhang, Q., Sun, J., & Lai, D. (2019). Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 257. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1368-9
91. Li, Q., Kannan, A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Cooke, P. S., Yamagishi, H., Srivastava, D., Bagchi, M. K., & Bagchi, I. C. (2011). The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6019), 912–916. https://doi.org/10.1126/science.1197454
92. Li, Z., Yan, G., Diao, Q., Yu, F., Li, X., Sheng, X., Liu, Y., Dai, Y., Zhou, H., Zhen, X., Hu, Y., Péault, B., Ding, L., Sun, H., & Li, H. (2019). Transplantation of human endometrial perivascular cells with elevated CYR61 expression induces angiogenesis and promotes repair of a full-thickness uterine injury in rat. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 179. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1272-3
93. Li, T., Chan, R.W., Li, R.H. *et al.* (2024). Endometrial mesenchymal stromal/stem cells improve regeneration of injured endometrium in mice. *Biol Res 57*, 6. https://doi.org/10.1186/s40659-024-00484-3
94. Lim, H., Ma, L., Ma, W., Maas, R. L., & Dey, S. K. (1999). *Hoxa-10* Regulates Uterine Stromal Cell Responsiveness to Progesterone during Implantation and Decidualization in the Mouse. *Molecular Endocrinology*, *13*(6), 1005–1017. https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0284
95. Lin, X., Zhang, Y., Pan, Y., He, S., Dai, Y., Zhu, B., Wei, C., Xin, L., Xu, W., Xiang, C., & Zhang, S. (2018). Endometrial stem cell-derived granulocyte-colony stimulating factor attenuates endometrial fibrosis

via sonic hedgehog transcriptional activator Gli2†. *Biology of Reproduction*, *98*(4), 480–490. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy005

96. Lin, Y., Dong, S., Ye, X., Liu, J., Li, J., Zhang, Y., Tu, M., Wang, S., Ying, Y., Chen, R., Wang, F., Ni, F., Chen, J., Du, B., & Zhang, D. (2022). Synergistic regenerative therapy of thin endometrium by human placenta-derived mesenchymal stem cells encapsulated within hyaluronic acid hydrogels. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 66. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02717-2
97. Litzky, J. F., & Marsit, C. J. (2019). Epigenetically regulated imprinted gene expression associated with IVF and infertility: Possible influence of prenatal stress and depression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(7), 1299–1313. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01483-0
98. Liu, H., Huang, X., Mor, G., & Liao, A. (2020). Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *77*(11), 2091–2101. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03395-9
99. Liu, H., Muhammad, T., Guo, Y., Li, M., Sha, Q., Zhang, C., Liu, H., Zhao, S., Zhao, H., Zhang, H., Du, Y., Sun, K., Liu, K., Lu, G., Guo, X., Sha, J., Fan, H., Gao, F., & Chen, Z. (2019). RNA-Binding Protein IGF2BP2/IMP2 is a Critical Maternal Activator in Early Zygotic Genome Activation. *Advanced Science*, *6*(15), 1900295. https://doi.org/10.1002/advs.201900295
100. Liu, H., Zhang, J., Wang, B., & Kuang, Y. (2020). Effect of endometrial thickness on ectopic pregnancy in frozen embryo transfer cycles: An analysis including 17,244 pregnancy cycles. *Fertility and Sterility*, *113*(1), 131–139. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.003
101. Logan, P. C., Ponnampalam, A. P., Steiner, M., & Mitchell, M. D. (2013). Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, *19*(5), 302–312. https://doi.org/10.1093/molehr/gas062
102. Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, *2019*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2019/9628536
103. Lv, H., Hu, Y., Cui, Z., & Jia, H. (2018). Human menstrual blood: A renewable and sustainable source of stem cells for regenerative

medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 325. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1067-y

104. Ma, H., Liu, M., Li, Y., Wang, W., Yang, K., Lu, L., He, M., Deng, T., Li, M., & Wu, D. (2020). Intrauterine transplantation of autologous menstrual blood stem cells increases endometrial thickness and pregnancy potential in patients with refractory intrauterine adhesion. *The journal of obstetrics and gynaecology research*, *46*(11), 2347–2355. https://doi.org/10.1111/jog.14449
105. Maderna, P., & Godson, C. (2003). Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1639*(3), 141–151. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.09.004
106. Mahutte, N., Hartman, M., Meng, L., Lanes, A., Luo, Z.-C., & Liu, K. E. (2022). Optimal endometrial thickness in fresh and frozen-thaw in vitro fertilization cycles: An analysis of live birth rates from 96,000 autologous embryo transfers. *Fertility and Sterility*, *117*(4), 792–800. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.12.025
107. Mak, I. Y. H., Brosens, J. J., Christian, M., Hills, F. A., Chamley, L., Regan, L., & White, J. O. (2002). Regulated Expression of Signal Transducer and Activator of Transcription, Stat5, and its Enhancement of PRL Expression in Human Endometrial Stromal Cells in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(6), 2581–2588. https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8576
108. Makieva, S., Giacomini, E., Ottolina, J., Sanchez, A., Papaleo, E., & Viganò, P. (2018). Inside the Endometrial Cell Signaling Subway: Mind the Gap(s). *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2477. https://doi.org/10.3390/ijms19092477
109. Makrigiannakis, A., Makrygiannakis, F., & Vrekoussis, T. (2021). Approaches to Improve Endometrial Receptivity in Case of Repeated Implantation Failures. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 613277. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.613277
110. Mao, Y., Yang, Y., Sun, C., Zou, Y., Zhang, Y., Wu, B., Li, C., Huang, J., Zhang, W., & Wang, J. (2023). Human amniotic mesenchymal stem cells promote endometrium regeneration in a rat model of intrauterine adhesion. *Cell Biology International*, *47*(1), 75–85. https://doi.org/10.1002/cbin.11951
111. Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J.-H., & Jeong, J.-W. (2019). Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes

Wrong in Endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(15), 3822. https://doi.org/10.3390/ijms20153822

112. Marron, K., & Harrity, C. (2019). Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(5), 837–846. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01427-8
113. Maruyama, T., & Yoshimura, Y. (2008). Molecular and Cellular Mechanisms for Differentiation and Regeneration of the Uterine Endometrium. *Endocrine Journal*, *55*(5), 795–810. https://doi.org/10.1507/endocrj.K08E-067
114. Matsumoto, H., Sakai, K., & Iwashita, M. (2008). Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via 5 1 integrin. *Molecular Human Reproduction*, *14*(8), 485–489. https://doi.org/10.1093/molehr/gan038
115. Mauri, D., Gazouli, I., Zarkavelis, G., Papadaki, A., Mavroeidis, L., Gkoura, S., Ntellas, P., Amylidi, A.-L., Tsali, L., & Kampletsas, E. (2020). Chemotherapy Associated Ovarian Failure. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 572388. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.572388
116. Medina, C. B., Mehrotra, P., Arandjelovic, S., Perry, J. S. A., Guo, Y., Morioka, S., Barron, B., Walk, S. F., Ghesquière, B., Krupnick, A. S., Lorenz, U., & Ravichandran, K. S. (2020). Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature*, *580*(7801), 130–135. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2121-3
117. Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K. W., Thébaud, B., & Riordan, N. H. (2007). Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, *5*(1), 57. https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57
118. Mo, F.-E., Muntean, A. G., Chen, C.-C., Stolz, D. B., Watkins, S. C., & Lau, L. F. (2002). CYR61 (CCN1) Is Essential for Placental Development and Vascular Integrity. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(24), 8709–8720. https://doi.org/10.1128/MCB.22.24.8709-8720.2002
119. Mote, P. A., Balleine, R. L., McGowan, E. M., & Clarke, C. L. (2000). Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Human Reproduction*, *15*(suppl 3), 48–56. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_3.48
120. Muhammad, T., Wan, Y., Sha, Q., Wang, J., Huang, T., Cao, Y., Li, M., Yu, X., Yin, Y., Chan, W. Y., Chen, Z.-J., You, L., Lu, G., & Liu, H. (2020). IGF2 improves the developmental competency and meiotic

structure of oocytes from aged mice. *Aging*, *13*(2), 2118–2134. https://doi.org/10.18632/aging.202214

121. Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & Conneely, O. M. (2000). Subgroup of Reproductive Functions of Progesterone Mediated by Progesterone Receptor-B Isoform. *Science*, *289*(5485), 1751–1754. https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1751
122. Murata, H., Tanaka, S., & Okada, H. (2022). The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization. *Biomolecules*, *12*(9), 1275. https://doi.org/10.3390/biom12091275
123. Murray, I. R., West, C. C., Hardy, W. R., James, A. W., Park, T. S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., & Péault, B. (2014). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(8), 1353–1374. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1462-6
124. Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplantation*, *28*(7), 801–812. https://doi.org/10.1177/0963689719837897
125. Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Wilm, M., & Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *The EMBO Journal*, *26*(18), 4078–4088. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601837
126. Neri, S. (2019). Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2406. https://doi.org/10.3390/ijms20102406
127. Ng, S.-W., Norwitz, G. A., Pavlicev, M., Tilburgs, T., Simón, C., & Norwitz, E. R. (2020). Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 4092. https://doi.org/10.3390/ijms21114092
128. Ochoa-Bernal, M. A., & Fazleabas, A. T. (2020). Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 1973. https://doi.org/10.3390/ijms21061973
129. Odendaal, J., & Quenby, S. (2021). Immunological Testing in Assisted Reproductive Technology. *Seminars in Reproductive Medicine*, *39*(01/02), 013–023. https://doi.org/10.1055/s-0041-1730908

130. Oficialios statistikos portalas. (2023). *Lietuvos gyventojai (2023 m. leidimas). Gimstamumas.* https://osp.stat.gov.lt/lietuvos-gyventojai-2023/gimstamumas
131. Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive Medicine and Biology*, *17*(3), 220–227. https://doi.org/10.1002/rmb2.12088
132. Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Denchi, E. L., & Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4061–4071. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402
133. Pfeifer, S., Butts, S., Fossum, G., Gracia, C., La Barbera, A., Mersereau, J., Odem, R., Paulson, R., Penzias, A., Pisarska, M., Rebar, R., Reindollar, R., Rosen, M., Sandlow, J., & Vernon, M. (2017). Optimizing natural fertility: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, *107*(1), 52–58. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.029
134. Pinborg, A., Hougaard, C. O., Nyboe Andersen, A., Molbo, D., & Schmidt, L. (2008). Prospective longitudinal cohort study on cumulative 5-year delivery and adoption rates among 1338 couples initiating infertility treatment. *Human Reproduction*, *24*(4), 991–999. https://doi.org/10.1093/humrep/den463
135. Pohnke, Y., Schneider-Merck, T., Fahnenstich, J., Kempf, R., Christian, M., Milde-Langosch, K., Brosens, J. J., & Gellersen, B. (2004). Wild-Type p53 Protein Is Up-Regulated upon Cyclic Adenosine Monophosphate-Induced Differentiation of Human Endometrial Stromal Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(10), 5233–5244. https://doi.org/10.1210/jc.2004-0012
136. Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P., & Plachov, D. (1992). *PAX8* , a human paired box gene: Isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development*, *116*(3), 611–623. https://doi.org/10.1242/dev.116.3.611
137. Popli, P., Sun, A. J., & Kommagani, R. (2022). The Multifaceted Role of Autophagy in Endometrium Homeostasis and Disease. *Reproductive Sciences*, *29*(4), 1054–1067. https://doi.org/10.1007/s43032-021-00587-2
138. Prange-Kiel, J., Rune, G., Zwirner, M., Wallwiener, D., & Kiesel, L. (2001). Regulation of estrogen receptor α and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *109*(04), 231–237. https://doi.org/10.1055/s-2001-15111

139. Preckel, D., & Von Känel, R. (2004). Regulation of Hemostasis by the Sympathetic Nervous System: Any Contribution to Coronary Artery Disease? *Heart Drug*, *4*(3), 123–130. https://doi.org/10.1159/000078415
140. Prianishnikov, V. A. (1978). On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception*, *18*(3), 213–223. https://doi.org/10.1016/S0010-7824(78)80015-8
141. Pru, J. K., & Clark, N. C. (2013). PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. *Frontiers in Neuroscience*, *7*. https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00168
142. Qin, C., Xia, X., Fan, Y., Jiang, Y., Chen, Y., Zhang, N., Uslu, B., Johnson, J., & Kallen, A. N. (2019). A novel, noncoding-RNA-mediated, post-transcriptional mechanism of anti-Mullerian hormone regulation by the H19/let-7 axis†. *Biology of Reproduction*, *100*(1), 101–111. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy172
143. Qin, L., Liu, N., Bao, C., Yang, D., Ma, G., Yi, W., Xiao, G., & Cao, H. (2023). Mesenchymal stem cells in fibrotic diseases—The two sides of the same coin. *Acta Pharmacologica Sinica*, *44*(2), 268–287. https://doi.org/10.1038/s41401-022-00952-0
144. Qu, F., Wu, Y., Zhu, Y.-H., Barry, J., Ding, T., Baio, G., Muscat, R., Todd, B. K., Wang, F.-F., & Hardiman, P. J. (2017). The association between psychological stress and miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *7*(1), 1731. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01792-3
145. Ramathal, C., Bagchi, I., Taylor, R., & Bagchi, M. (2010). Endometrial Decidualization: Of Mice and Men. *Seminars in Reproductive Medicine*, *28*(01), 017–026. https://doi.org/10.1055/s-0029-1242989
146. Ramezanzadeh, F., Aghssa, M. M., Abedinia, N., Zayeri, F., Khanafshar, N., Shariat, M., & Jafarabadi, M. (2004). A survey of relationship between anxiety, depression and duration of infertility. *BMC Women's Health*, *4*(1), 9. https://doi.org/10.1186/1472-6874-4-9
147. Ray, A., Gulati, K., & Rai, N. (2017). Stress, Anxiety, and Immunomodulation. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 103, pp. 1–25). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.09.007
148. Reig, A., Mamillapalli, R., Coolidge, A., Johnson, J., & Taylor, H. S. (2019). Uterine Cells Improved Ovarian Function in a Murine Model of Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*, *26*(12), 1633–1639. https://doi.org/10.1177/1933719119875818
149. Retis-Resendiz, A. M., Cid-Cruz, Y., Velázquez-Hernández, D. M., Romero-Reyes, J., León-Juárez, M., García-Gómez, E., Camacho-Arroyo, I., &

Vázquez-Martínez, E. R. (2024). cAMP regulates the progesterone receptor gene expression through the protein kinase A pathway during decidualization in human immortalized endometrial stromal cells. *Steroids*, *203*, 109363. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2024.109363

150. Robertson, S. A., Care, A. S., & Moldenhauer, L. M. (2018). Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(10), 4224–4235. https://doi.org/10.1172/JCI122182
151. Sakai, N., Maruyama, T., Sakurai, R., Masuda, H., Yamamoto, Y., Shimizu, A., Kishi, I., Asada, H., Yamagoe, S., & Yoshimura, Y. (2003). Involvement of Histone Acetylation in Ovarian Steroid-induced Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(19), 16675–16682. https://doi.org/10.1074/jbc.M211715200
152. Salamonsen, L. A., & Dimitriadis, E. (2022). Infertility and the Endometrium. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, *49*(9), 195. https://doi.org/10.31083/j.ceog4909195
153. Salamonsen, L. A., Hutchison, J. C., & Gargett, C. E. (2021). Cyclical endometrial repair and regeneration. *Development*, *148*(17), dev199577. https://doi.org/10.1242/dev.199577
154. Saleh, L., Otti, G. R., Fiala, C., Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2011). Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *9*(1), 155. https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-155
155. Sanchez-Mata, A., & Gonzalez-Muñoz, E. (2021). Understanding menstrual blood-derived stromal/stem cells: Definition and properties. Are we rushing into their therapeutic applications? *iScience*, *24*(12), 103501. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103501
156. Santamaria, X., Cabanillas, S., Cervelló, I., Arbona, C., Raga, F., Ferro, J., Palmero, J., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2016). Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: A pilot cohort study. *Human Reproduction*, *31*(5), 1087–1096. https://doi.org/10.1093/humrep/dew042
157. Santamaria, X., Liu, J. H., Lusine, A., Isaacson, K., Movilla, P., Fernandez, H., Capmas, P., Donnez, J., & Simón, C. (2020). Should we consider alternative therapies to operative hysteroscopy for the treatment of Asherman syndrome? *Fertility and Sterility*, *113*(3), 511–521. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.01.022

158. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., & Haslett, C. (2002). A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *2*(12), 965–975. https://doi.org/10.1038/nri957
159. Schreiber, C. A., Sammel, M., Hillier, S. L., & Barnhart, K. T. (2009). A little bit pregnant: Modeling how the accurate detection of pregnancy can improve HIV prevention trials. *American Journal of Epidemiology*, *169*(4), 515–521. https://doi.org/10.1093/aje/kwn345
160. Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, *22*(11), 2903–2911. https://doi.org/10.1093/humrep/dem265
161. Shao, X., Ai, G., Wang, L., Qin, J., Li, Y., Jiang, H., Zhang, T., Zhou, L., Gao, Z., Cheng, J., & Cheng, Z. (2019). Adipose-derived stem cells transplantation improves endometrial injury repair. *Zygote*, *27*(6), 367–374. https://doi.org/10.1017/S096719941900042X
162. Shaodi, Z., Qiuyuan, L., Yisha, Y., & Cuilian, Z. (2020). The effect of endometrial thickness on pregnancy outcomes of frozen-thawed embryo transfer cycles which underwent hormone replacement therapy. *PloS One*, *15*(9), e0239120. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239120
163. Sharma, A., & Shrivastava, D. (2022). Psychological Problems Related to Infertility. *Cureus*, *14*(10), e30320. https://doi.org/10.7759/cureus.30320
164. Sharma, S., & Bhonde, R. (2020). Genetic and epigenetic stability of stem cells: Epigenetic modifiers modulate the fate of mesenchymal stem cells. *Genomics*, *112*(5), 3615–3623. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.022
165. Shayesteh-Parto, F., Hasanpoor-Azghady, S. B., Arefi, S., & Amiri-Farahani, L. (2023). Infertility-related stress and its relationship with emotional divorce among Iranian infertile people. *BMC Psychiatry*, *23*(1), 666. https://doi.org/10.1186/s12888-023-05159-z
166. Sher, G., Herbert, C., Maassarani, G., & Jacobs, M. H. (1991). Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Human Reproduction*, *6*(2), 232–237. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137312
167. Shi, J.-W., Lai, Z.-Z., Yang, H.-L., Zhou, W.-J., Zhao, X.-Y., Xie, F., Liu, S.-P., Chen, W.-D., Zhang, T., Ye, J.-F., Zhou, X.-Y., & Li, M.-Q. (2022). An IGF1-expressing endometrial stromal cell population is associated with human decidualization. *BMC Biology*, *20*(1), 276. https://doi.org/10.1186/s12915-022-01483-0

168. Shimizu, A., Maruyama, T., Tamaki, K., Uchida, H., Asada, H., & Yoshimura, Y. (2005). Impairment of Decidualization in SRC-Deficient Mice1. *Biology of Reproduction*, *73*(6), 1219–1227. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041616
169. Silva Cascales, H., Burdova, K., Middleton, A., Kuzin, V., Müllers, E., Stoy, H., Baranello, L., Macurek, L., & Lindqvist, A. (2021). Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1. *Life Science Alliance*, *4*(3), e202000980. https://doi.org/10.26508/lsa.202000980
170. Singh, N., Shekhar, B., Mohanty, S., Kumar, S., Seth, T., & Girish, B. (2020). Autologous bone marrow-derived stem cell therapy for Asherman's syndrome and endometrial atrophy: A 5-year follow-up study. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *13*(1), 31. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_64_19
171. Skliutė, G., Baušytė, R., Borutinskaitė, V., Valiulienė, G., Kaupinis, A., Valius, M., Ramašauskaitė, D., & Navakauskienė, R. (2021). Menstrual Blood-Derived Endometrial Stem Cells' Impact for the Treatment Perspective of Female Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 6774. https://doi.org/10.3390/ijms22136774
172. Smikle C, Yarrarapu SNS, Khetarpal S. Asherman Syndrome. [Updated 2023 Jul 24]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448088/
173. Somasundaram, I. (2017). Marker Profiles of Human Endometrial Stem Cells at Various Passages Cultured In-Vitro. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*, *2*(1). https://doi.org/10.15406/jsrt.2017.02.00051
174. Somasundaram, I. (2016). Endometrial Stem Cells: An Overview. *Endometrial Stem Cells and Its Potential Applications (p. 10-12)*. India: Springer.
175. Song, Y.-T., Liu, P.-C., Tan, J., Zou, C.-Y., Li, Q.-J., Li-Ling, J., & Xie, H.-Q. (2021). Stem cell-based therapy for ameliorating intrauterine adhesion and endometrium injury. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 556. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02620-2
176. Spears, N., Lopes, F., Stefansdottir, A., Rossi, V., De Felici, M., Anderson, R. A., & Klinger, F. G. (2019). Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human Reproduction Update*, *25*(6), 673–693. https://doi.org/10.1093/humupd/dmz027
177. Sudoma, I., Pylyp, L., Kremenska, Y., & Goncharova, Y. (2019). Application of autologous adipose-derived stem cells for thin endometrium treatment in patients with failed ART programs. *Journal*

of Stem Cell Therapy and Transplantation, *3*(1), 001–008. https://doi.org/10.29328/journal.jsctt.1001013

178. Takano, M., Lu, Z., Goto, T., Fusi, L., Higham, J., Francis, J., Withey, A., Hardt, J., Cloke, B., Stavropoulou, A. V., Ishihara, O., Lam, E. W.-F., Unterman, T. G., Brosens, J. J., & Kim, J. J. (2007). Transcriptional Cross Talk between the Forkhead Transcription Factor Forkhead Box O1A and the Progesterone Receptor Coordinates Cell Cycle Regulation and Differentiation in Human Endometrial Stromal Cells. *Molecular Endocrinology*, *21*(10), 2334–2349. https://doi.org/10.1210/me.2007-0058
179. Tal, R., Shaikh, S., Pallavi, P., Tal, A., López-Giráldez, F., Lyu, F., Fang, Y.-Y., Chinchanikar, S., Liu, Y., Kliman, H. J., Alderman, M., Pluchino, N., Kayani, J., Mamillapalli, R., Krause, D. S., & Taylor, H. S. (2019). Adult bone marrow progenitors become decidual cells and contribute to embryo implantation and pregnancy. *PLOS Biology*, *17*(9), e3000421. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000421
180. Tamura, I., Asada, H., Maekawa, R., Tanabe, M., Lee, L., Taketani, T., Yamagata, Y., Tamura, H., & Sugino, N. (2012). Induction of IGFBP-1 Expression by cAMP Is Associated with Histone Acetylation Status of the Promoter Region in Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology*, *153*(11), 5612–5621. https://doi.org/10.1210/en.2012-1420
181. Tan, J., Li, P., Wang, Q., Li, Y., Li, X., Zhao, D., Xu, X., & Kong, L. (2016). Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Human reproduction*, *31*(12), 2723–2729. https://doi.org/10.1093/humrep/dew235
182. Tavakol, S., Azedi, F., Hoveizi, E., Ai, J., & Joghataei, M. T. (2018). Human Endometrial Stem Cell Isolation from Endometrium and Menstrual Blood. *Bio-Protocol*, *8*(2), e2693. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2693
183. Taylor, H. S. (2004). Endometrial Cells Derived From Donor Stem Cells in Bone Marrow Transplant Recipients. *JAMA*, *292*(1), 81. https://doi.org/10.1001/jama.292.1.81
184. Teh, W.-T., McBain, J., & Rogers, P. (2016). What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(11), 1419–1430. https://doi.org/10.1007/s10815-016-0773-6
185. Tersoglio, A. E., Tersoglio, S., Salatino, D. R., Castro, M., Gonzalez, A., Hinojosa, M., & Castellano, O. (2020). Regenerative therapy by

endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure. A novel strategy. *JBRA assisted reproduction*, *24*(2), 118–127. https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190061

186. The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Gliozheni, O., Hambartsoumian, E., Strohmer, H., Petrovskaya, E., Tishkevich, O., De Neubourg, D., Bogaerts, K., Balic, D., Antonova, I., Cvetkova, E., Rezabek, K., Kirk, J., Sõritsa, D., Gissler, M., Pelkonen, S., Mansouri, I., De Mouzon, J., Tandler-Schneider, A., … Goossens, V. (2023). ART in Europe, 2019: Results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction*, *38*(12), 2321–2338. https://doi.org/10.1093/humrep/dead197
187. Torrealday, S., Kodaman, P., & Pal, L. (2017). Premature Ovarian Insufficiency—An update on recent advances in understanding and management. *F1000Research*, *6*, 2069. https://doi.org/10.12688/f1000research.11948.1
188. Tsolova, A. O., Aguilar, R. M., Maybin, J. A., & Critchley, H. O. D. (2022). Pre-clinical models to study abnormal uterine bleeding (AUB). *eBioMedicine*, *84*, 104238. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104238
189. Valatkaitė, E., Baušytė, R., Vitkevičienė, A., Ramašauskaitė, D., & Navakauskienė, R. (2021). Decidualization Potency and Epigenetic Changes in Human Endometrial Origin Stem Cells During Propagation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 765265. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765265
190. Valstybinė ligonių kasa prie Sveikatos apsaugos ministerijos. (2023). Pagalbinio apvaisinimo paslaugų teikimo ir jų apmokėjimo Privalomojo sveikatos draudimo fondo biudžeto lėšomis analizė 2017–2020 m. https://ligoniukasa.lrv.lt/lt/veiklos-sritys/informacija-gyventojams/pagalbinis-apvaisinimas/apzvalgos-24/
191. Van Der Horst, P. H., Wang, Y., Van Der Zee, M., Burger, C. W., & Blok, L. J. (2012). Interaction between sex hormones and WNT/β-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *358*(2), 176–184. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.010
192. Van Kruijsbergen, I., Hontelez, S., & Veenstra, G. J. C. (2015). Recruiting polycomb to chromatin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *67*, 177–187. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.006

193. Vioreanu, A.-M. (2021). Psychological Impact of Infertility. Directions for the Development of Interventions. *Mental Health: Global Challenges Journal*, *4*(1). https://doi.org/10.32437/mhgcj.v4i1.113
194. Vollset, S. E., Goren, E., Yuan, C.-W., Cao, J., Smith, A. E., Hsiao, T., Bisignano, C., Azhar, G. S., Castro, E., Chalek, J., Dolgert, A. J., Frank, T., Fukutaki, K., Hay, S. I., Lozano, R., Mokdad, A. H., Nandakumar, V., Pierce, M., Pletcher, M., … Murray, C. J. L. (2020). Fertility, mortality, migration, and population scenarios for 195 countries and territories from 2017 to 2100: A forecasting analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, *396*(10258), 1285–1306. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30677-2
195. Von Woon, E., Greer, O., Shah, N., Nikolaou, D., Johnson, M., & Male, V. (2022). Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *28*(4), 548–582. https://doi.org/10.1093/humupd/dmac006
196. Waldman, T., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1995). P21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, *55*(22), 5187–5190
197. Walker, M.H., Tobler, K.J. Female Infertility. [Updated 2022 Dec 19]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556033/
198. Wang, J., Ju, B., Pan, C., Gu, Y., Zhang, Y., Sun, L., Zhang, B., & Zhang, Y. (2016). Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Intrauterine Adhesions in Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *39*(4), 1553–1560. https://doi.org/10.1159/000447857
199. Wang, J., Liu, C., Fujino, M., Tong, G., Zhang, Q., Li, X.-K., & Yan, H. (2019). Stem Cells as a Resource for Treatment of Infertility-related Diseases. *Current Molecular Medicine*, *19*(8), 539–546. https://doi.org/10.2174/1566524019666190709172636
200. Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W., & Orkin, S. H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, *444*(7117), 364–368. https://doi.org/10.1038/nature05284
201. Wang, L., Tang, Y., & Wang, Y. (2023). Predictors and incidence of depression and anxiety in women undergoing infertility treatment: A cross-sectional study. *PLOS ONE*, *18*(4), e0284414. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284414

202. Wang, T.-H., Chang, C.-L., Wu, H.-M., Chiu, Y.-M., Chen, C.-K., & Wang, H.-S. (2006). Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertility and Sterility*, *86*(5), 1392–1401. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.03.064
203. Wang, W., Taylor, R. N., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2012). Regulation of Human Endometrial Stromal Proliferation and Differentiation by C/EBPβ Involves Cyclin E-cdk2 and STAT3. *Molecular Endocrinology*, *26*(12), 2016–2030. https://doi.org/10.1210/me.2012-1169
204. Wang, Y., Meng, Z., Pei, J., Qian, L., Mao, B., Li, Y., Li, J., Dai, Z., Cao, J., Zhang, C., Chen, L., Jin, Y., & Yi, B. (2021). Anxiety and depression are risk factors for recurrent pregnancy loss: A nested case–control study. *Health and Quality of Life Outcomes*, *19*(1), 78. https://doi.org/10.1186/s12955-021-01703-1
205. Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*, *292*(5517), 727–730. https://doi.org/10.1126/science.1059108
206. Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). P53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(5), a026070. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070
207. Wiśniewska, J., Sadowska, A., Wójtowicz, A., Słyszewska, M., & Szóstek-Mioduchowska, A. (2021). Perspective on Stem Cell Therapy in Organ Fibrosis: Animal Models and Human Studies. *Life*, *11*(10), 1068. https://doi.org/10.3390/life11101068
208. World Health Organization. (2023). Infertility prevalence estimates, 1990–2021. https://www.who.int/publications/i/item/978920068315
209. Wu, J.-X., Xia, T., She, L.-P., Lin, S., & Luo, X.-M. (2022). Stem Cell Therapies for Human Infertility: Advantages and Challenges. *Cell Transplantation*, *31*, 096368972210832. https://doi.org/10.1177/09636897221083252
210. Xia, X., Burn, M. S., Chen, Y., Karakaya, C., & Kallen, A. (2020). The relationship between H19 and parameters of ovarian reserve. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *18*(1), 46. https://doi.org/10.1186/s12958-020-00578-z
211. Xiong, Y., Wen, X., Liu, H., Zhang, M., & Zhang, Y. (2020). Bisphenol a affects endometrial stromal cells decidualization, involvement of epigenetic

regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *200*, 105640. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105640

212. Yang, R., Chen, Y., & Chen, D. (2017). Biological functions and role of CCN1/Cyr61 in embryogenesis and tumorigenesis in the female reproductive system (Review). *Molecular Medicine Reports*. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7880
213. Yi, K. W., Mamillapalli, R., Sahin, C., Song, J., Tal, R., & Taylor, H. S. (2019). Bone marrow-derived cells or C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) treatment improve thin endometrium in a mouse model. *Biology of Reproduction*, *100*(1), 61–70. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy175
214. Yu, D., Wong, Y.-M., Cheong, Y., Xia, E., & Li, T.-C. (2008). Asherman syndrome—One century later. *Fertility and Sterility*, *89*(4), 759–779. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.096
215. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & Van Der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 393–406. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005
216. Zeng, C., Shao, Z., Li, J., Pan, H., & Xing, F. (2020). Commentary: Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1878. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01878
217. Zhang, L., Li, Y., Guan, C.-Y., Tian, S., Lv, X.-D., Li, J.-H., Ma, X., & Xia, H.-F. (2018). Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 36. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0777-5
218. Zhang, X., Li, Y., Chen, X., Jin, B., Shu, C., Ni, W., Jiang, Y., Zhang, J., Ma, L., & Shu, J. (2022). Single-cell transcriptome analysis uncovers the molecular and cellular characteristics of thin endometrium. *The FASEB Journal*, *36*(3). https://doi.org/10.1096/fj.202101579R
219. Zhang, Y., Lin, X., Dai, Y., Hu, X., Zhu, H., Jiang, Y., & Zhang, S. (2016). Endometrial stem cells repair injured endometrium and induce angiogenesis via AKT and ERK pathways. *Reproduction*, *152*(5), 389–402. https://doi.org/10.1530/REP-16-0286
220. Zhang, Y., Shi, L., Lin, X., Zhou, F., Xin, L., Xu, W., Yu, H., Li, J., Pan, M., Pan, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Shen, J., Zhao, L., Lu, M., & Zhang, S. (2021). Unresponsive thin endometrium caused by Asherman syndrome treated with umbilical cord mesenchymal stem cells on collagen

scaffolds: A pilot study. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 420. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02499-z

221. Zhao, J., Zhang, Q., Wang, Y., & Li, Y. (2015). Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *22*(2), 181–188. https://doi.org/10.1177/1933719114537715
222. Zhao, M., Chi, F., Zhang, T., Teng, X., & Li, K. (2021). Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells regulation of the EGF/Ras p21 pathway as a potential therapeutic target for thin endometrium. *Annals of Translational Medicine*, *9*(18), 1476–1476. https://doi.org/10.21037/atm-21-4652
223. Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A. M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., Fong, E. L. S., Balachander, G. M., Chen, Z., Soragni, A., Huch, M., Zeng, Y. A., Wang, Q., & Yu, H. (2022). Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*, *2*(1), 94. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y
224. Zhou, C., Lv, M., Wang, P., Guo, C., Ni, Z., Bao, H., Tang, Y., Cai, H., Lu, J., Deng, W., Yang, X., Xia, G., Wang, H., Wang, C., & Kong, S. (2021). Sequential activation of uterine epithelial IGF1R by stromal IGF1 and embryonic IGF2 directs normal uterine preparation for embryo implantation. *Journal of Molecular Cell Biology*, *13*(9), 646–661. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab034
225. Zhu, H., Jiang, Y., Pan, Y., Shi, L., & Zhang, S. (2018). Human menstrual blood–derived stem cells promote the repair of impaired endometrial stromal cells by activating the p38 MAPK and AKT signaling pathways. *Reproductive Biology*, *18*(3), 274–281. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.06.003
226. Zhu, H., Pan, Y., Jiang, Y., Li, J., Zhang, Y., & Zhang, S. (2019). Activation of the Hippo/TAZ pathway is required for menstrual stem cells to suppress myofibroblast and inhibit transforming growth factor β signaling in human endometrial stromal cells. *Human Reproduction*, *34*(4), 635–645. https://doi.org/10.1093/humrep/dez001
227. Zhuang, W.-Z., Lin, Y.-H., Su, L.-J., Wu, M.-S., Jeng, H.-Y., Chang, H.-C., Huang, Y.-H., & Ling, T.-Y. (2021). Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: Mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications. *Journal of Biomedical Science*, *28*(1), 28. https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7
228. Zigmond, A. S., & Snaith, R. P. (1983). The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *67*(6), 361–370. https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x

PRIEDAI

Priedas Nr. 1. Ląstelių paviršiaus žymenų analizėje tėkmės citometrijos metodu naudotų antikūnų sąrašas

Antikūnas	**Fluorescentinė žymė**	**Izotipinė kontrolė**	**Gamintojas**
CD44	APC	IgG1, κ	*Biolegend*, San Diegas, Kalifornija, JAV
CD105	APC	Pelės IgG2a	*Exbio, Vestec*, Čekija
CD117	APC	Pelės IgG1, κ	*Exbio, Vestec*, Čekija
CD90	APC	Pelės IgG1, κ	*Exbio, Vestec*, Čekija
CD146	APC	IgG1, κ	*Biolegend*, San Diegas, Kalifornija, JAV
CD45	FITC	IgG1, κ	*BD Pharmingen*, San Chosė, Kalifornija, USA
CD73	FITC	Pelės IgG1, κ	*Exbio, Vestec*, Čekija
CD34	FITC	IgG2a, κ	*Biolegend*, San Diegas, Kalifornija, JAV
CD166	Fikoeritrinas (PE)	IgG1, κ	*Biolegend*, San Diegas, Kalifornija, JAV

Priedas Nr. 2. Genų raiškos analizėje naudotos genų pradmenų sekos

Genas	**Tiesioginio pradmens seka (F) ir atvirkštinio pradmens seka (R) (5' –> 3')**
MOTERŲ ENDOMETRIUMO AUDINIO IR MĖNESINIŲ KRAUJO MĖGINIAI	
Su decidualizacija susiję genai	
ESR1	F: TGGGAATGATGAAAGGTGGGATAC R: AGGTTGGCAGCTCTCATGTC
FOXO1	F: TCGTCATAATCTGTCCCTACACA R: CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA
IGFBP1	F: TTTTACCTGCCAAACTGCAACA R: CCCATTCCAAGGGTAGACGC
PGR	F: CAGCCAGAGCCCACAATACA R: GTTGTGCTGCCCTTCCATTG
PRL	F: TGACCCTTCGAGACCTGTTTG R: CTTGCTCCTTGTCTTCGGG
WNT4	F: AGGAGGAGACGTGCGAGAAA R: CGAGTCCATGACTTCCAGGT
Su ląstelių kamieniškumu ir savaiminiu atsinaujinimu susiję genai	
KLF4	F: CACATTAATGAGGCAGCCACC R: AAGTCGCTTCATGTGGGAGAG
LIN28A	F: TTGTCTTCTACCCTGCCCTCT R: GAACAAGGGATGGAGGGTTTT
NANOG	F: AGATGCCTCACACGGAGACT R: GTTTGCCTTTGGGACTGGTG
NOTCH1	F: GGTGAGACCTGCCTGAATG R: GTTGGGGTCCTGGCATC
OCT4	F: CGAGAAGGATGTGGTCCGAG R: CAGAGGAAAGGACACTGGTC
REX1	F: GCCTTATGTGATGGCTATGTGT R: ACCCCTTATGACGCATTCTATGT
SOX2	F: TGGACAGTTACGCGCACAT R: CGAGTAGGACATGCTGTAGGT
WNT4	F: TGGACAGTTACGCGCACAT R: CGAGTAGGACATGCTGTAGGT
GAPDH	F: AGTCCCTGCCACACTCAG R: TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG
Su angiogeneze susiję genai	
HIF1A	F: CCAACAGTAACCAACCTCAG R: TCCTGTGGTGACTTGTCCTT
VEGFR2	F: ACTGTCATCCTTACCAATCC R: CTTCCAACTGCCAATACC
VEGFR3	F: TGCACGAGGTACATGCCAAC R: GCTGCTCAAAGTCTCTCACGAA

Genas	Tiesioginio pradmens seka (F) ir atvirkštinio pradmens seka (R) (5’ –> 3’)
MOTERŲ ENDOMETRIUMO AUDINIO IR MĖNESINIŲ KRAUJO MĖGINIAI	
Su imuniniu atsaku susiję genai	
AFF3	F: GTCATCTCGTTGGAGTTCCCA R: AGTGCCTCTCTTACTCTGCTG
CD58	F: CTCATGGGATTGTCCTATGGAGC R: GCTTGGGATACAGGTTGTCAAA
TNFSF4	F: TGCTCTTCAGGTATCACATCGG R: ATGACTGAGTTGTTCTGCACC
Su ląstelės diferenciacijos kontrole susiję genai	
PAX8AS1	F: CAACAGCACCCTGGACGAC R: AGGGTGAGTGAGGATCTGCC
EFNA5	F: GTGACTACCATATTGATGTCTG R: GACGGAGTCCTCATAGTGAG
IGF2	F: TCGTTGAGGAGTGCTGTTTCC R: ACACGTCCCTCTCGGACTTG
H19	F: TTTCATCCTTCTGTCTCTTTGT R: CAACCAGTGCAAATGACTTAG
Su angiogenezės ir hemostazės sistemų kontrole susiję genai	
CYR61	F: TCCAGCCCAACTGTAAACATCA R: GGACACAGAGGAATGCAGCC
TFPI2	F: AACGCCAACAATTTCTACACCT R: TACTTTTCTGTGGACCCCTCAC
Su ląstelės sekrecija susijęs genas	
MON1A	F: ACACCCTTACCCCTCCAT R: CTTCTCTTCCTCTGCATGTCAG
Kontrolinis genas	
GAPDH	F: AGTCCCTGCCACACTCAG R: TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG
PELIŲ PATELIŲ GIMDOS RAGO AUDINIŲ MĖGINIAI	
Su fibrozės formavimusi ir žaizdų gijimu susiję genai	
Acta2	F: TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA R: ATCTGCTGGAAGGTAGACAGCGAA
CD44	F: ATCAGCAGATCGATTTGAATGTAA R: CATTTCCTTCTATGAACCCATACC
Col1a1	F: TCACCAAACTCAGAAGATGTAGGA R: GACCAGGAGGACCAGGAAG
Col3a1	F: ACAGCAGTCCAACGTAGATGAAT R: TCACAGATTATGTCATCGCA
Kontrolinis genas	
18S	F: GGAAGGGCACCACCAGGAGT R: TGCAGCCCCGGACATCTAAG

Priedas Nr. 3. *Western blot* analizės metu naudotų antikūnų sąrašas

Antikūnas	**Praskiedimas**	**Gamintojas**
p53 (monokloninis, pelės, klonas DO-1)	1:500	*Santa Cruz Biotechnology,* Santa Kruzas, Kalifornija, JAV
p21 (monokloninis, pelės, klonas 187)	1:1000	*Abcam,* Kembridžas, Didžioji Britanija
Ciklinas A2 (monokloninis, pelės, klonas 17B8.2)	1:10 000	*Merck Millipore,* Berlingtonas, MA, JAV
Bax (monokloninis, triušio, klonas 2D2)	1:1000	*Cell Signaling Technology,* Danversas, Masačusetsas, JAV
CEBPβ (monokloninis, pelės)	1:500	*Santa Cruz Biotechnology,* Santa Kruzas, Kalifornija, JA
Ezh2 (polikloninis, triušio)	1:2000	*Abcam,* Kembridžas, Didžioji Britanija
Suz12 (monokloninis, triušio, klonas D39F6)	1:1000	*Cell Signaling Technology,* Danversas, Masačusetsas, JAV
HDAC1 (monokloninis, pelės, klonas 10E2)	1:1000	*Abcam,* Kembridžas, Didžioji Britanija
HyperAcH4 (polikloninis, triušio)	1:1000	*Millipore, Billerica,* Masačusetsas, JAV
H3K27me3 (polikloninis, triušio)	1:500	*Millipore, Billerica,* Masačusetsas, JAV
GAPDH (monokloninis, pelės, klonas 6C5)	1:10 000	*Abcam,* Kembridžas, Didžioji Britanija
Antriniai antikūnai konjuguoti su HRP prieš pelės imunoglobulinus (Ig) (ožkos, poliklonininiai)	1:2000	*Agilent Dako,* Santa Klara, Kalifornija, JAV
Antriniai antikūnai konjuguoti su HRP prieš triušio Ig (ožkos, poliklonininiai)	1:2000	*Agilent Dako,* Santa Klara, Kalifornija, JAV

Priedas Nr. 4. HAD skalės, skirtos įvertinti nerimo ir depresijos sutrikimus, klausimynas

Klinikinė anketa apie nerimą ir depresiją (HADS)

GL Assessment

Vardas, pavardė: _____ Data: _____

LENKTI ČIA

Gydytojų nuomone, daugelio ligų atveju emocijos atlieka svarbų vaidmenį. Jeigu Jūsų gydytojas žinos apie Jūsų jausmus, jis galės daugiau Jums padėti.

Šis klausimynas yra skirtas padėti Jūsų gydytojui išsiaiškinti, kaip Jūs jaučiatės. Perskaitykite kiekvieną žemiau išdėstytą punktą ir **pabraukite tą atsakymą,** kuris geriausiai apibūdina, kaip Jūs jautėtės per pastaruosius 7 dienas. Nekreipkite dėmesio į skaičius, esančius klausimyno kraštuose.

Prašome atsakyti ilgai negalvojant, nes Jūsų pirmoji reakcija bus tikslesnė, negu gerai apmąstytas atsakymas.

LENKTI ČIA

N.	D.		N.	D.
		Aš jaučiuosi įsitempęs(-usi)		
3		Beveik visada		
2		Dažnai		
1		Kartais		
0		Niekada		
		Aš vis dar džiaugiuosi tais pačiais dalykais, kaip ir anksčiau		
	0	Džiaugiuosi visiškai taip pat		
	1	Nesidžiaugiu tiek, kiek anksčiau		
	2	Džiaugiuosi tik truputį		
	3	Beveik nesidžiaugiu		
		Aš jaučiu baimę, tarsi kažkas baisaus turėtų atsitikti		
3		Labai aiškiai ir stipriai		
2		Taip, bet nestipriai		
1		Kartais, bet manęs tai nejaudina		
0		Niekada		
		Aš galiu juoktis ir matyti teigiamas dalykų puses		
	0	Taip pat, kaip ir visada		
	1	Dabar ne tiek, kiek anksčiau		
	2	Dabar daug mažiau		
	3	Visiškai nebegaliu		
		Man į galvą lenda neramios mintys		
3		Beveik visada		
2		Dažnai		
1		Kartais		
0		Beveik niekada		
		Aš jaučiuosi linksmas(-a)		
	3	Niekada		
	2	Retai		
	1	Dažnai		
	0	Beveik visada		
		Aš galiu būti ramus(-i) ir atsipalaidavęs(-usi)		
0		Visada		
1		Dažnai		
2		Retai		
3		Niekada		
		Jaučiuosi, tarsi viską daryčiau daug lėčiau nei anksčiau		
		Beveik visada		3
		Labai dažnai		2
		Kartais		1
		Niekada		0
		Mane apima baimės jausmas, panašus į vidinį virpulį po krūtine		
		Niekada	0	
		Kartais	1	
		Dažnai	2	
		Beveik visada	3	
		Aš nustojau rūpintis savo išvaizda		
		Visiškai		3
		Dažnai nesirūpinu ja taip, kaip turėčiau		2
		Kartais nesirūpinu ja taip, kaip turėčiau		1
		Rūpinuosi ja kaip visada		0
		Jaučiuosi neramus(-i), tarsi negalėčiau nustygti vienoje vietoje		
		Labai	3	
		Ganėtinai	2	
		Truputį	1	
		Visiškai ne	0	
		Aš su džiaugsmu laukiu ateities		
		Taip pat, kaip ir anksčiau		0
		Šiek tiek mažiau, nei anksčiau		1
		Gerokai mažiau, nei anksčiau		2
		Visiškai nelaukiu		3
		Mane apima netikėtas panikos jausmas		
		Labai dažnai	3	
		Dažnai	2	
		Retai	1	
		Niekada	0	
		Gera knyga ar radijo ar televizijos laida teikia malonumą		
		Dažnai		0
		Kartais		1
		Retai		2
		Labai retai		3

Dabar prašome patikrinti, ar atsakėte į visus klausimus

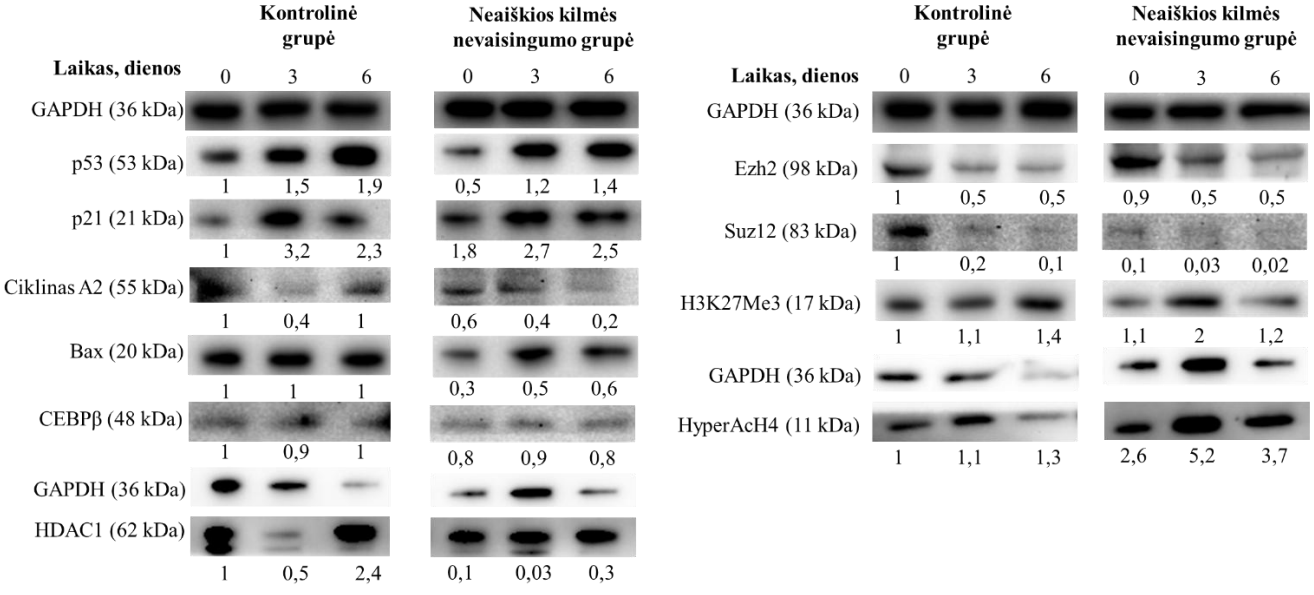
	N	D
IŠ VISO		

HADS © R. P. Snaith ir A. S. Zigmond, 1983, 1992, 1994.
Dokumento forma pirmą kartą išspausdinta „Acta Psychiatrica Scandinavica“, 67, 361–70,
© „Munksgaard International Publishers Ltd“, Copenhagen, 1983.
Šis leidinys pirmą kartą išleistas 1994 m. bendrovės „nferNelson Publishing Company Ltd“, dabar GL Assessment Limited,
1st Floor Vantage London, Great West Road, Brentford TW8 9AG, United Kingdom.
„GL Assessment“ yra GL Education www.gl-assessment.co.uk dalis.
Negavus išankstinio leidėjo sutikimo, šios formos negalima reprodukuoti jokiais būdais.
El. pašto adresas: permissions@gl-assessment.co.uk
Visos teisės saugomos, įskaitant vertimo.

Priedas Nr. 5. Ryšio pobūdžio ir stiprumo vertinimas pagal įgyjamas Spirmeno (*Spearman*) ranginės koreliacijos koeficiento vertes

Neigiama reikšmė	**Ryšio stiprumo vertinimas**	**Teigiama reikšmė**
0,00	Ryšio tarp kintamųjų nėra	0,00
0,19 – -0,01	Labai silpnas ryšys	0,01 – 0,19
-0,39 – -0,20	Silpnas ryšys	0,20 – 0,39
-0,59 – -0,40	Vidutinio stiprumo ryšys	0,40 – 0,59
-0,79 – -0,60	Stiprus ryšys	0,60 – 0,79
-0,99 – -0,80	Labai stiprus ryšys	0,80 – 0,99
-1,00	Visiškai tikslus	1,00

Priedas Nr. 6. Ląstelės ciklo ir epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų kiekio įvertinimas



Ląstelės ciklo reguliavime ir apoptozėje dalyvaujančių baltymų (p53, p21, ciklino A2, Bax, CEBPβ) ir epigenetiniame reguliavime dalyvaujančių baltymų (Ezh2, Suz12, H3K27me3, HDAC1, HyperAcH4) kiekio pokyčių įvertinimas *Western blot* metodu MenMKL priklausomai nuo moterų lytinės ir reprodukcinės sveikatos būklės. Kontrolinė grupė – moterys, kurios neturi lytinės ir reprodukcinės sistemos patologijos (*n = 2*), neaiškios kilmės nevaisingumo grupė – moterys, kurioms nustatytas neaiškios kilmės nevaisingumas (*n = 2*). 0 d. – nediferencijuotos MenMKL (kontrolinės), 3 d. – MenMKL po 3 d. diferenciacijos decidualine kryptimi, 6 d. – MenMKL po 6 d. diferenciacijos decidualine kryptimi. GAPDH – kontrolinis baltymas. Specifinių baltymų lygių intensyvumas analizuotas *ImageJ* programa *(NIH*, MD, JAV*)*. Pagal Skliutė, Baušytė *et al.*, 2021.

Priedas Nr. 7. Spirmeno (*Spearman*) ranginės koreliacijos, naudotos įvertinti su nevaisingumu susidūrusių moterų psichologinės sveikatos pagal HAD skalę, joms atliktų pagalbinio apvaisinimo ne moters kūne gydymo ciklų ir genų raiškos rezultatų tarpusavio sąsajas, duomenys

Psichologinės sveikatos įvertinimo rezultatų koreliacija su atitinkamų genų raiška		
Genas	**Koreliacijos koeficientas**	**p reikšmė**
AFF3	0,1123	0,5406
CD58	0,2951	0,1010
TNFSF4	**-0,4325**	**0,0134**
PAX8AS1	0,2379	0,1899
H19	0,2035	0,2638
EFNA5	0,07725	0,6743
IGF2	0,1441	0,4314
CYR61	0,1261	0,4915
TFP12	**-0,4325**	**0,0134**
MON1A	-0,1165	0,5254
Pastojimo po pagalbinio apvaisinimo rezultatų koreliacija su atitinkamų genų raiška		
Genas	**Koreliacijos koeficientas**	**p reikšmė**
AFF3	0,3067	0,0878
CD58	0,09305	0,6125
TNFSF4	**-0,5272**	**0,0019**
PAX8AS1	-0,08615	0,6392
H19	-0,03790	0,8368
EFNA5	-0,3204	0,0738
IGF2	0,1068	0,5606
CYR61	0,2757	0,1267
TFP12	**-0,4169**	**0,0176**
MON1A	-0,2240	0,2178

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Disertacija rengta remiantis šiomis mokslo publikacijomis:

1 publikacija. Skliutė, G., **Baušytė, R.,** Borutinskaitė, V., Valiulienė, G., Kaupinis, A., Valius, M., Ramašauskaitė, D., & Navakauskienė, R. (2021). Menstrual Blood-Derived Endometrial Stem Cells' Impact for the Treatment Perspective of Female Infertility. *International journal of molecular sciences*, *22*(13), 6774. https://doi.org/10.3390/ijms22136774

Autorės indėlis: prisidėjo prie mokslinio tyrimo plano sudarymo, mokslo publikacijos rašymo ir parengimo spaudai, atliko mokslinio tyrimo dalyvių atranką, klinikines procedūras ir rezultatų analizę.

2 publikacija. Valatkaitė, E., **Baušytė, R.,** Vitkevičienė, A., Ramašauskaitė, D., & Navakauskienė, R. (2021). Decidualization Potency and Epigenetic Changes in Human Endometrial Origin Stem Cells During Propagation. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 765265. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765265

Autorės indėlis: prisidėjo prie mokslinio tyrimo plano sudarymo, mokslo publikacijos rašymo ir parengimo spaudai, atliko mokslinio tyrimo dalyvių atranką, klinikines procedūras ir rezultatų analizę.

3 publikacija. **Bausyte, R.,** Vaigauskaite-Mazeikiene, B., Borutinskaite, V., Valatkaite, E., Besusparis, J., Valkiuniene, R. B., Kazenaite, E., Ramasauskaite, D., & Navakauskiene, R. (2023). Human endometrium-derived mesenchymal stem/stromal cells application in endometrial-factor induced infertility. *Frontiers in cell and developmental biology*, *11*, 1227487. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1227487

Autorės indėlis: prisidėjo prie mokslinio tyrimo plano sudarymo, parašė ir parengė mokslo publikaciją spausdinti, atliko mokslinio tyrimo dalyvių atranką, klinikines procedūras ir eksperimentus su laboratoriniais gyvūnais, analizavo ir apibendrino rezultatus.

4 publikacija. **Bausyte, R**, Vaigauskaite-Mazeikiene, B, Skliute, G, Valatkaite, E, Sabaityte, E, Kazenaite, E, Ramasauskaite, D, & Navakauskiene, R. (2025). A bridge between infertility and anxiety: a novel role for genes. *Pateiktas spaudai.*

Autorės indėlis: prisidėjo prie mokslinio tyrimo ir publikacijos plano sudarymo, parašė ir parengė mokslo publikaciją spausdinti, atliko mokslinio tyrimo dalyvių atranką ir klinikines procedūras, analizavo ir apibendrino rezultatus.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

1. **R. Baušytė**, A. Zentelytė, G. Skliutė, B. Vaigauskaitė, R. Gricius, V. Borutinskaitė, D. Ramašauskaitė, R. Navakauskienė. *Human endometrial stem cells and their characterization in reproductive failure cases (stendinis pranešimas).* 7th International Stem Cell Meeting. Tel Avivas, Izraelis. 2019 m. lapkričio 12–13 d.
2. **R. Baušytė**, B. Vaigauskaitė, D. Ramašauskaitė, R. Navakauskienė. *Conception factors in unexplained infertility patients (stendinis pranešimas).* 27th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility. Paryžius, Prancūzija. 2019 m. lapkričio 21–23 d.
3. **R. Baušytė**. *Kamieninių ląstelių terapija endometriumo patologijos gydyme.* Mokslinė praktinė konferencija „Iššūkiai akušerio ginekologo praktikoje“. Kaunas, Lietuva. 2019 m. lapkričio 28 d.
4. **R. Baušytė**. *Endometriumo kamieninių ląstelių terapijos galimybės gydant vaisingumo sutrikimus.* 12-oji jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Kaunas, Lietuva. 2019 m. gruodžio 11 d.
5. **R. Baušytė.** *Stem cell therapy and implantation.* Tarptautinė mokslinė praktinė konferencija „Pagalbinis apvaisinimas: žingsniai sėkmingo nėštumo link (*angl. ART: Focus on Take Home Baby Rate*). Vilnius, Lietuva. 2021 m. birželio 10 d.

PADĖKA

Doktorantūros studijos suteikia naujų žinių ir kompetencijų, plečia akiratį, tačiau kartu tai yra daug iššūkių keliantis gyvenimo etapas, kuriame ypatingai svarbu esantys greta.

Dėkoju mokslinei vadovei prof. dr. (HP) Rūtai Navakauskienei už patikėjimą manimi, mokslinio darbo temos idėja ir suteiktą galimybę praktiškai ją įgyvendinti. Jūs visada motyvavote daryti daugiau, žvelgti plačiau bei ieškoti giliau, o visa tai lydėjo nuolatinis palaikymas ir supratingumas. Tokiu savo pavyzdžiu rodydama ugdančio vadovavimo, mokslinės veiklos įgyvendinimo, akademinės etikos laikymosi ir žmogiškųjų savybių standartų suderinimo vienovę, to siekti skatinote ir toliau skatinate mane pačią.

Dėkoju mokslinei konsultantei prof. dr. Dianai Ramašauskaitei už visokeriopą paramą ir palaikymą, lydėjusius visą doktorantūros studijų laiką. Jūsų inovatyvus ir kūrybinis mąstymas, atidumas detalėms, konstruktyvios įžvalgos skatino mane kiekviename etape siekti geriausių rezultatų, padėjo rasti reikalingus sprendimus. Išvardintas savybes apimanti, tačiau jomis neapsiribojanti Jūsų mokslinė, profesinė, vadovavimo ir asmeninė kompetencija, nuolatinis, nesvyruojantis tikėjimas bei pasitikėjimas manimi buvo ir yra asmeninė motyvacija kasdien tobulėti.

Dėkoju VU GMC Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus kolektyvui, ypač dr. Veronikai Viktorijai Borutinskaitei, doktorantei Giedrei Skliutei, jaunesniajai mokslo darbuotojai Elvinai Valatkaitei, mokslo darbuotojoms dr. Giedrei Valiulienei, dr. Aistei Zentelytei ir dr. Deimantei Žukauskaitei už nuo doktorantūros studijų pradžios užsimezgusį ir visą šį laikotarpį stiprėjusį bendradarbiavimą. Bendras darbas su jumis skirtinguose mokslinių tyrimų atlikimo ir pateikimo etapuose, jūsų profesionalumas, supratingumas ir neretai didesnė pagalba, nei tikėtasi, buvo itin vertingos ir įkvepiančios mokslinės bei asmeninės patirtys.

Dėkoju VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centro vedėjui gyd. akušeriui ginekologui Rimantui Griciui ir visam Santaros vaisingumo centro kolektyvui bei Vaisingumo technologijų ir lytinių ląstelių banko kolektyvui už pagalbą atliekant klinikines procedūras, sudarytas sąlygas derinti profesinę, mokslinę ir asmenines veiklas, o kartu – už nuolatinį skatinimą tobulėti, rūpestį, nuoširdų ir supratingą išklausymą susidūrus su iššūkiais arba apnikus abejonėms.

Dėkoju doc. dr. Editai Kazėnaitei už pagalbą suderinant doktorantūros studijų metu vykdytų mokslinių tyrimų atlikimą VUL SK ir

vėlesniu etapu visada sulauktą pagalbą bei patarimus įvairiais mokslinių tyrimų klausimais.

Dėkoju gyd. akušerei ginekologei dr. Brigitai Vaigauskaitei-Mažeikienei už draugystę ir bendradarbiavimą abiem lygiagrečiai, susijusiomis temomis vykdant doktorantūros studijas. Galėjimas kartu spręsti iškilusias problemas, diskutuoti, atlikti klinikines ir eksperimentines procedūras buvo labai svarbus ir reikalingas.

Dėkoju Valstybinio patologijos centro, VUL SK filialo, gyd. patologams – doc. dr. Justinui Besuspariui ir Rūtai Barborai Valkiūnienei už histologinių tyrimų atlikimą ir pagalbą juos interpretuojant. Bendradarbiavimas su jumis leido praplėsti doktorantūros studijų metu vykdytų mokslinių tyrimų kryptis ir papildė juos nauja informacija.

Dėkoju VU Medicinos fakulteto prof. dr. Renatai Rizgelienei už suteiktas konsultacijas medicinos srities sąvokų ir terminių klausimais. Jūsų įsigilinimas į problematiką, išsamūs, argumentuoti ir tuo pačiu greiti atsakymai buvo labai reikšminga pagalba.

Dėkoju mokslinių tyrimų dalyvėms už pasitikėjimą ir skirtą laiką dalyvauti doktorantūros studijų metu vykdytuose darbuose. Jūsų dėka šie tyrimai yra įgyvendinti, o gauti rezultatai prisideda prie mokslo plėtros.

Dėkoju mamytei ir tėveliui – nuo vaikystės jūsų skiepyta išsilavinimo svarba ir rodytas atsidavimo darbui pavyzdys skatino mokytis bei siekti geriausių rezultatų visose veiklose, o besąlyginis palaikymas ir kasdienė visokeriopa pagalba šį kelią padarė džiugesnį bei lengvesnį.

Dėkoju vyrui ir vaikams. Pripažįstu, kad pastaruosius metus jūsų gyvenimą padariau daug sudėtingesnį ir mažiau įdomų, tačiau jūs visą laiką išlikote šalia – džiuginantys, rūpestingi ir skatinantys. Labai esu dėkinga vyrui Šarūnui – už nuolatinį kantrų palaikymą ir supratingumą, sudarytas sąlygas derinti mokslinę, profesinę veiklą su šeimos gyvenimu ir kartu už buvimą pagrindiniu asmeniu, kuris rūpinasi mano pačios ir visos šeimos gyvenimo praturtinimu džiuginančiomis, ryšį kuriančiomis patirtimis bei balanso kūrimu. Mieli mano vaikučiai, Mindaugai ir Monika, jūs – mano laimė, stiprybė ir įkvėpimas visame kame. Ačiū jums, kad esate.

Dėkoju sesei Jolitai už ypatingą tarpusavio ryšį, skatinimą nebijoti naujovių, drąsiai įgyvendinti sumanymus, o iškilusius sunkumus entuziastingai įveikti, kartu – už taip reikalingą ir vertingą galimybę nuoširdžiai pasikalbėti bei šmaikščiai pažvelgti į situacijas, kai apnikdavo dvejonės arba nuovargis.

Dėkoju sūnėnui Ugniui, dukterėčioms Mėtai ir Liepai už nuoširdų domėjimąsi mano moksline ir profesine veikla, gerą nuotaiką ir džiugias akimirkas kartu.

Dėkoju vyro tėvams už palaikymą, šilumą ir rūpinimąsi anūkais – su didele meile, gera nuotaika, išradingai ir, atrodytų, niekada nepavargstant.

Dėkoju ir visiems kitiems, atskirai nepaminėtiems, tačiau padėjusiems, palaikusiems ir skatinusiems mane bet kuriame šio gyvenimo tarpsnio etape.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Asmeninė informacija

- Vardas, pavardė: Raminta Baušytė.
- Tel. nr. +370 620 86826.
- El. paštas: raminta.bausyte@gmc.vu.lt, raminta.bausyte@santa.lt, raminta.bausyte@gmail.com.

Mokslinių interesų kryptys

Vaisingumo sutrikimai, vaisingumo išsaugojimas, pagalbinio apvaisinimo technologijos, reprodukcinė medicina, kamieninių ląstelių terapija.

Išsilavinimas

- 2018 m. spalio 1 d. – 2024 m. rugsėjo 17 d. *Doktorantė.* VU GMC Biochemijos institutas, Ląstelės molekulinės biologijos skyrius. Vilnius, Lietuva.
- 2020 m. rugsėjo 2 d. – 2021 m. sausio 26 d. *Kvalifikacija, suteikianti teisę atlikti funkcijas, nurodytas 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos 23 straipsnyje.* VU GMC. Vilnius, Lietuva.
- 2016 m. lapkričio 1 d. – 2017 m. balandžio 30 d. *Kvalifikacija, suteikianti teisę teikti pagalbinio apvaisinimo ir lytinių ląstelių banko paslaugas. Schleswig-Holstein* universiteto ligoninė, Akušerijos ir ginekologijos klinika, Ginekologinės endokrinologijos ir reprodukcinės medicinos klinika. Liubekas, Vokietija.
- 2013 m. rugsėjo 1 d. – 2017 m. birželio 30 d. *Gydytojo akušerio ginekologo kvalifikacija*. VU Medicinos fakultetas, Akušerijos ir ginekologijos klinika. Vilnius, Lietuva.
- 2007 m. rugsėjo 1 d. – 2013 m. birželio 17 d. *Medicinos magistro laipsnis ir gydytojo kvalifikacija.* VU Medicinos fakultetas. Vilnius, Lietuva.

Mokslinė patirtis

- 2021 m. birželio 1 d. – 2022 m. birželio 12 d. *Jaunesnioji mokslo darbuotoja vykdant projektą „Pažangios technologijos inovatyviam nevaisingumo gydymui“ (Nr. 01.2.2-MITA-K-702-*

12-0004, 2021-2023). VU GMC Biochemijos institutas, Ląstelės molekulinės biologijos skyrius. Vilnius, Lietuva.

- 2020 m. spalio 1 d. – 2020 m. gruodžio 31 d. *Jaunesnioji mokslo darbuotoja vykdant projektą „Mezenchiminių kamieninių ląstelių egzosomų panaudojimo medikamentams atsparios depresijos gydymui įvertinimas“ (Nr. MSF-LMT-3/2020/).* VU GMC Biochemijos institutas, Ląstelės molekulinės biologijos skyrius. Vilnius, Lietuva.

Darbinė veikla

- 2017 m. rugpjūčio 1 d. – šiuo metu. *Gydytoja akušerė ginekologė.* VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centras, Santaros vaisingumo centras. Vilnius, Lietuva.
- 2013 m. rugsėjo 1 d. – 2017 m. birželio 30 d. *Gydytoja rezidentė.* VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centras, Vilniaus gimdymo namai, Nacionalinis vėžio institutas, Respublikinė Vilniaus universitetinė ligoninė. Vilnius, Lietuva.

Akademinė veikla

- 2024 m. rugsėjo 1 d. – šiuo metu. *Lektorė.* VU Medicinos fakultetas. Vilnius, Lietuva.
- 2021 m. sausio 1 d. – šiuo metu. *Lektorė.* VU Filosofijos fakultetas. Vilnius, Lietuva.

Knygos ir metodikos

- Nacionalinių metodikų bendraautorė:
  - V. Klimas, E. Drejerienė, R. Gricius, A. Amšiejienė, R. Žiobakas, **R. Baušytė**, E. Sabaitytė. *Nevaisingumo diagnostikos ir gydymo metodika.* 2019 m. https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/Nevaisingumo%20metodika%20SAM_2019-07-22.pdf;
  - **R. Baušytė**, R. Einikytė, J. Klimašenko, G. Stupelytė, I. Šiaudinytė, D. Žilovič. *Pakartotinių persileidimų metodika.* 2020 m. https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/LAGD%20Kartotini%C5%B3%20persileidim%C5%B3%20metodika%202020.pdf.
- Knygų bendraautorė:
  - Čekauskas, **R. Baušytė**, E. Urbutienė, V. Genytė, R. Gricius.

Seksualumas ir onkologija. 2018 m. https://kraujas.lt/wp-content/uploads/2019/04/Knyga_online_20190411.pdf;

- L. Andrijauskienė, **R. Baušytė**, R. Breivienė, I. Brimienė, Ž. Bumbulienė, J. Klimašenko, E. Sabaitytė, B. Vaigauskaitė-Mažeikienė, D. Žilovič. *Trikampiai ir apskritimai. Mano moteriškumo pradžia.* VU leidykla. 2023 m.

Publikacijos ir konferencijos

- 14 mokslo publikacijų leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje, pagrindinė autorė arba bendraautorė.
- 10 žodinių pranešimų nacionalinėse mokslinėse konferencijose pagrindinė autorė, bendraautorė ir pranešėja.
- 4 žodinių pranešimų tarptautinėse mokslinėse konferencijose pagrindinė autorė, bendraautorė ir pranešėja.
- 2 stendinių pranešimų tarptautinėse mokslinėse konferencijose pagrindinė autorė.

Dalyvavimas draugijose, asociacijose

- Lietuvos akušerių ginekologų draugijos valdybos narė (2022–2025 m.).
- Lietuvos akušerių ginekologų draugijos Nevaisingumo sekcijos valdybos narė (2024–2027 m.).
- Lietuvos kamieninių ląstelių tyrėjų asociacijos narė.
- Europos žmogaus reprodukcijos ir embriologijos draugijos (*angl. The European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*) narė.
- Lietuvos atstovė Europos žmogaus reprodukcijos ir embriologijos draugijos IVF stebėsenos konsorciume (*angl. The IVF Monitoring (EIM) Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*).

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.