

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Grete-Katariine Kuum

**UUDSED TRANSKRIPTOOMI MARKERID ENDOMEETRIUMI RETSEPTIIVSUSE
HINDAMISEKS**

Magistritöö molekulaar- ja rakubioloogia erialal

(30 EAP)

Juhendajad: Merli Saare, Ph.D.

prof. Ants Kurg, Ph.D.

Tartu

2017

Uudsed transkriptomii markerid endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks

Endomeetriumis toimuvad igakuised tsüklilised hormoonide poolt mõjutatud muutused, et valmistuda endomeetrium ette embrüo implantatsiooniks. Õnnestunud embrüo implantatsiooni toimumiseks on vajalik kvaliteetse embrüo ja vastuvõtliku endomeetriumi vaheline molekulaarne dialoog. Viljatusravina kasutatava kehavälise viljastamise edukuse määr on vaatamata suurtele tehnoloogilistele arengutele siiski vaid ligikaudu 30% ning umbes kahe kolmandiku ebaõnnestunud pesastumiste põhjuseks arvatakse olevat mitte-retseptiivne endomeetrium. Seetõttu on äärmiselt oluline mõista retseptiivse endomeetriumi kujunemises osalevaid molekulaarseid protsesse. Uuringute tulemustena on tuvastatud mitmeid potentsiaalseid biomarkereid endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks ning implantatsiooniakna täpseks määramiseks. Kuna siiani teostatud endomeetriumi transkriptomianalüüsid leitud markerite kattuvus on jäänud väheseks, jätkub aktiivne otsing parimate retseptiivsuse markerite leidmiseks. Antud magistritöös teostati varasemas endomeetriumi RNA sekveneerimisuringus leitud uudsete transkriptomii markerite valideerimine, et kinnitada nende sobilikkust endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks.

Märksõnad: endomeetriumi retseptiivsus, geeniekspressioon, RT-qPCR, viljatusravi

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Novel transcriptomic markers for the evaluation of endometrial receptivity

Abstract: The endometrium is a dynamic tissue that under the influence of steroid hormones goes through monthly cyclic changes to prepare for the potential implantation of the embryo. A receptive endometrium is crucial for successful implantation. Despite the advancements in assisted reproductive technologies, the success rate of IVF cycles stays relatively low and non-receptive endometrium is believed to be responsible for almost two thirds of implantation failures. Therefore, it is important to understand the processes and molecular mediators involved in achieving the receptive state of the endometrium. Although studies aimed at identifying biomarkers for the evaluation of endometrial receptivity have yielded a considerable amount of potential marker candidates, the search for best markers is ongoing. The main aim of this thesis was to validate a selection of new transcriptomic markers for evaluating endometrial receptivity.

Keywords: endometrial receptivity, gene expression, RT-qPCR, *in vitro* fertilization

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Viljatus.....	7
1.1.1 Viljatuse ravi	8
1.2 Menstruaaltsükkel.....	9
1.3 Menstruaaltsükli jooksul endomeetriumis toimuvad muutused	11
1.4 Endomeetriumi retseptiivsuse hindamine	14
1.4.1 Endomeetriumi retseptiivsuse histoloogiline hindamine.....	14
1.4.2 Endomeetriumi retseptiivsuse ultrasonograafiline hindamine	15
1.4.3 Endomeetriumi retseptiivsuse markerid verest ja uriinist	15
1.4.4 Emakaõõne aspiraati retseptiivsusega seotud markerite tuvastamiseks	16
1.4.5 Endomeetriumi retseptiivsuse molekulaarsed markerid.....	16
1.5 Transkriptoomi uuringud	18
1.5.1 Endomeetriumi retseptiivsuse test.....	21
EKSPERIMENTAALNE OSA	23
2.1 Töö eesmärgid	23
2.2 Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud rakutüübi-spetsiifiliste geenide sekveneerimine FACS eraldatud endomeetriumi CD9+ epiteeli ja CD13+ strooma rakkudes.....	23
2.2.2 Valimi kirjeldus ja proovide kogumine	25
2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	26
2.2.4 Kvantitatiivne reaal-aja PCR (RT-qPCR)	26
2.2.5 Immunohistokeemia	28
2.2.6 Statistiline andmeanalüüs	28
2.3 Tulemused	29
2.3.1 Referentsgeenide valik endomeetriumi retseptiivsuse uuringutes	29

2.3.2 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geenide valideerimine endomeetriumi täiskoest	30
2.3.3 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud rakutüübi-spetsiifiliste geenide valideerimine FACS eraldatud endomeetriumi CD9+ epiteeli ja CD13+ strooma rakkudes	32
2.3.4 Immunohistokeemia	33
2.4 Arutelu	34
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED	41
KASUTATUD KIRJANDUS	42
KASUTATUD VEEBILEHED	53
Lisa 1. Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geeniekspressiooni uuringud.....	54
Lisa 2. Lihtlitsents	55

KASUTATUD LÜHENDID

ART	abistatud reproduktiivtehnoloogia (<i>assisted reproductive technology</i>)
CAM	raku adhesiooni molekul (<i>cell adhesion molecule</i>)
cDNA	komplementaarne DNA (<i>complementary DNA</i>)
E2	östradiool (<i>estradiol</i>)
ERA	endomeetriumi retseptiivsuse kiip (<i>endometrial receptivity array</i>)
ET	embrüo siirdamine (<i>embryo transfer</i>)
FACS	fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon (<i>follicle-stimulating hormone</i>)
GnRH	gonadotropiini vabastav hormoon (<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
ICSI	seemneraku intratsütoplasmaatiline süstimine (<i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IHC	immunohistokeemia (<i>immunohistochemistry</i>)
IL-1	interleukiin 1 (<i>interleukin 1</i>)
IL-6	interleukiin 6 (<i>interleukin 6</i>)
IUI	emakasisene viljastamine (<i>intrauterine insemination</i>)
IVF	kehaväline viljastamine (<i>in vitro fertilization</i>)
KMI	kehamassiindeks (<i>body mass index</i>)
LIF	leukeemiat inhibeeriv faktor (<i>leukaemia inhibitory factor</i>)
LH	luteiniseeriv hormoon (<i>luteinizing hormone</i>)
P4	progesteron (<i>progesterone</i>)
PCOS	polütsüstiliste munasarjade sündroom (<i>polycystic ovarian syndrome</i>)
POF	enneaegne ovariaalpuudulikkus (<i>premature ovarian failure</i>)
RT-qPCR	kvantitatiivne reaal-aja polümeraasi ahelreaktsioon (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
WOI	implantatsiooniaken (<i>window of implantation</i>)

SISSEJUHATUS

Edukaks viljatusraviks on vaja vastuvõtlikku endomeetriumi ning seetõttu on oluline leida biomarkereid, mille abil saaks hinnata emaka limaskestast valmistatud embrüo implantatsiooniks. Vaatamata kehavälise viljastamise tehnoloogiate arengule on viljatusravi tulemuslikkus vaid umbes 30%. Kuigi IVF (*in vitro fertilization*- kehavälise viljastamine) tsüklite käigus siirdatavad embrüod on hea kvaliteediga, ei õnnestu suurel hulgal naistel isegi pärast korduva protseduuri rasestuda, mis võib viidata potentsiaalsetele probleemidele endomeetriumi vastuvõtlikkusega.

Et embrüo pesastumine oleks võimalik, areneb endomeetrium hormoonide toimele tsükliliselt ning muutub selle käigus embrüole vastuvõtlikuks. Lühikest perioodi menstruaaltsükli sekretoorses faasis, mil endomeetrium on kõige vastuvõtlikum embrüo pesastumiseks, nimetatakse implantatsiooniaknaks. Puudulik endomeetriumi vastuvõtlikkus ehk endomeetriumi retseptiivsus põhjustab umbes kaks kolmandikku implantatsiooni ebaõnnestumistest. Seega on viljatusravi edukuse seisukohalt oluline mõista retseptiivse endomeetriumi kujunemist ning teada selles protsessis osalevaid molekulaarseid markereid, mis võimaldaksid endomeetriumi vastuvõtlikkust võimalikult täpselt hinnata.

Kuigi endomeetriumi proovide histoloogiline hindamine on olnud pikka aega kliinilises praktikas endomeetriumi retseptiivuse tuvastamise standardiks, on viimasel aastakümnel kasutusele võetud analüüsimeetodid seadnud kahtluse alla selle meetodi ennustatavuse. Transkriptoomiuuringute tulemusena on leitud mitmeid potentsiaalseid endomeetriumi retseptiivuse biomarkereid ning välja on toodud suur hulk geene, mille aktiivsuse muutust võib täheldada just implantatsiooniakna ajal. Kahjuks on erinevate teostatud uuringute kattuvus siiani võrdlemisi väike ning otsingud parimate endomeetriumi retseptiivuse biomarkerite leidmiseks jätkuvad.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on valideerida endomeetriumi retseptiivusega seotud geene, mis valiti välja endomeetriumi-spetsiifiliste rakupopulatsioonide RNA sekveneerimise töö tulemustest (M. Koel, avaldamata andmed).

Uurimustöö viidi läbi TAK (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus) AS-s.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Viljatus

Pere loomine ning järglaste saamine on ühiskonnas olulisel kohal ning sooviks enamusele täiskasvanuikka jõudnud indiviididele. Kahjuks ei ole aga kõik järglasi soovivad paarid suutelised iseseisvalt rasedust saavutama ning vajavad selleks meditsiinilist abi. Viljatus on laialt levinud probleem ja mõjutab ülemaailmselt hinnanguliselt umbes 15% paaridest. Eestis arvatakse olevat ligikaudu 20 000 viljatut paari. Viljatuseks peetakse olukorda, kus paaril ei õnnestu regulaarse suguelu korral ning sealjuures kontratseptiooni vahendeid kasutamata 12 kuu jooksul rasestuda. Viljatus põhjustab emotsionaalset ning psühholoogilist muret nii naistel kui meestel ning on oluline probleem nii perekonna kui ühiskonna tasandil (Mascarenhas jt. 2012; Ombelet jt. 2008; Tonsiver jt. 2013).

Viljatuse saab jagada kaheks, eristatakse primaarset ehk esmast viljatust ja sekundaarset ehk teisest viljatust. Primaarse viljatusega on tegu siis, kui naine ei ole suuteline rasestuma või rasedust lõpuni kandma. Sekundaarse viljatuse korral ei ole naine võimeline pärast eelnevat rasedust ja elussünnitust enam järglasi saama (Mascarenhas jt. 2012).

Umbes 30% juhtudel on paari lastetus tingitud naise viljatusest ning 30% juhtudel peituvad viljatuse põhjused mehes. Ülejäänud juhtudel on viljatuse põhjused mõlemapoolsed või jäävad need ebaselgeks (Ombelet jt. 2008). Ligikaudu 30%-l viljatutest paaridest diagnoositakse seletamatu ehk idiopaatiline viljatus, mille korral puudub selge põhjus, miks naine ei rasestu (Gelbaya jt. 2014).

Sagedasemaks naisepoolse viljatuse põhjustajaks on ovulatsioonihäired (u. 40%), mille tulemusena munarakk ei küpse või ei vabane munasarjast. Ovulatsioonihäired võivad olla põhjustatud vanusest ja kahanevast munarakkude arvust, hormonaalsetest häiretest, polütsüstiliste munasarjade sündroomist (PCOS) või enneaegsest ovariaalpuudulikkusest (POF). Üheks oluliseks naiste viljakuse langemise põhjuseks on lastesaamise edasilükkamine vanemasse ikka, kui suur osa terveid munarakke on hukkunud ning allesjäänute kvaliteet langenud (Silber & Barbey, 2012). Umbes 25% naistest ei ole 30-ndate eluaastate keskpaigaks enam võimelised vanusest tingitud ootsüütide arvu languse tõttu järglasi saama. Kui varases reproduktiiveas on naise tõenäosus viljatusele 0,2%, siis 35. eluaastaks võib see tõusta isegi üle 20% (Silber & Barbey, 2012). Olulist rolli viljatuse kujunemisel mängivad ka emaka limaskesta anomaaliad ja kahjustatud või blokeeritud munajuhad, mis takistavad sugurakkude ühinemist

(u. 30%). Umbes 15% juhtudel tingib viljatuse endometrioos, mille korral emakast väljaspool kasvav endomeetriumi-laadne kude põhjustab kõhuõõnes põletikulisi protsesse, mille tagajärjel tekkinud liited kahjustavad reproduktiivorganeid (Jose-Miller jt. 2007).

Mehepoolse viljatuse põhjustajateks on mitmed nii elu jooksul omandatud ja põetud (infektsioonid, põletikud) kui ka juba kaasasündinud haigused. Umbes 30% viljatuse juhtudest on tingitud geneetilistest defektidest. Mehe reproduktiivtervisele on negatiivne mõju ka keskkonnateguritel ja elustiilil, mille hulka kuuluvad rohke alkoholi tarbimine, suitsetamine, stress ning muud ebatervislikud harjumused (Jose-Miller jt. 2007; Li jt. 2011). Umbes kahel kolmandikul viljatutest meestest on probleeme spermatooside tootmisega – seemnerakke on vähe või need ei ole funktsionaalsed (Jungwirth jt. 2012). Haiguste või muude tegurite tulemusena võib langeda seemnerakkude arv ja kvaliteet, mis võib omakorda väljenduda spermatooside piiratud liikumisvõimes või ebafunktsionaalses kujus. Samuti kahandavad muutused seemnerakkude DNA-s nende viljastamispotentsiaali. Suur osa mehe viljatuse põhjuseid jääb siiski ka veel ebaselgeks (Jose-Miller jt. 2007; Ombelet jt. 2008; Tonsiver jt. 2013).

1.1.1 Viljatuse ravi

Viljatuse hindamist alustatakse üldjuhul 12 kuud pärast raseduse mittesaavutamist kaitsmata vahekorra puhul (Practice Committee of the ASRM, 2006). Viljakusuuringuid alustatakse ka varem, kui last sooviv naine on vanem kui 35 eluaastat ja tema loomulik viljakus on juba tunduvalt langenud, või naisel esinevad varasemad teadaolevad terviseprobleemid, mis võivad viidata viljatusele (Pal & Santoro, 2003; Ylikorkkala jt. 2008). Viljakusuuringutel hinnatakse partnereid nii koos kui eraldi, et saada ülevaade mõlema partneri üldisest tervislikust seisundist ja seksuaalkäitumisest, mis võivad viljastumise edukust mõjutada. Individuaalsete uuringute käigus võetakse arvesse varasemalt teostatud kirurgilisi protseduure, meditsiinilist ajalugu, sealhulgas juba esinevaid ja läbipõetud haigusi ning ka sugulisel teel levivaid haigusi ja võimalike geneetilisi defekte. Ühtlasi pööratakse tähelepanu eelnevale viljatusele, ravimikasutusele ning kahjulikele harjumustele nagu alkoholi tarbimine, suitsetamine ja vale toitumine, millest tingitud ala- või ülekaal võivad samuti viljakust mõjutada (Practice Committee of the ASRM, 2006; Ylikorkkala jt. 2008).

Viljatuse ravis kasutatakse abistava reproduktsiooni meetodeid (ART), mille hulka kuuluvad emakasisene viljastamine (*intrauterine insemination* – IUI), kehaväline viljastamine (*in vitro*

fertilisation – IVF) ja seemneraku intratsütoplasmaatiline süstimine (*intracytoplasmic sperm injection* – ICSI). IVF'i käigus toimub munaraku viljastamine *in vitro* ehk väljaspool naise organismi ning selle tulemusel saadud embrüo siiratakse emakasse (Tonsiver jt. 2013). IVF, mis töötati algselt välja blokeeritud munajuhade raviks, on nüüdseks kasutusel olnud ligikaudu 40 aastat. Kuigi viimase dekaadi jooksul on *in vitro* viljastamine tänu paljude uute kliinikute loomisele muutunud maailmas oluliselt kättesaadavamaks, on viljatus siiski kestav globaalne probleem ja seda eriti madala toimetulekuga naistele (Inhorn & Patrizio, 2015). Kahjuks on kõrgeima viljatusmääraga maailma piirkonnad tihti ka kõige vaesemad ja seega jääb viljatusravi paljudele lastetutele paaridele kättesaamatuks. Kui ülemaailmseks lastetuse määraks loetakse keskmiselt 15%, siis osades maailma paikades võib see number ulatuda isegi 30%-ni (Inhorn & Patrizio, 2015; Ombelet jt. 2008).

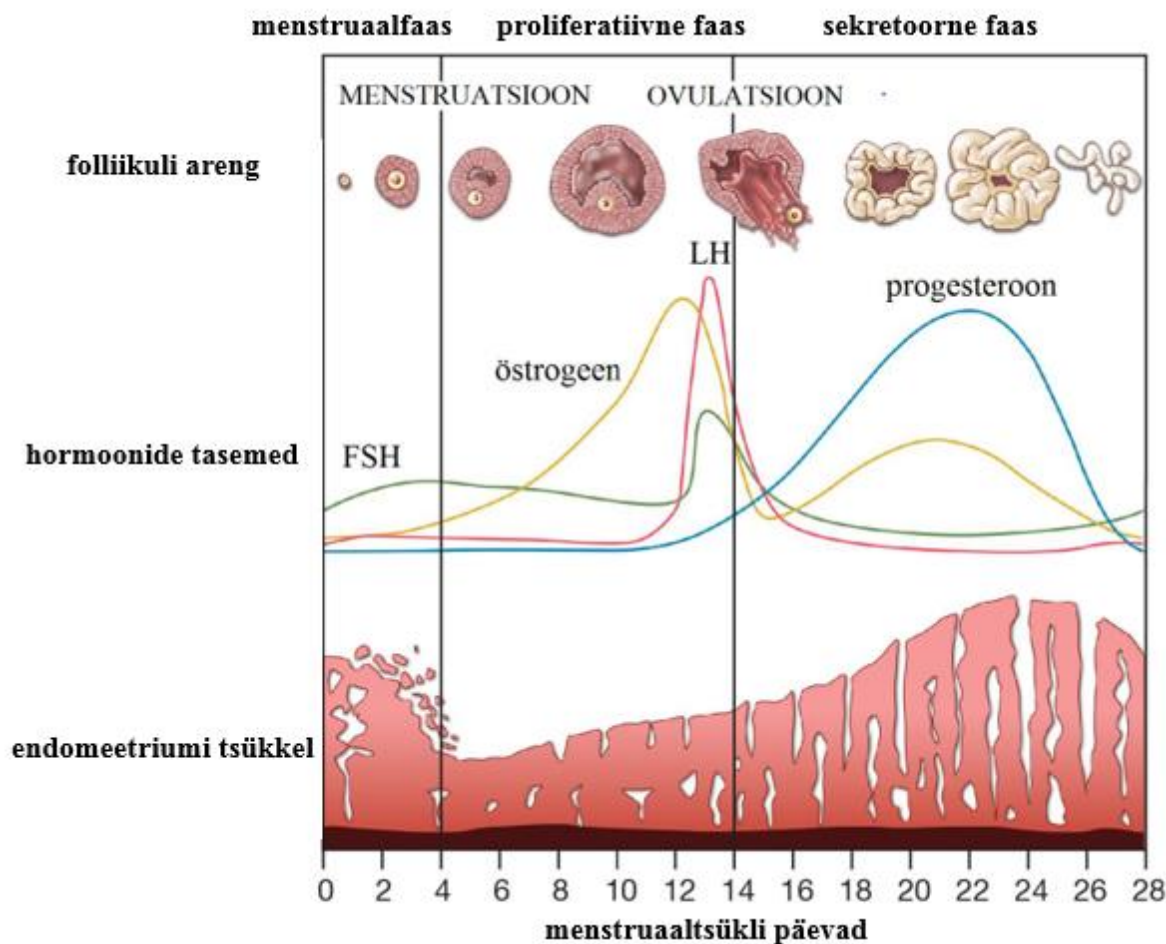
Kuigi IVF on maailmas küllaltki laialt levinud ning viljatuse ravi tulemuslikkus on aastate jooksul paranenud, õnnestub siiski vaid umbes 30% IVF-protseduuridest. Viljatuse ravi meetodite edukuse määr sõltub mitmetest erinevatest faktoritest. Kõige olulisemaks neist võib pidada naise vanust ning sellest tingitud loomulikku viljakuse langust, vastust hormonaalsele stimulatsioonile, embrüo kvaliteeti, häireid embrüo implantatsioonis ning emaka patoloogiaid (Ferraretti jt. 2013). Paaridel, kellel vaatamata korduvale IVF/ICSI protseduurile ja kvaliteetse embrüo siirdamisele rasedus siiski ei õnnestu, võib probleem peituda endomeetriumis ja selle võimetuses embrüot vastu võtta. Kuigi implantatsiooni ebaõnnestumise põhjused on mitmesugused ning need võivad olla põhjustatud nii embrüo defektidest, hormonaalsetest või metaboolsetest haigustest, infektsioonidest, immunoloogilistest faktoritest kui ka endomeetriumi retseptiivsuse häiretest, arvatakse, et 2/3 embrüo pesastumise probleemide taga on endomeetriumi retseptiivsuse häired või endomeetriumi ja embrüo vahelised vigased interaktsioonid (Lédée-Bataille jt. 2002; Timeva jt. 2014).

1.2 Menstruaaltsükkel

Viljakas eas naistel toimuvad kehas igakuised hormoonide poolt reguleeritud muutused, mida kutsutakse menstruaaltsükliks ja mis on vajalikud munarakkude valmimiseks ning raseduseks ettevalmistumiseks (Jones & Lopez, 2013). Tsüklilised hormonaalsed muutused algavad naisel puberteedia saabudes ning toimuvad menopausi saabumiseni (Tamm jt. 2012). Naise viljaka ea saabudes hakatakse hüpotalamuses toodetud gonadotropiini vabastava hormooni (GnRH-*Gonadotropin-releasing hormone*) eritumise tagajärjel tootma ajuripatsis folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH, *follicle-stimulating hormone*) ja luteiniseerivat hormooni (LH,

luteinizing hormone). FSH ja LH seonduvad retseptoritega munasarjas ning stimuleerivad seal omakorda östradioli (*E2-estradiol*) ja progesterooni (*P4-progesterone*) tootmist, mis omakorda reguleerivad endomeetriumi küpsemist. Keskmiselt kestab menstruaaltsükkel 28 päeva ning endomeetriumis toimuvate muutuste alusel saab selle jagada kolmeks faasiks: proliferatiivseks faasiks, sekretoorseks faasiks ja menstruaalfaasiks (Jabbour jt. 2006; Ruiz-Alonso jt. 2012). Menstruaaltsükli esimene päev vastab menstruaalfaasi esimesele päevale, mille jooksul toimub limaskesta irdumine (Joonis 1) (Speroff jt. 1999).

Proliferatiivne faas kestab keskel läbi 14 päeva ehk ovulatsiooni toimumiseni. Ovulatsiooni ehk munaraku folliikulist vabanemise aeg jääb tsükli keskele. Vastupidiselt FSH'le, mis saavutab kõrgeima taseme varases proliferatiivses faasis ning langeb ühtlaselt ovulatsiooni toimumiseni, tõuseb LH kontsentratsioon alates proliferatiivse faasi keskpaigast östrogeeni tõusva taseme poolt saadud positiivse tagasiside tõttu ning saavutab maksimumi enne munaraku vabanemist folliikulist (Pauerstein jt. 1978; Reed & Carr, 2000; Simmen & Simmen, 2006). Menstruaaltsükli teises pooles sekretoorses faasis *corpus luteum*'i ehk kollaskeha poolt toodetud progesterooni kontsentratsiooni tõusu tulemusena valmistub emaka limaskest ette potentsiaalseks embrüo implantatsiooniks, mille mittetoimumise korral algab progesterooni ja östrogeeni tasemete järsu languse tõttu endomeetriumi funktsionaalkihi irdumine ehk menstruatsioon, mille lõppedes algab endomeetriumi koe regeneratsioon (Jabbour jt. 2006; Jones & Lopez, 2013)

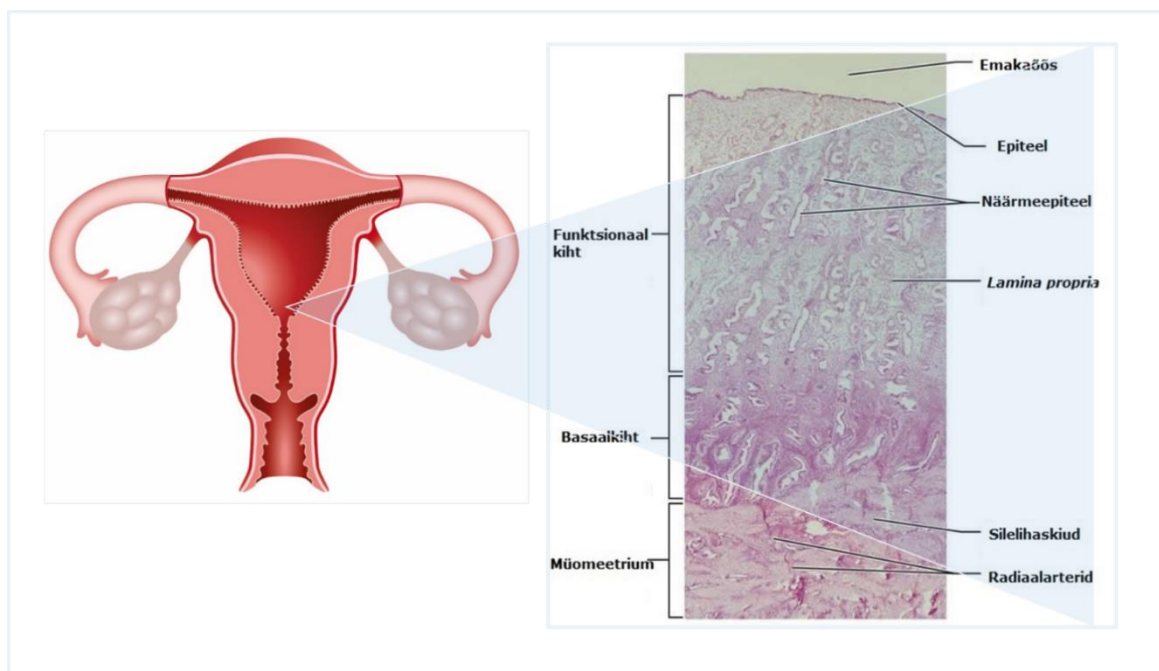


Joonis 1. Menstruaaltsükli iseloomustus ja selle hormonaalne regulatsioon. Joonisel on näha endomeetriumis ja munasarjas paralleelselt toimuvad muutused ning hormoonide tasemete kõikumised menstruaaltsükli jooksul. (Encyclopædia Britannica, 2013, kohandatud).

1.3 Menstruaaltsükli jooksul endomeetriumis toimuvad muutused

Emaka limaskest ehk endomeetrium on emakaõõne sisepinda kattev limaskest, mis jaguneb funktsionaal- ehk pindmiseks kihiks ja basaal- ehk süvakihiks. Funktsionaalkiht võtab enda alla kaks kolmandikku endomeetriumi paksusest ning koosneb ühekihilisest luminaar- ehk pinnaepiteelist ning selle all paiknevast sidekoest-stroomast, mille paksus hormoonide mõjutusel varieerub. Lisaks luminaarsele epiteelile, mis katab endomeetriumi ülemist pinda, esineb endomeetriumis ka näärmeline epiteel. Endomeetriumi basaalkihi alla jääb emaka lihaskiht ehk müomeetrium, mis koosneb ristuvatest silelihaskiududest ning arvukatest veresoontest. Tubulaarsed näärmed on ühtlaselt paigutatud ning ulatuvad endomeetriumi pinnast selle all paiknevasse stroomasse, kus leiduvad ka spiraalarterid (Joonis 2) (Beier & Beier-Hellwig, 1998; Evans jt. 2012; Ruiz-Alonso jt. 2012). Basaalkihist lähtub endomeetriumi regeneratsioon ehk taastumine pärast limaskesta irdumist ehk menstruaaltsiooni.

Funktsionaalkiht on hormoontundlik ja allub igakuistele tsüklilistele muutustele, mis on vajalikud emaka valmistumiseks raseduseks (Evans jt. 2012; Spencer jt. 2005).

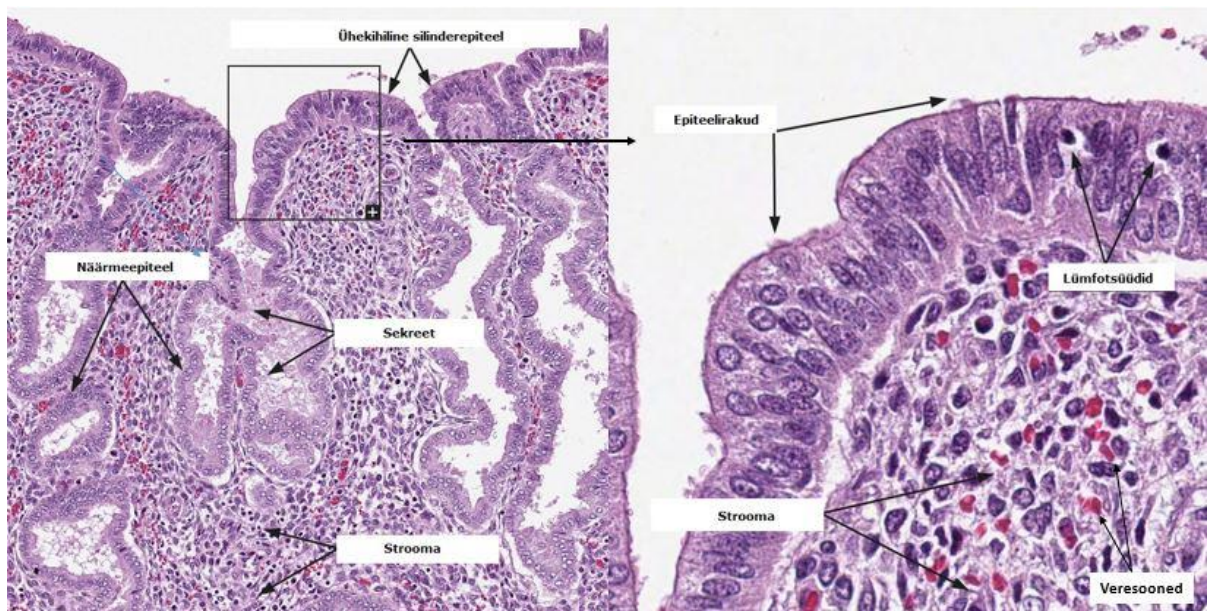


Joonis 2. Endomeetriumi koe lõik. Joonisel on kujutatud endomeetriumi ehk emakalimaskest koe histoloogiline lõik ning selles esinevad struktuurid (Marieb & Hoehn, 2010, kohandatud).

Menstruaaltsükli jooksul toimuvad endomeetriumi koes ulatuslikud morfoloogilised muutused, mida kirjeldatakse endomeetriumi proliferatiivse-, sekretoorse- ja menstruaalfaasiga. Proliferatiivse faasi võib jagada tinglikult 3 etappi: varane, keskmine ja hiline (Mazur & Kurman, 2005). Varases proliferatiivses faasis, päevadel 4-7, on endomeetriumi pinnaepiteel õhuke, strooma kompaktne, näärmed lühikesed ja sirged, kujult ühetaolised ja regulaarselt paiknevad ning rakkude mitootiline aktiivsus on minimaalne. Faasi keskel hakkavad näärmed pikinema, omandavad proliferatiivse faasi lõpuks mitootilise aktiivsuse ning muutuvad östrogeeni kontsentratsiooni tõusust tingitud epiteeli proliferatsiooni tagajärjel väänlevateks. Kui proliferatiivse faasi alguses on emaka limaskest vaid 0,5 mm paksune, siis faasi lõpuks on see kasvanud umbes 4-5 mm paksuseks. Varajases sekretoorses faasiks võib näha epiteelil lainjat kuju, strooma tiheneb ning kuni pooltel näärmetel on tekkinud subnukleaarsed vakuolid, mille esinemine üle 50% näärmetel on märk ovulatsiooni toimumisest (Fadare & Zheng, 2005; Mazur & Kurman, 2005; Murray jt. 2004).

Aega ovulatsiooni ja menstruaatsiooni vahel nimetatakse sekretoorseks faasiks, mille algust iseloomustab kiire tõus progesterooni kontsentratsioonis (Ruiz-Alonso jt. 2012). Umbes 36

tundi pärast ovulatsiooni toimumist algab endomeetriumi morfoloogiline üleminek hilisest proliferatiivsest faasist sekretoorsesse faasi. Näärmetel tekib 16-28 tsüklipäevadel sekretoorne aktiivsus, menstruaaltsükli 17-18 päevaks on endomeetriumi epiteelis tekkinud luminaalsed vakuolid ning tuumad paiknevad rakus basaalselt (joonis 3). Intraluminaalne sekretsioon ja strooma turse saavutavad maksimumi umbes 22. päevaks, mis on ka parim aeg embrüo implantatsiooniks (Mazur & Kurman, 2005; Noyes jt. 1950). Sekretorse faasi keskpaigaks on endomeetriumis näha paksenenud seintega spiraalarterid ja väänlevatel näärmetel tekkinud sakilised luminaalservad. Pinnaepiteeli all paiknevad näärmed jäävad väikeseks ja tubulaarseks kogu sekretoorse faasi vältel. Premenstruaalne endomeetrium on 27. päevaks plaatjate moodustistena, näärmed on kokkukeerdunud ja sakiliste servadega ning avaldavad esimesi märke apoptoosist. Menstruaalfaasi endomeetriumi näärmete ja strooma lagunemine mõjutab kiirelt tervet funktsionaalkihti ning faasi lõpus algab nekroos (Fadare & Zheng, 2005; Mazur & Kurman, 2005; Murray jt. 2004; Ruiz-Alonso jt. 2012). Raseduse puudumisel viib järsk hormoonide, eriti progesterooni taseme langus endomeetriumi funktsionaalkihi irdumisele, mille tulemusena algab menstruatsioon, kus peamisteks protsessideks on apoptoos ning koe lagunemine (Hawkins & Matzuk, 2008; Ruiz-Alonso jt. 2012).



Joonis 3. Endomeetriumi koe histoloogiline lõik, hematoüksüliin-eesiin värving. Joonisel on näha sekretorse faasi endomeetrium, näärmed on muutunud väänlevaks, näärmeepiteelis on tekkinud vakuolid ning näha on arvukad veresooned. (www.proteinatlas.org järgi, kohandatud).

1.4 Endomeetriumi retseptiivsuse hindamine

Viljatusravi edukusel on oluline roll vastuvõtlikul endomeetriumil ning seetõttu on oluline leida erinevaid biomarkereid, mille abil saaks hinnata endomeetriumi valmisolekut embrüo implantatsiooniks. Et embrüo implantatsioon oleks võimalik, läbib endomeetrium tsüklilised morfoloogilised ja hormonaalsed muutused, ja muutub embrüo implanatsiooniks vastuvõtlikuks 6–10 päeva pärast ovulatsiooni ja 7–11 päeva pärast luteiniseeriva hormooni (LH) eritumise maksimumi, menstruaaltsükli 20.–24. päeval (Achache & Revel, 2006). Seda lühikest ajaliselt piiritletud perioodi nimetatakse implantatsiooni aknaks (*window of implantation* - WOI) (Ruiz-Alonso jt. 2012). Kuigi enamusel regulaarse menstruaaltsükliga naistest algab WOI 20. päeval ja kestab 4-5 päeva, võib väikesel protsendil naistest esineda implantatsioon ka 6-12 päeva pärast LH maksimumi (Martín jt. 2002). Uuringud on näidanud, et embrüotel, mis pesastuvad 22.-24. menstruaaltsükli päeval, on umbes 84% tõenäosus eduka raseduse jätkamiseks. Samal ajal embrüod, mis kinnituvad 11. tsükli päeval, jäävad püsima vaid 18% juhtudest (Lopata jt. 1982). Seega, parem arusaamine endomeetriumi retseptiivsuse ja embrüo implantatsiooni mehhanismidest aitab parandada viljatusravi edukust, hoida ära varast raseduse katkemist ning töötada välja ka näiteks uusi rasestumisvastaseid vahendeid. Uued teadmised on olulised just selliste kriitiliste etappide jaoks, mis raseduse edukust kõige rohkem mõjutada võivad ning mis on ka IVF'i puhul kitsaskohtadeks (Edgell jt. 2013).

Endomeetriumi valmisolekut embrüo implantatsiooniks on võimalik hinnata erinevate meetodite abil nagu endomeetriumi koe histoloogiline hindamine, endomeetriumi ultrasonograafia ja hormoonide määramine vere/uriini analüüsides. Klassikalistele endomeetriumi retseptiivsuse hindamise meetoditele on lisandunud ka endomeetriumi molekulaarsed uuringud (Joonis 4.) (Edgell jt. 2013; Haouzi jt. 2012; Ruiz-Alonso jt. 2012; Mahajan, 2015). Järgnevalt kirjeldatakse erinevaid meetodeid lähemalt.

1.4.1 Endomeetriumi retseptiivsuse histoloogiline hindamine

Eelpool nimetatud meetoditest vanim on juba üle 50 aasta tagasi Noyes'i ja kolleegide poolt välja pakutud endomeetriumi histoloogiline hindamine, kus dateerimise aluseks on endomeetriumi morfoloogilised muutused menstruaaltsükli jooksul ja mida kasutatakse siiani kliinilises diagnostikas (Noyes jt. 1950). Siiski, vaid morfoloogilistel muutustel põhineva süsteemi õigsus ja asjakohasus endomeetriumi retseptiivsuse ennustamiseks on mitmetes viimasel ajal läbiviidud uuringutes kahtluse alla seatud (Edgell jt. 2013; Horcajadas jt. 2006).

Kuna endomeetriumi on dünaamiline kude, kus nii molekulaarne kui rakuline koostis muutuvad menstruaaltsükli päevade lõikes kiiresti, on endomeetriumi retseptiivsuse ajaline dateerimine, kasutades vaid histoloogilist meetodit, keeruline. Võib öelda, et klassikaline histoloogiline meetod on subjektiivne retseptiivsuse hindamise meetod, kus tulemused vaatelehtide ning menstruaaltsükli individuaalsetest erinevustest tingitult varieeruvad (Edgell jt. 2013; Murray jt. 2004). Lisaks histoloogilisele vaatlusele, määrab originaalne Noyes'i meetod ovulatsiooni päeva keha basaaltemperatuuri muutuse põhjal, mis hilisemate uuringute järgi on tõene vaid 77% patsientidest ning oleks täpsemini saavutatav näiteks LH eritumise mõõtmisega (Achache & Revel, 2006; Noyes jt. 1950). Noyes'i endomeetriumi histoloogilise dateerimise ebapiisava täpsuse tõttu tuleks viljatu paari ravil kliiniliselt olulise informatsiooni ja usaldusväärsete diagnostiliste markerite tuvastamise seisukohalt asendada endomeetriumi histoloogiline uuring endomeetriumi retseptiivsuse molekulaarsete või transkriptoomipõhiste uuringutega (Murray jt. 2004).

1.4.2 Endomeetriumi retseptiivsuse ultrasonograafiline hindamine

Ultrasonograafia on mitte-invasiivne ja reproduktiivmeditsiinis rutiinselt kasutatud meetod endomeetriumi struktuuri ja potentsiaalsete kõrvalekallete analüüsimiseks (Abdallah jt. 2012). Ultraheliuuringutel on oluline roll IVF'i ja viljatusravi läbiviimisel, aidates tuvastada viljatusega seotud probleeme limaskestast seisundi, folliikulite arengu ja ovulatsiooni hindamisega (Child jt. 2003).

Menstruaaltsükli esimeses pooles, proliferatiivses faasis, on endomeetriumi paksus 4-8 mm ning mis kasvab sekretoorses faasis kuni 14 mm paksuseks (Sadro, 2016). Eduka embrüo implantatsiooni seisukohalt peaks endomeetriumi paksus olema 8-13 mm. Limaskestast paksus alla 6 mm ning üle 15 mm võib oluliselt vähendada eduka rasestumise võimalust (Abdallah jt. 2012; Kasius jt. 2014). Kuigi normaalne endomeetriumi paksus ei tähenda tingimata rasestumise õnnestumist, seostatakse õhukest endomeetriomit, mille paksus jääb alla 7 mm, oluliselt madalama embrüo pesastumise määraga (Abdallah jt. 2012; Hershko-Klement & Tepper, 2016).

1.4.3 Endomeetriumi retseptiivsuse markerid verest ja uriinist

Verevõtmine on lihtne ja minimaalselt invasiivne meetod ning võimaldab määrata veres, plasmas või seerumis sisalduvaid biomarkereid, mille abil on võimalik tuvastada

endomeetriumi retseptiivsust. Ka odavalt ja kergelt kogutav uriin on heaks allikaks emaka limaskestast seisundit peegeldavate markerite, nagu valkude, peptiide, hormoonide ja kasvufaktorite kindlaks tegemiseks (Fassbender jt. 2015). Nii veres kui uriinis on võimalik mõõta menstruaaltsükli toimumiseks oluliste hormoonide tasemeid, mille abil ennustada ovulatsiooni toimumist või embrüo pesastumiseks sobilikku aega. Siiski ei ole mitmed väljapakutud endomeetriumi retseptiivsuse markerid ainult emaka-spetsiifilised, seega on raskendatud nende seerumis sisalduva kontsentratsiooni järgi eduka implantatsiooni ennustamine ning kuigi veri ja uriin on kergelt ja odavalt kättesaadavad ja analüüsitavad, ei ole need meetodid üksinda piisavalt täpsed endomeetriumi seisundi määramiseks (Aghajanova jt. 2008; Edgell jt. 2013; Fassbender jt. 2015).

1.4.4 Emakaõõne aspiraati retseptiivsusega seotud markerite tuvastamiseks

Biomarkerite tuvastamine bioloogilistest vedelikest, sealhulgas emakaõõne aspiraadist, on üks võimalik alternatiiv invasiivsete meetodite kasutamisele endomeetriumi vastuvõtlikuse uurimiseks. Kerge protseduuriga kogutavast emakaõõne vedelikust on võimalik saada olulist teavet endomeetriumi poolt sekreteeritud valkudest ning valgulise koostise muutumisest menstruaaltsükli vältel, seejuures ei mõjuta emakaõõnest proovi võtmine rasedumise võimalust samas tsüklis, mis teeb meetodi ohutuks retseptiivsuse hindamise viisiks IVF tsüklites (van der Gaast jt. 2003; von Grothusen jt. 2014). Massispektromeetria ja tuumamagnetresonants-spektroskoopia areng on teinud võimalikuks väga täpse lipiidide detektsiooni ning näidanud prostaglandiinide, eriti E2 ja F2 α , rohket esinemist implantatsiooniakna ajal ning seega nende olulisust vastuvõtliku endomeetriumi biomarkeritena (Vilella jt. 2013).

1.4.5 Endomeetriumi retseptiivsuse molekulaarsed markerid

Kuna endomeetriumi koes toimuvad menstruaaltsükli jooksul märkimisväärsed füsioloogilised ja bioloogilised muutused, siis on loogiline oletada, et ulatuslikud muutused toimuvad ka endomeetriumi koe molekulaarses regulatsioonis. Kuigi endomeetriumi biopsia võtmine on mõõdukalt invasiivne protseduur, aitab endomeetriumi koe uurimine kõige paremini mõista protsesse, mis on seotud retseptiivsuse kujunemise ja embrüo implantatsiooniga. Uurides laiemalt endomeetriumi molekulaarset profiili, saame oluliselt parandada oma arusaamist endomeetriumi normaalsest funktsioonist ning anda parema ülevaate protsessidest, mis toimuvad retseptiivses endomeetriumis. Samuti võimaldab menstruaaltsükli erinevate faaside

klassifitseerimine geeniekspressioonimustri põhjal saada parema ülevaate endomeetriumis toimuvatest funktsionaalsetest muutustest ning tuvastada kõrvalekaldeid, mis ei oleks leitavad uurides endomeetriumi kude histoloogiliselt (Lessey, 2000; Ponnampalam jt. 2004).

Kõige rohkem on molekulaarsed uuringud pööranud tähelepanu sekretoorse faasi uurimisele, sest just selle perioodi vältel toimuvad endomeetriumis ulatuslikud füsioloogilise muutused, mille tagajärjel muutub endomeetrium retseptiivseks ehk on valmis blastotsüsti implanteerumiseks (Ruiz-Alonso jt. 2012). Kuigi endomeetriumi pideva muutlikkuse ja menstruaaltsükli faaside sujuva ülemineku tõttu ühest faasist teise on implantatsiooniakna molekulaarset definitsiooni keeruline määratleda, on ülegenoomsete meetodite abiga tuvastatud viimasel aastakümnel mitmeid potentsiaalseid endomeetriumi vastuvõtlikkusega seotud biomarkereid, mis on selgelt eel-retseptiivse ja retseptiivse faasi või viljakate ja viljatute naiste proovide vahel erinevad (Edgell jt. 2013)

Mitmete uuringute tulemusena on tehtud kindlaks, et implantatsiooniakent iseloomustab kindel geeniekspressiooniprofiil ning mitmete molekulide tasemed muutuvad just WOI vältel, olles seega seotud endomeetriumi retseptiivsusega ning embrüo pesastumisega (Kao jt. 2002; Paria jt. 2000). Selleks, et endomeetrium muutuks retseptiivseks ja oleks valmis embrüo implantatsiooniks, toimuvad endomeetriumis ulatuslikud molekulaarsed ümberkorraldused ning võrreldes eel-retseptiivse faasiga on paljud geenid retseptiivses faasis ülesreguleeritud (Ruiz-Alonso jt. 2012).

Erinevatel meetoditel tuvastatud endomeetriumi retseptiivsusega seotud markerite hulka kuuluvad mitmed molekulaarsed mediaatorid nagu tsütokiinid, raku adhesiooni molekulid (CAM - *cell adhesion molecule*), lipiidid, kasvufaktorid ja prostaglandiinid, mis vahendavad hormoonide poolt kontrollitud emaka limaskesta vastuvõtlikkuse saavutamiseks vajalike sündmusi (Achache & Revel, 2006; Lessey jt. 1992). CAM perekonda kuuluvad omakorda nelja tüüpi rakupinna ligandid: integriinid, selektiinid, kadheriinid ja immunoglobuliinid, mis vahendavad rakk-rakk adhesiooni ning mille funktsioonide hulka kuuluvad kudede vahelise seotuse säilitamine, raku migratsioon ja haavade paranemine (Achache & Revel, 2006). Endomeetriumi luminaarses ja näärmeepiteelis on kirjeldatud mitmete erinevate integriinide esinemist ning kui suuremat osa integriinidest ekspresseeritakse ühtlaselt läbi terve menstruaaltsükli, siis mõnedel raku adhesiooni molekulidel esinevad tsükli jooksul erinevad avaldumismustrid (Klentzeris jt. 1993; Lessey jt. 1992). WOI markeritena on välja pakutud integriine, mille ekspressioon on kõrgem sekretoorse faasi keskel, sealjuures integriinide

avalbumise häirumist seostatakse vähenenud endomeetriumi vastuvõtlikkuse ja viljatusega (Lessey jt. 1992; Lessey, 2000).

Retseptiivses faasis on oluliseks protsessiks raku adhesioon, milles on oluline roll endomeetriumi epiteelirakkudes esinevatel adhesioonimolekulide ekspressiooni reguleerivatel tsütokiinidel, mis seeläbi ka endomeetriumi retseptiivsust mõjutavad (Simón jt. 1997). Valgulised signaalmolekulid tsütokiinid reguleerivad mitmeid olulisi rakulisi funktsioone, sealhulgas rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist. Inimese endomeetriumis kannavad tsütokiinid olulist rolli menstruaaltsükli jooksul toimuvates põletikulistes protsessides, kuid neid on seostatud ka ovulatsiooni ja embrüo pesastumisega. Endomeetriumi retseptiivsuse seisukohalt on välja toodud kolm peamist tsütokiini: interleukiin 6 (*IL-6 - interleukin 6*), interleukiin 1 (*IL-1 - interleukin 1*) ja leukeemiat inhibeeriv faktor (*LIF - leukaemia inhibitory factor*) (Achache & Revel, 2006). Viljakate naiste endomeetriumi proovide analüüsi tulemusena leiti kõrgem *LIF*'i mRNA tase menstruaaltsükli sekretoorses faasis maksimumiga tsükli 20 päeval, mis vastab WOI algusele, seejuures ei tuvastatud *LIF*'i mRNA ega valgu esinemist üheski teises menstruaaltsükli faasis peale sekretoorse faasi (Charnock-Jones jt. 1994; Lédée-Bataille jt. 2002; Vogiatzis jt. 1996). Tõendeid *LIF*'i olulisusest endomeetriumi retseptiivsuse saavutamisel ja implantatsiooni toimumisel annavad katsed hiirtega, kus *LIF* geeni suhtes defitsiitsetel hiirtel ei toimunud embrüo pesastumist (Stewart, 1994). Ühtlasi on näidatud *LIF*'i tähtsust implantatsioonil toimuvates trofoblasti adhesiooni- ja invasiooniprotsessidega (Dimitriadis jt. 2010).

Parem arusaamine retseptiivsuse ja embrüo implantatsiooni mehhanismidest aitab parandada viljatuse ravi edukust ja hoida ära varast raseduse katkemist. Uued teadmised on olulised IVF'i kitsaskohtadest ülesaamiseks ning raseduse edukust mõjutavate kriitiliste etappidega toimetulekuks viljatusravis (Edgell jt. 2013).

1.5 Transkriptomu uuringud

Viimasel aastakümnel on avaldatud mitmeid peamiselt transkriptomika-põhiseid meetodeid kasutavaid uuringuid endomeetriumi retseptiivsusega seotud markerite tuvastamiseks (Lisa 1) (Edgell jt. 2013; Haouzi jt. 2009). Ülegenoomsete meetodite kasutuselevõtuga on saanud võimalikuks tuhandete geenide üheaegne analüüs, millest saadud väärtuslikku informatsiooni erinevate kudede geeniekspressiooni kohta on võimalik kasutada kliinilises praktikas. Endomeetriumi retseptiivsuse molekulaarsete mehhanismide kirjeldamine ning vastuvõtlikkuse

saavutamiseks oluliste geenide tuvastamine mikrokiibipõhiste ja sekvenerimisel põhinevate meetoditega on oluline reproduktiivmeditsiini arenguks ning IVF'i tulemuste parandamiseks (Edgell jt. 2013; Ruiz-Alonso jt. 2012).

Ponnampalam'i ja kaasautorite poolt teostatud uuring oli esimene, mis kirjeldas inimese endomeetriumi geeniekspressiooni erinevusi terve menstruaaltsükli vältel, kasutades selleks mikrokiibil põhinevat meetodit. Oma katsete tulemusena jõudsid nad järeldusele, et endomeetriumi tsükli faase on võimalik tuvastada väga täpselt vastavalt nende transkriptomii profiilile, võtmata seejuures arvesse endomeetriumi morfoloogilist välimust, ning kirjeldasid uuringu tulemusena ka geenide gruppe, mis iseloomustavad erinevaid menstruaaltsükli faase (Ponnampalam jt. 2004). Sellised tulemused rõhutavad ka geeniekspressiooni profiili potentsiaali endomeetriumi vastuvõtlikkusega seotud diagnostiliste testide väljatöötamisel (Horcajadas jt. 2006).

Endomeetriumi retseptiivsusega seotud transkriptomiiuuringud saab jagada vastavalt katsetes kaasatud patsiendirühmadele. Endomeetriumi geeniekspressiooni on uuritud tervetel viljakatel normaalse ovulatsiooniga naistel (Borthwick jt. 2003; Carson jt. 2002; Haouzi jt. 2009; Hu jt. 2014; Kuokkanen jt. 2010; Mirkin jt., 2005; Ponnampalam jt. 2004; Riesewijk jt. 2003; Talbi jt. 2006), võrdlusena viljakatel ja viljatutel naistel (Altmäe jt. 2010; Koler jt. 2009), loomulikus ja esilekutsutud tsükli (Haouzi jt. 2009; Kao jt. 2002; Horcajadas jt. 2008) ning korduva raseduse katkemisega naistel (Lédée jt. 2011; Othman jt. 2012). Endomeetriumi retseptiivsuse mehhanismide mõistmise ja biomarkerite tuvastamise seisukohalt on parimad uuringud, kus võrreldakse retseptiivset faasi (sekretoorse faasi keskpaik) mitte-retseptiivsega (proliferatiivne faas või sekretoorse faasi algus) (Edgell jt. 2013). Mitmed katsed on tuvastanud geeniekspressiooni profiili muutust endomeetriumi eel-retseptiivse faasi üleminekul retseptiivsesse faasi (Carson jt. 2002; Díaz-Gimeno jt. 2011; Haouzi jt. 2009; Mirkin jt. 2005; Riesewijk jt. 2003; Talbi jt. 2006).

Kuigi tuvastatud retseptiivsuse markerite kattuvus uuringute vahel on madal, on siiski leitud mõned ühised potentsiaalsed vastuvõtlikkusega seotud geenid, näiteks juba eelnevalt mainitud raku adhesiooniks oluline *LIF*. Endomeetriumi eel-retseptiivse ja retseptiivse faasi võrdluste tulemustena on uuringutes välja toodud mitmeid paljulubavaid vastuvõtlikkuse markereid, kusjuures kuuest uuringust on leitud kaks ühist geeni: progesterooni poolt reguleeritud interleukiin 15 (*IL-15*) ja implantatsiooni käigus raku adhesiooni ja migratsiooniga seotud geen *SPPI* ehk sekreteeritud fosfoproteiin 1 (*secreted phosphoprotein 1*, tuntud ka kui osteopontin). Kuuest uuringust viies võib aga ülesreguleeritud geenides ühisosana näha ka gene *ANXA4*

(*Annexin A4*), *SERPING1* (*Serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1*), *CLDN4* (*Claudin 4*), *COMP* (*Cartilage oligomeric matrix protein*) ja *DKK1* (*Dickkopf homologue 1*) (Achache & Revel, 2006; Carson jt. 2002; Díaz-Gimeno jt. 2011; Haouzi jt. 2009; Mirkin jt. 2005; Riesewijk jt. 2003; Talbi jt. 2006).

Haouzi ja kolleegide poolt läbiviidud endomeetriumi retseptiivsuse biomarkerite uuringu tulemusena tuvastasid nad varasemate transkriptoomiuuringute põhjal valitud geenide analüüsil uued geenid, mille aktiivsus on muutunud spetsiifiliselt implantatsiooniakna ajal (Haouzi jt. 2009). Uuringus leiti näiteks geenid *ANGPTL1* (*angiopoietin-like 1*), *NLF2* (*nuclear localized factor 2*), *APOD* (*Apolipoprotein D*) ja *MFAP5* (*microfibrillar associated protein 5*), millel on kõigil oluline roll angiogeneesis ja endoteliaalsete rakkude ekstratsellulaarse matriksi remodelleerimises.

Zhang jt. analüüsisid varasemalt endomeetriumi retseptiivsuse uuringutest saadud andmeid ning leidsid, et 1543-st erinevalt ekspresseeritud geenist 148 olid märgitud kui potentsiaalsed endomeetriumi vastuvõtlikuse biomarkerid ning olid peamiselt seotud immuunvastuse ja rakutsükli regulatsiooniga (Zhang jt. 2012). Ka teistes uuringutes on välja toodud just immuunvastuse, eriti põletikuliste reaktsioonide ning sellega seotud ülesreguleeritud geenide olulisust retseptiivse faasi endomeetriumis (Altmäe jt. 2010; Giudice, 2006; Giudice, 2004; Kikkatalo jt. 2014; Tapia jt. 2011). Lisaks on implantatsiooniakna perioodis olulised bioloogilised rajad seotud ka rakutsükli regulatsiooni, angiogeneesi, iontranspordi, steroidhormoonide ja kasvufaktorite aktiivsuse ja metabolismiga ning ekstratsellulaarse matriksi ja rakupinna valkude produktsiooniga (Giudice, 2004). Kui proliferatiivse faasi endomeetriumis võib näha mitmete DNA sünteesi, rakujagunemise, ekstratsellulaarse matriksi sünteesi ja steroidhormoonide aktiivsusega seotud geenide kõrgemat ekspressiooni, siis sekretoorse faasi keskpaigas ehk retseptiivses faasis on oluline roll immuunvastuse, haavade paranemise, raku adhesiooni ja stressivastusega seotud geenidel (Lobo jt. 2004; Ruiz-Alonso jt. 2012; Simmen & Simmen, 2006).

Ruiz-Alonso jt. läbiviidud ülevaate tulemusena on näha, et varases sekretoorses faasis on olulisteks üles-reguleeritud geenideks *MUC1*, mis kaitseb rakke ensüümide ja mikroorganismide eest säilitades rakupinna hüdratiseerimise, *17βHSD*, mis reguleerib östradioli kättesaadavust endomeetriumis ning *PIP5K1B*, mis reguleerib mitmeid rakulisi protsesse, sealhulgas tsütoskeleti organisatsiooni ja proliferatsiooni (Mirkin jt. 2005; Ruiz-Alonso jt. 2012; Talbi jt. 2006). Eel-retseptiivsest faasist retseptiivsesse faasi üleminekul avalduvad geenid, näiteks *DKK1*, *IL-15* ja *LIF* on seotud rakutsükli regulatsiooni,

signaalvalkude transpordi, iontranspordi ja immuunvastusega. Tsütokiinide hulka kuulub geen *CXCL14*, millel on oluline roll immuunvastuse ja põletikuliste protsessidega ning mis WOI's on tugevalt üles ekspresseeritud (Díaz-Gimeno jt. 2011; Kao jt. 2002; Mirkin jt. 2005; Talbi jt. 2006).

Üheks põhjuseks, miks vaatamata väljapakutud suurele hulgale retseptiivsusega seotud geenidele on erinevate uuringute tulemused siiski vähekattuvad, võib pidada uuringute väga varieeruvat disaini. Erinevates uuringutes on kasutatud erinevaid mikrokiipe, erinevad ka proovide kogumise meetod ja aeg, valimi suurus ning andmete analüüsimeetodid. Samuti võib lugeda üheks oluliseks katsetulemuste varieeruvuse mõjutajaks endomeetriumi koe kompleksset ülesehitust. Lisaks erinevatele koes esinevatele rakutüüpidele, on endomeetrium rakuliselt heterogeenne ka menstruaaltsükli erinevate faaside lõikes (Edgell jt. 2013). Suurem osa endomeetriumi geeniekspressiooni uuringutest on teostatud endomeetriumi täiskoeel, kus uuritavad biopsiad koosnevad erinevatest endomeetriumi rakkudest erinevas proportsioonis ning annavad seega tulemusena kõikide endomeetriumis esinevate rakutüüpide kumulatiivse geeniekspressiooni profiili. Sellise probleemi lahendamiseks peaks uuringumaterjalina kasutama mitte endomeetriumi täiskude, vaid kasutama täiskoe analüüsil meetodeid, mis võimaldavad koe heterogeensust arvesse võtta (Boggavarapu jt. 2016; Ruiz-Alonso jt. 2012).

1.5.1 Endomeetriumi retseptiivsuse test

Patsiendi individuaalse implantatsiooniakna korrektne määramine endomeetriumi retseptiivsuse biomarkerite abiga aitab parandada kunstliku viljastamise õnnestumise tõenäosust. Transkriptoomiuuringute tulemusena on välja töötatud molekulaardiagnostiline ERA ehk *Endometrial Receptivity Array* test, mis põhineb kohandatud mikrokiibi tehnoloogial ning mille tulemusi aitab tõlgendada spetsiaalne bioinformaatiline ennustus-algoritm, mille abil saab määrata endomeetriumi täpset implantatsiooniakna aega (Díaz-Gimeno jt. 2011). ERA test töötati välja ja patenteeriti IGENOMIX (Hispaania) poolt pärast 10 aastat uuringuid ning see võimaldab analüüsida üheaegselt 238 endomeetriumi vastuvõtlikkusega seotud geeni ekspressiooni, mille erinev avaldumine menstruaaltsükli faasides on eelnevalt teada (Díaz-Gimeno jt. 2011; Ruiz-Alonso jt. 2012). ERA-testi geenide molekulaarseid funktsioone ja rolli bioloogilistes protsessides uuriti rikastusanalüüsiga geeni ontoloogia kategooriates ning tuvastati, et ERA geenid esinevad immuunvastusega seotud protsessides, mille olulisust endomeetriumi vastuvõtlikkusel on ka varem kirjeldatud. Samuti leiti rikastatus protsessides, mis reguleerisid vastust stressile ja haavade tekkimisele ning embrüo implantatsioonis olulistest

protsessides nagu raku adhesioon, retseptoritele seondumine ja oksüdoreduktaasne aktiivsus (Díaz-Gimeno jt. 2011; Hannan jt. 2007; Salamonsen jt. 2007).

ERA test on kõrge sensitiivsuse (0.9976) ja spetsiifilisusega (0.8857) implantatsiooniaja määramise test, mis aitab tuua abistatud reproduktiivmeetodid indiviidile kohandatud embrüo siirdamisega lähemale personaalmeditsiinile (Díaz-Gimeno jt. 2011; Edgell jt. 2013; Miravet-Valenciano jt. 2015). ERA analüüsi teostamiseks võetakse endomeetriumi biopsia naturaalse tsükli seitsmendal (LH+7, 7 päeva pärast uriinist tuvastatud LH taseme maksimumi) või hormoonteraapia viiendal (P+5) päeval, eraldatakse koeproovidest RNA, hübridiseeritakse see mikrokiibile ning analüüsitakse korraga kõikide ERA-testi geenide ekspressiooni. Vastavalt ekspressiooniprofiilile klassifitseeritakse endomeetrium kas retseptiivseks või mitte-retseptiivseks (Díaz-Gimeno jt. 2011; Gómez jt. 2015). Kui ERA testi tulemusena klassifitseerub endomeetrium mitte-retseptiivseks, siis suure tõenäosusega on antud naise implantatsiooniaeg nihkunud tavapärasest päevast kas hilisemaks või varasemaks. Nihkes olev implantatsiooniaken tuvastatakse umbes 20% patsientidest, kellel võetakse järgnevas menstruaaltsükli teine biopsia, mille täpne võtmise aeg määratakse vastavalt esimese proovi ajastusele (Díaz-Gimeno jt. 2011; Edgell jt. 2013). ERA-testi kasutatakse ka patsientidel, kellel vaatamata pealtnäha tervele emakale ning normaalsele endomeetriumile (paksus ≥ 6 mm) embrüo pesastumine siiski ebaõnnestub (Díaz-Gimeno jt. 2014; Garrido-Gómez jt. 2013).

EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud magistritöö põhieesmärgiks oli valideerida endomeetriumi retseptiivsusega seotud geene, mis valiti välja endomeetriumi rakupopulatsioonide RNA sekveneerimise töö tulemustest (M. Koel, avaldamata andmed).

Täpsemad töö eesmärgid olid:

1. Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geenide ekspressiooni tasemete määramine endomeetriumi täiskoes ja FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) meetodil eraldatud endomeetriumi epiteeli CD9+ ja strooma CD13+ rakupopulatsioonides.
2. Retseptiivsusega seotud geeni *RGS16* valideerimine valgu tasemel immunohistokeemia (IHC) meetodil.
3. Endomeetriumi retseptiivsuse uuringuteks parimate kvantitatiivse reaal-aja PCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction* - RT-qPCR) referentsgeenide tuvastamine.

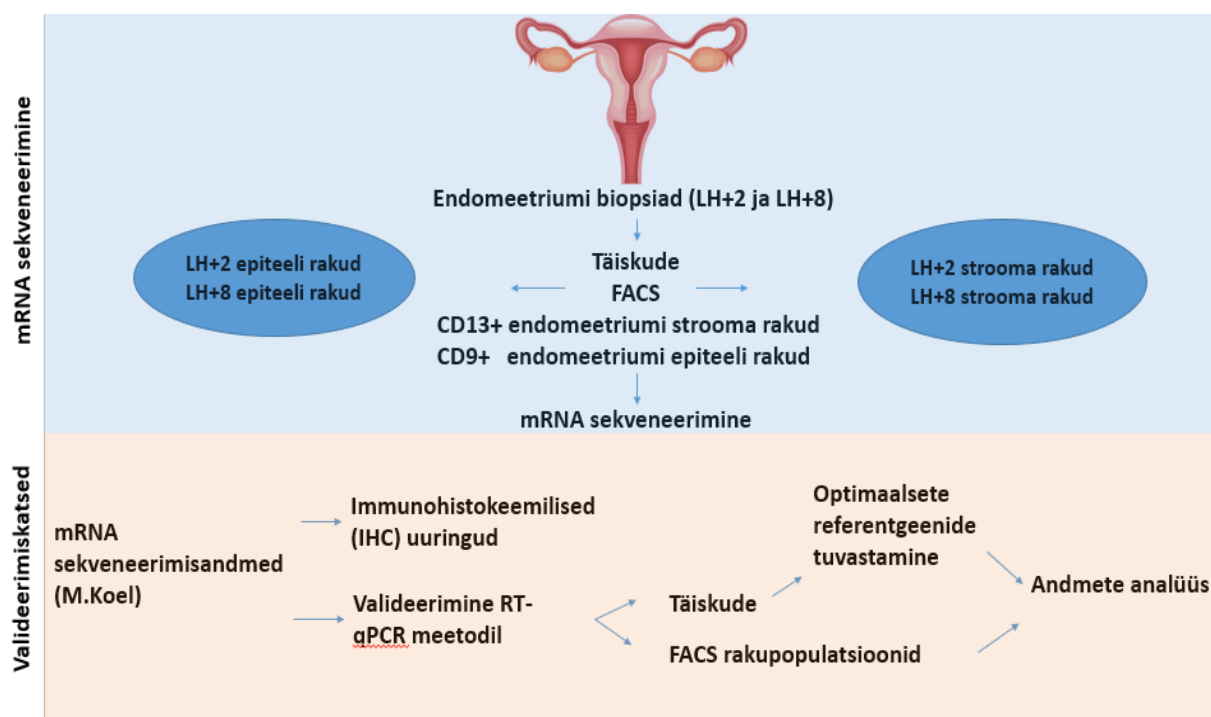
2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud rakutüübi-spetsiifiliste geenide sekveneerimine FACS eraldatud endomeetriumi CD9+ epiteeli ja CD13+ strooma rakkudes

Käesolevas töös uuritud endomeetriumi rakutüübi-spetsiifilised retseptiivsusega seotud geenid valiti välja eelnevalt teostatud RNA sekveneerimistöö tulemuste põhjal (SARM projekt, EU-FP7, IAPP, EU324509; M. Koel, avaldamata andmed). Rakutüübi-spetsiifilised geeniekspressiooni andmed pärinevad 16 terve viljaka naise eel-retseptiivse ja retseptiivse faasi endomeetriumite FACS meetodil eraldatud strooma ja epiteeli rakupopulatsioonidest. Endomeetriumi strooma rakud märgiti fluorestsents-seotud CD13 monoklonaalse antikehaga (1:20 lahjendus, kloon TÜK1, R-Phycoerythrin, Invitrogen, USA) ja endomeetriumi epiteelirakud CD9 monoklonaalse antikehaga (1:5 lahjendus, kloon MEM-61, FITC, Novus Biologicals, USA). Rakkudest eraldatud mRNA sekveneeriti kasutades STRT (*single-cell tagged reverse transcription*) meetodit (Krjutškov jt. 2016).

Endomeetriumi strooma ja epiteeli rakupopulatsioonide sekveneerimisandmete analüüsi tulemusena (M. Koel) valiti RT-qPCR meetodil valideerimiseks välja 10 endomeetriumi retseptiivsusega seotud geeni (*C1R*, *APOD*, *APOC*, *RGS16*, *TEX40*, *DYNLT3*, *DDX52*, *RORC*, *TNFSF10* ja *CLU*), mis olid sekveneerimisandmete põhjal retseptiivse faasi endomeetriumites oluliselt kõrgemalt ekspresseeritud ($p < 0.05$). Neist 5 geeni (*C1R*, *APOD*, *APOC*, *RGS16* ja *TEX40*), olid strooma-spetsiifilised geenid ehk ekspresseeritud kõrgemalt endomeetriumi LH+8 stroomas ning 5 geeni (*DYNLT3*, *DDX52*, *RORC*, *TNFSF10* ja *CLU*) olid epiteeli-spetsiifilised geenid, mille kõrgemat ekspressiooni võib näha endomeetriumi LH+8 epiteelis.

Antud geenid valideeriti kõigepealt endomeetriumi täiskoest ja seejärel teostati valideerimine FACS meetodil eraldatud CD13+ strooma ja CD9+ epiteeli rakkudes, kasutades RT-qPCR'i.



Joonis 4. Joonisel on kujutatud antud magistritööga seotud katsete käik. Joonise ülemises blokis on kujutatud eelnevalt teostatud biopsiate töötlus ja mRNA sekveneerimisandmete analüüs, mis olid aluseks antud magistritöö uuringute sooritamisel. Alumiseks blokiks on antud magistritöö raames teostatud tööd, sealhulgas valideerimiskatsed RT-qPCR meetodil endomeetriumi täiskoest ja FACS rakupopulatsioonides, IHC uuringud, optimaalsete referentseenide uuring ning andmete analüüs.

2.2.2 Valimi kirjeldus ja proovide kogumine

Endomeetriumi täiskoeel teostatavateks valideerimis-uuringuteks koguti 10 reproduktiivses eas naise endomeetriumi biopsiad koostöös Nova Vita kliiniku, Elite kliiniku ning Lääne-Tallinna Keskhaigla. Kõik uuringutes osalenud naised olid terved, varem sünnitanud ja mittesuitsetajad. Uuringusse kaasamise kriteeriumiteks olid normaalne vaginaalne ultraheli, fertiilne iga (≤ 35 aastat), normaalne kehamassiindeks ($KMI \leq 24$), regulaarne menstruaaltsükkel (28 ± 5 päeva) ning ükski naine ei olnud kolme kuu jooksul enne proovide andmist tarvitanud hormonaalseid preparaate. Menstruaaltsükli aeg kinnitati kombineerides menstruaaltsükli ajalugu ja LH testi tulemusi (BabyTime hLH urine cassette, Pharmanova), ultraheli ja endomeetriumi histoloogilist uuringut, mis teostati vastavalt Noyes'i kriteeriumitele. Ühtlasi mõõdeti patsientidel progesterooni, prolaktiini, testosterooni, suguhormoone siduva globuliini ja kilpnääret stimuleeriva hormooni tasemed (S-Prog, S-Prol, S-Testo, S-SHBG, ja S-TSH). Keskmise vanus proovi andnud isikutel oli $30,2 \pm 3,0$ aastat ja keskmine kehamassiindeks $24,4 \pm 5,1$ kg/m². Koeproovid koguti samal naisel ühe loomuliku menstruaaltsükli vältel kasutades Pipelle kateetrit (Laboratoire CCD, Prantusmaa). Esimene biopsia võeti endomeetriumi LH+2 (2 päeva pärast LH uriinist tuvastatud LH taseme maksimumi) ehk eel-retseptiivses ning teine biopsia LH+8 (8 päeva pärast uriinist tuvastatud LH taseme maksimumi) ehk retseptiivses faasis. Kokku uuriti töös 20 biopsia materjali.

Valgu RGS16 avaldumise vaatlemiseks immunohistokeemia meetodil valiti endomeetriumi täiskoe uuringus osalenud kahe naise LH+2 ja LH+8 endomeetriumi koelõigud.

Endomeetriumi referentsgeenide uuring viidi läbi kuue täiskoeuuringus osalenud naise LH+2 ja LH+8 endomeetriumi koeproovidel.

Endomeetriumi FACS sekveneerimis-uuringusse kaasati terved vabatahtlikud naised Eestist ja Hispaaniast (n=16) SARM projekti raames. Uuringusse kaasamise kriteeriumid vastavad endomeetriumi täiskoe uuringule. Endomeetriumi koeproovid koguti samal naisel ühe loomuliku menstruaaltsükli vältel kasutades Pipelle kateetrit (Laboratoire CCD, Prantusmaa). Esimene biopsia võeti endomeetriumi LH+2 ehk eel-retseptiivses ning teine biopsia LH+8 ehk retseptiivses faasis. Valideerimiseks kasutati sekveneerimisuuringus osalenud indiviidide FACS meetodil eraldatud LH+2 CD13+ strooma (n=8) ja CD9+ (n=10) epiteelirakkudest ja LH+8 CD13+ strooma (n=12) ja CD9+ (n=15) epiteelirakkudest eraldatud mRNA-d.

Antud uuring teostati Tartu Ülikooli Inimuuringu eetika komitee loal ning kõikidelt uuringus osalenud indiviididelt võeti allkirjastatud informeerimise ja nõusoleku leht.

2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees

RNA eraldamiseks endomeetriumi täiskoe proovidest kasutati RNeasy Mini kit'i (Qiagen, Hilden, Germany) vastavalt tootja soovitudele. FACS rakud sorteeriti otse Qiazoli lüüsi reagenti ning RNA eraldati kasutades RNeasy Micro kit'i (Qiagen, Hilden, Germany) vastavalt tootja soovitudele. RNA eraldati M. Saare poolt.

Kvantitatiivse reaalaaja PCR reaktsioonide teostamiseks sünteesiti esmalt proovidest eraldatud DNase töödeldud (TURBO DNA-free™ kit, Ambion Inc., Austin, Texas, USA) RNA'st pöördtranskriptsiooni reaktsiooniga komplementaarne DNA (*complementary DNA*-cDNA) kasutades selleks RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo-Fisher Scientific Inc. MA, USA) ja tootja soovitud.

2.2.4 Kvantitatiivne reaalaaja PCR (RT-qPCR)

Valitud sihtmärkgeenidel teostati kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon nii endomeetriumi täiskoe LH+2 ja LH+8 biopsiatel kui ka endomeetriumi LH+2 ja LH+8 epiteeli CD9+ ja strooma CD 13+ rakupopulatsioonides. RT-qPCR analüüsiks kasutatud praimerid (Tabel 1) disainiti kasutades Primer 3 (<http://www.primer3.ut.ee>) programmi ning seondumist järjestusele kontrolliti GenomeTester 1.3 programmiga (<http://www.bioinfo.ut.ee/genometester>). *SDHA* (*Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A*) geeni kasutati katses endogeense kontrollina.

RT-qPCR teostati kasutades 1 × HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) vastavalt tootja poolt toodud juhiste. PCR viidi läbi reaktsioonimahus 20 µl, kus reaktsioonisegu sisaldas 14,5 µl ddH₂O'd, 4 µl Master mix SYBER Green'i (5X), 0,5 µl praimerit (10pmol) ja 1 µl cDNA'd (lahjendati 1:10). Kõik reaktsioonid olid tehtud kahes korduses kasutades 7500 Fast Real-Time PCR masinat (Applied Biosystems, CA, USA).

Tabel 1: Töös kasutatud praimerid

Geen	Järjestus (5'-3') Fw	Rev
SDHA*	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
HPRT	CTGGAAAGAATGTCTTGATTGTG	GACCTTGACCATCTTTGGATTA;
RGS16	GGTACGTGTCTTCCCCTGAG	AGAAGATCCGATCAGCTACCA
C1R	GACCCTAGACGAGTTCACCA	CCACGTGCCATCATCCTG
APOD	GTGCCGATGGCATAAACC	TGAATCAAATCGAAGGTGAAG
DYNLT3	GCTTTTCCCAACTTAACCAGGT	GCGACGAGGTTGGCTTCAA
DDX52	GGACTGTGTTATCTCTCTGTTGT	TCCATTGAAAGGGCTAAAGAACT
IGFBP6	AATCCAGGCACCTCTACCAC	GGTCACAATTGGGCACGTAG
CST3	AGATGTGGCTGGTCATGGAA	AACAAAGCCAGCAACGACAT
MYOF	TGGAGTTTGACTTGAGGGGTA	AGGGAGATCAGCTTGTACGG
SEC11	TTGGATATCTTCGGGGACCT	CTCCATACTGCCACTCAGCA
CLU	CGCCACGGTCTCCATAAATT	AGTACTATCTGCGGGTCACC
TNFSF10	TCTCTTCGTCATTGGGGTCC	ACAGACCTGCGTGCTGAT
RORC	GAGGGTATCTGCTCCTTGGG	CGAGATGCTGTCAAGTTCGG
APOC1	TTCACTCTGTTTGATGCGGC	CTGGTGGTGGTTCTGTTCGAT
TEX40	TTGGTGAGGATTTCCAGAGC	CACTCAATATTGCGAAGCACA
ACTB	AAGGGACTTCCTGTAACAAT	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
B2M	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	ACAAGTCTGAATGCTCCACT
GAPDH	TCTTCCTCTTGCTCTTGC	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT
PPIA	ACCACCCTGACACATAAA	AGACAAGGTCCCAAAGAC
CYC1	TAGCTCGCACGATGTAGCTG	GAGGTGGAGGTTCAAGACGG
HMBS	CTGTTTACCAAGGAGCTGGAAC	TGAAGCCAGGAGGAAGCA
TBP	GCCCGAAACGCCGAATATAA	AATCAGTGCCGTGGTTCGTG

*SDHA praimer võetud eelnevast teostatud katsetest (Vandesompele jt. 2002).

2.2.5 Immunohistokeemia

Immunohistokeemilised uuringud teostati klaasile kantud parafiini sisestatud LH+2 ja LH+8 endomeetriumi koelõikudel. Koelõigud deparafiniseeriti ksüleeniga, rehüdreeriti astmeliselt lahjendatud etanoolis 5 minutit (100%, 96%, 70% ja 50%) ning hoiti antigeeni esiletoomiseks 20 minutit 99 °C Na- tsitraat puhvriv vesivannis, mille järel lasti lahusel 20 minutit jahtuda. Järgnes kolmekordne pesu TBST'ga (TBS- *tris-buffered saline*, 0,05% Tween 20) 5 minutit. Antikehade mittespetsiifilise seondmise vältimiseks kanti lõikudele 1-2 tunniks blokeeriv lahus (1% BSA-*bovine serum albumine*, 0,05% Tween 20 PBS). Järgnevalt inkubeeriti proove üleöö 4 °C juures primaarse antikeha lahusega. Antikeha eemaldamiseks pesti koelõike 3 x 5 minutit TBST'ga, kanti 15-30 minutiks peale peroksidaasi supressor ning pesti uuesti samal meetodil. Seejärel inkubeeriti proove sekundaarse Anti-Rabbit IgG antikehaga (lahjendusega 1:250) üks tund, millele järgnes pesu 3 x 5 minutit TBST'ga. Lõigud värviti visualiseerimiseks toatemperatuuril 20 minutit DAB'iga (3,3-diaminobensediin) ning pesti 3 korda kraaniveega, mille järel pandi proovidele kolmeks minutiks Mayer'i hematoksüliin ning loputati kraanivee ja MilliQ H₂O'ga. Lõpetuseks endomeetriumi koe proovid sulundati ning kaeti katteklaasiga.

Neli koeproovi (NOTNV 22 LH+2 ja LH+8, NOTNV 40 LH+2 ja LH+8) inkubeeriti anti-*RGS16* (Sigma HPA055824) antikehaga.

2.2.6 Statistiline andmeanalüüs

Uuritavate geenide RT-qPCR amplifikatsioonil saadud Ct väärtused normaliseeriti referentsgeeni Ct keskmise väärtuse suhtes:

$$\Delta Ct = \text{keskmine Ct (uuritav geen)} - \text{keskmine Ct (referentsgeen)}$$

LH+2 ja LH+8 proovide vahelise ekspressioonitaseme korduse erinevused (*fold change*) arvutati $2^{-\Delta\Delta Ct}$ valemiga (Livak ja Schmittgen, 2001), kus $\Delta\Delta Ct = (\text{uuritava geeni Ct} - \text{referentsgeeni Ct}) \text{ katsegrupp X} - (\text{uuritava geeni Ct} - \text{referentsgeeni Ct}) \text{ katsegrupp Y}$. X ja Y tähistavad valimigruppe vastavalt sellele, milliseid grupe omavahel võrreldi.

LH+2 ja LH+8 vaheliseks geeniekspressiooni erinevuse olulisuse analüüsiks kasutati Microsoft Office Excelis kahesuunalist paaris t-testi funktsiooni. Statistiliselt oluliseks tulemuseks loeti p-väärtus <0,05.

2.3 Tulemused

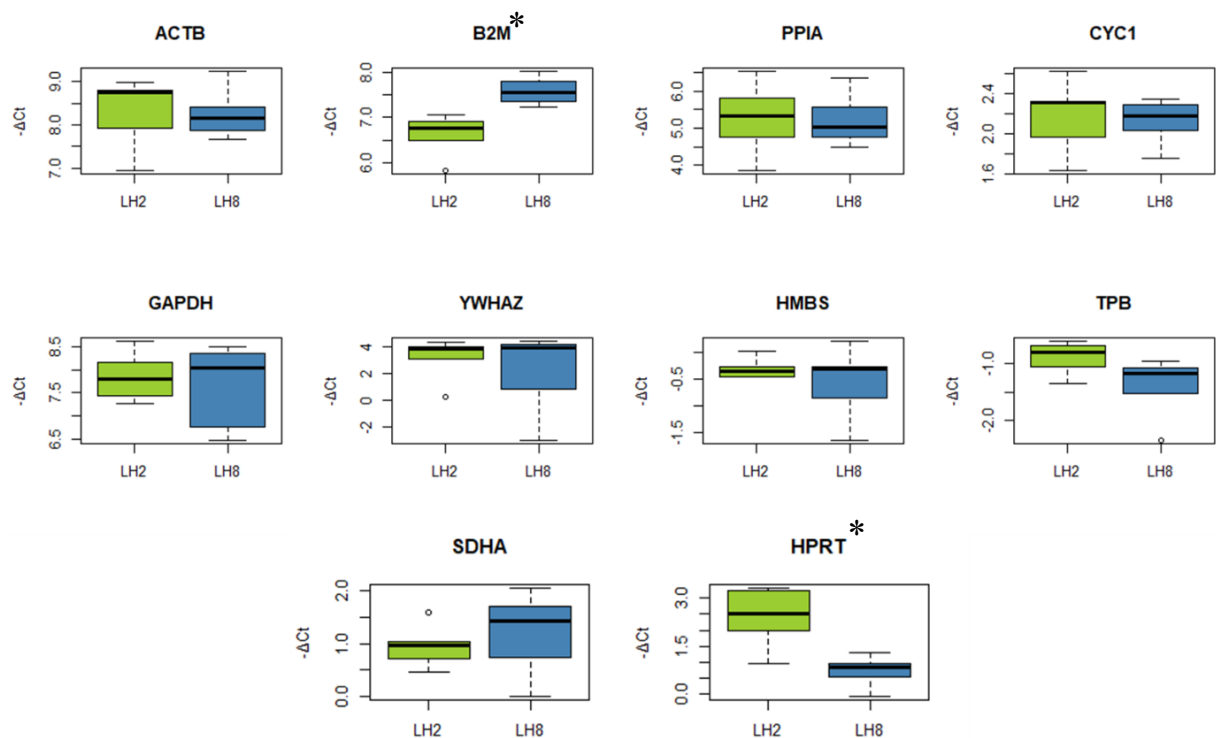
Käesolevas magistritöös analüüsiti parimate referentsgeenide tuvastamiseks endomeetriumi retseptiivsuse katsete teostamiseks RT-qPCR meetodil, analüüsiti 10 endomeetriumi töödes eelnevalt referentsgeenina kasutatud geenide ekspressiooni endomeetriumi LH+2 ja LH+8 proovides. Ühtlasi uuriti endomeetriumi täiskoe proovide ning FACS meetodil eraldatud rakkude LH+2 ja LH+8 geeniekspressiooni erinevusi ning teostati immunohistokeemilised uuringud endomeetriumi koe lõikudel geeni *RGS16* avaldumise määramiseks valgu tasemel.

2.3.1 Referentsgeenide valik endomeetriumi retseptiivsuse uuringutes

Uurides RT-qPCR meetodil geenide ekspressiooni, on õigete tulemuste seisukohalt oluline mõõdetud ekspressioonitasemete korrektne normalisatsioon. Valitud referentsgeenid peaksid olema stabiilselt ekspresseeritud endomeetriumis terve menstruaaltsükli vältel ehk ei tohiks olla menstruaaltsükliliselt mõjutatud. Kuid isegi kõige sagedamini kasutatavad „housekeeping“ geenid näitavad varieeruvust nii proovide kui kudede vahel. Seetõttu on oluline leida kõige sobivamad referentsgeenid just uuritava koe jaoks.

Vastava uurimustöö jaoks mõõdeti LH+2 ja LH+8 endomeetriumi koe proovides 10 varasema kirjanduse analüüsi põhjal välja valitud referentsgeeni (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *YWHAZ*, *PPIA*, *CYCL1*, *HMBS*, *TBP*, *HPRT* ja *SDHA*) ekspressioonitasemed, kasutades sisemise referentsina *spike in RNAd* (Yang, 2006).

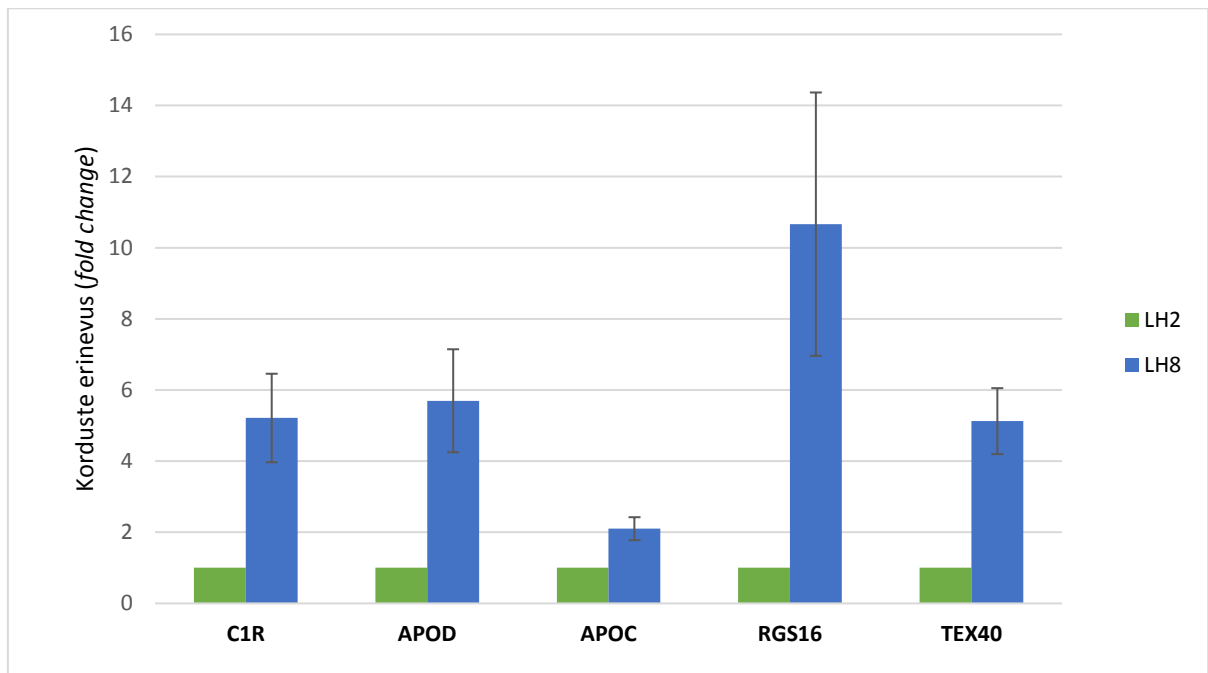
Analüüsi tulemusena leiti, et RT-qPCR analüüsideks ei ole sobilikud referentsgeenina kasutamiseks geenid *HPRT* ja *B2M*, mille ekspressioonitase antud uuringus endomeetriumi LH+2 ja LH+8 faasi proovides erines statistiliselt ($p < 0,05$). Ülejäänud 8 katses uuritud geeni ekspressioonitasemed olid aga LH+2 ja LH+8 proovide vahel stabiilsed ning sobisid kasutamiseks endomeetriumi retseptiivsuse uuringutes (joonis 5). Antud uuringus otsustati kasutada referentsgeenina *SDHA* 'd.



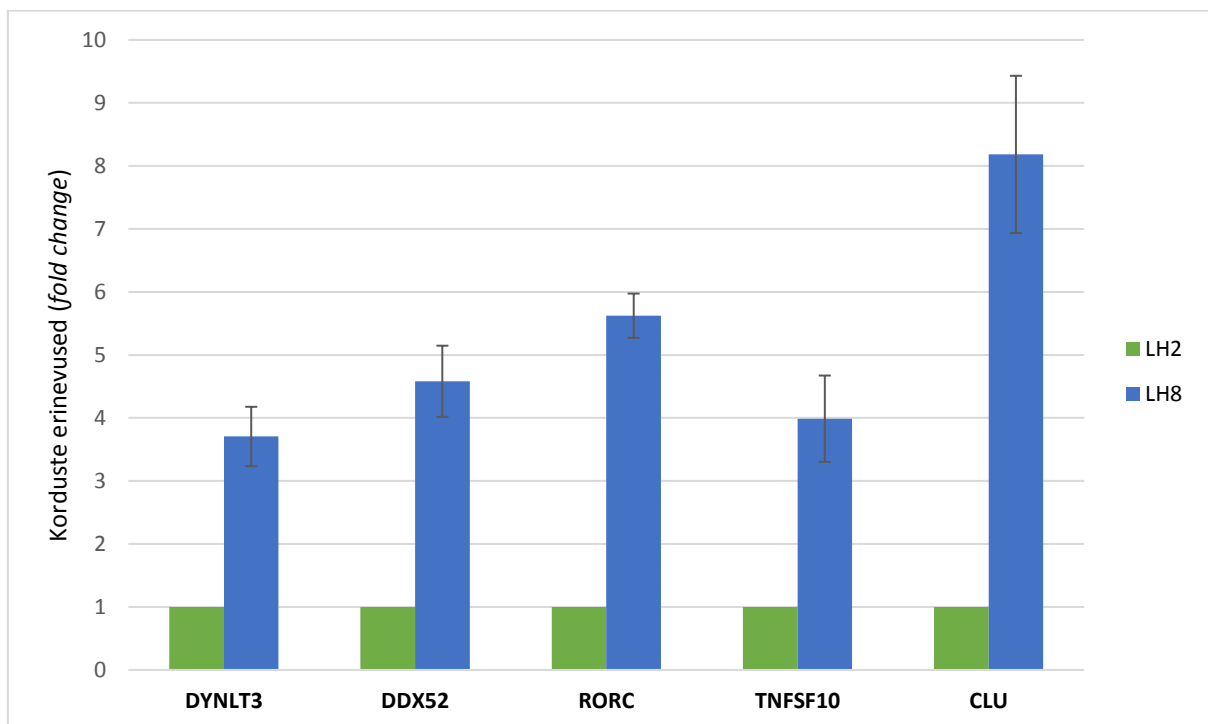
Joonis 5. Referentsgeenide ekspressioonitasemete erinevused endomeetriumi LH+2 ja LH+8 proovides. * $p < 0,05$.

2.3.2 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geenide valideerimine endomeetriumi täiskoes

Endomeetriumi strooma (*C1R*, *APOD*, *APOC*, *RGS16*, *TEX40*) ja epiteeli (*DYNLT3*, *DDX52*, *RORC*, *TNFSF10* ja *CLU*) rakupopulatsioonide spetsiifiliste geenide ekspressioonitasemeid hinnati ka LH+2 ja LH+8 endomeetriumi täiskoes. Katse viidi läbi kümme naise endomeetriumi täiskoe LH+2 ja LH+8 proovides ja selle tulemusena leidis kinnitust kõikide rakutüüpspetsiifiliste geenide kõrgem ekspressioonitase retseptiivses faasis võrreldes eelretseptiivse faasiga (Joonis 6a, 6b), mis kinnitab valitud geenide sobivust endomeetriumi retseptiivsuse hindamise markeriteks ka endomeetriumi täiskoes.



Joonis 6a. Endomeetriumi täiskoe LH+2 ja LH+8 RT-qPCR valideerimise tulemused stroma-spetsiifilistes geenides. Y-teljel on toodud antud korduste erinevused (*fold change*), mis on arvutatud LH+2 ajapunkti suhtes. Kõik uuritud geenid $p < 0,05$.

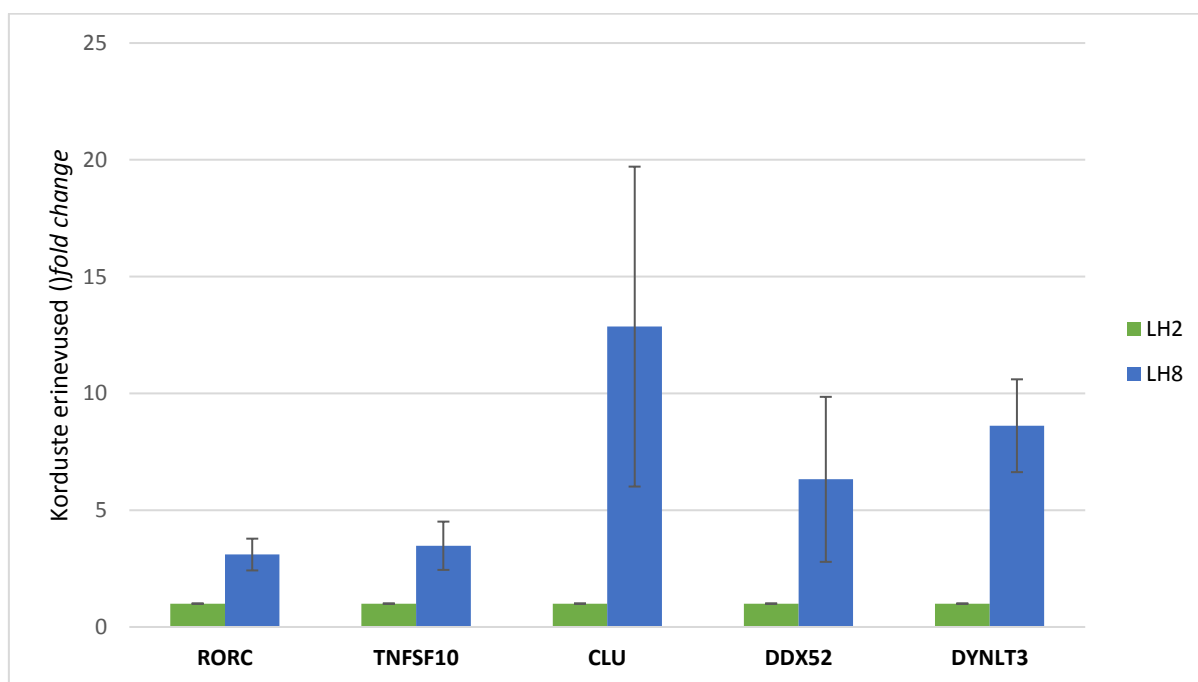


Joonis 6b. Endomeetriumi täiskoe LH+2 ja LH+8 RT-qPCR valideerimise tulemused epiteeli-spetsiifilistes geenides. Y-teljel on toodud antud korduste erinevused (*fold change*), mis on arvutatud LH+2 ajapunkti suhtes. Kõik uuritud geenid $p < 0,05$.

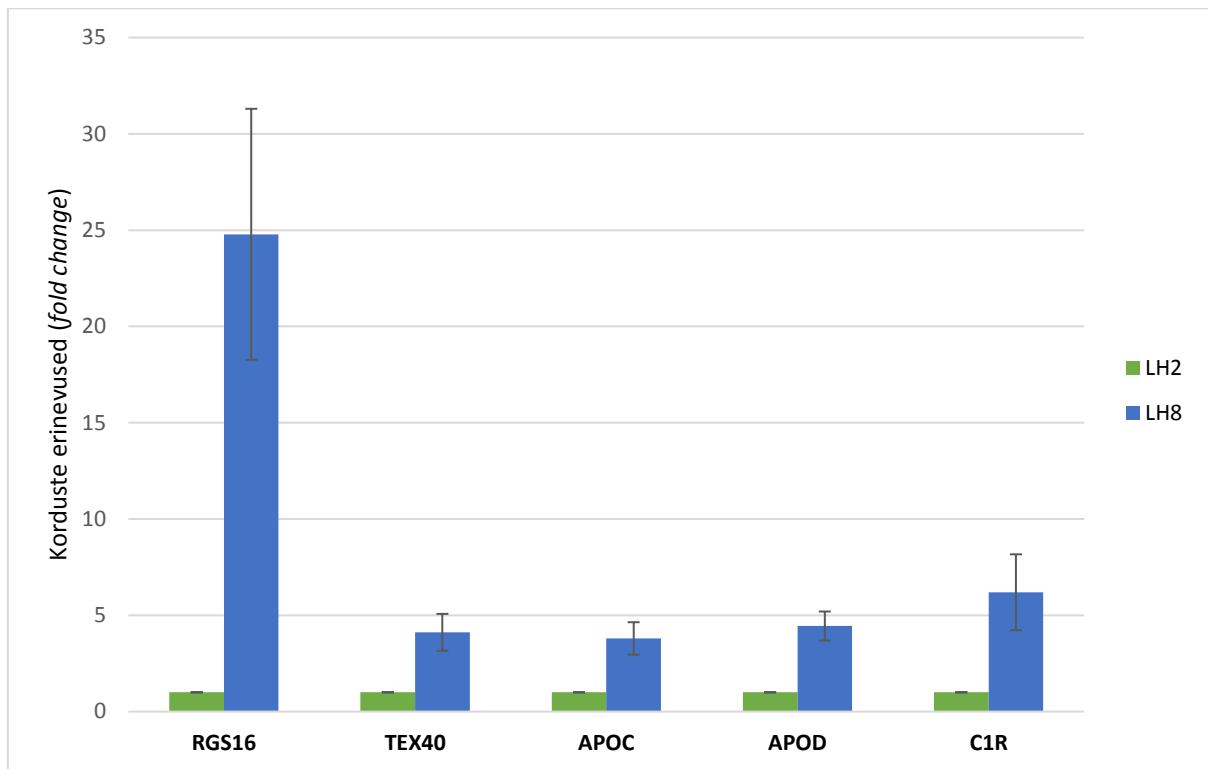
2.3.3 Endomeetriumi retseptiivsusega seotud rakutüübi-spetsiifiliste geenide valideerimine FACS eraldatud endomeetriumi CD9+ epiteeli ja CD13+ strooma rakkudes

Lisaks endomeetriumi täiskoele analüüsiti retseptiivsusega seotud geenide ekspressiooni ka endomeetriumi koe FACS meetodil eraldatud strooma ja epiteeli rakkudes, mis olid eraldatud eel-retseptiivses ja retseptiivses faasis.

Valideerimiskatse tulemusena leidis kinnitust nii epiteeli-spetsiifiliste geenide (*RORC*, *TNFSF10*, *CLU*, *DDX52* ja *DYNLT3*) kõrgem ekspressioon endomeetriumi retseptiivses faasis FACS eraldatud CD9+ epiteeli rakkudes (Joonis 7a) kui ka strooma spetsiifiliste geenide kõrgem ekspressioon (*C1R*, *APOD*, *APOC*, *TEX40* ja *RGS16*) geenides retseptiivses faasis võrreldes eel-retseptiivse faasiga (Joonis 7b).



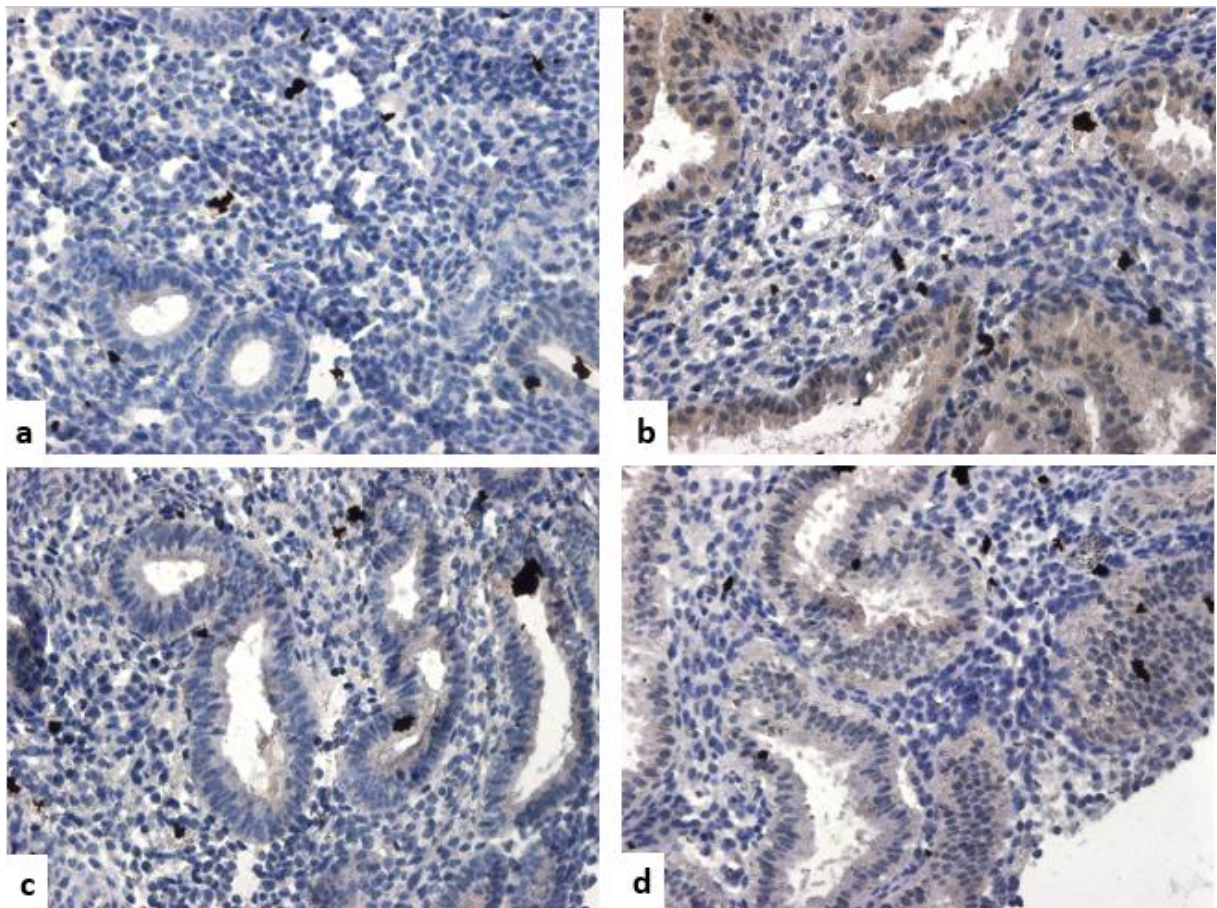
Joonis 7a. Endomeetriumi FACS eraldatud epiteeli ja strooma rakupopulatsioonide valideerimiskatse tulemused epiteeli-spetsiifilistes geenides. Y-teljel on toodud antud korduste erinevused (*fold change*), mis on arvatud LH+2 ajapunkti suhtes. Kõik uuritud geenid $p < 0,05$.



Joonis 7b. Endomeetriumi FACS eraldatud epiteeli ja strooma rakupopulatsioonide valideerimiskatse tulemused strooma-spetsiifilistes geenides. Y-teljel on toodud antud korduste erinevused (*fold change*), mis on arvatatud LH+2 ajapunkti suhtes. Kõik uuritud geenid $p < 0,05$.

2.3.4 Immunohistokeemia

Geeni *RGS16* seotust retseptiivsusega ei ole varasemalt uuritud ning sellest tulenevalt teostati pilootprojektina ka vastava valguga taseme määramine endomeetriumi koes. Immunohistokeemilises katses retseptiivsusega seotud geeni *RGS16* avaldumise uurimiseks valguga tasemel inkubeeriti endomeetriumi koepruove anti-*RGS16* antikehaga. Vastavalt sekveneerimisandmetele ja valideerimiskatsete tulemusele peaks olema *RGS16* mRNA olema oluliselt kõrgemalt ekspresseeritud endomeetriumi retseptiivse faasi stroomas. Esialgse IHC katse tulemused ei tuvastanud stroomas antud antikehaga signaali, üllatava leiuna täheldati aga *RGS16* kõrgemat avaldumist ehk oluliselt tugevamat värvumist endomeetriumi LH+8 epiteelis (Joonis 8).



Joonis 8. Endomeetriumi koe lõik (proov NOTNV 22) tsükli eel-retseptiivses faasis (a) ja tsükli retseptiivses faasis (b) ja endomeetriumi koe lõik (proov NOTNV 40) tsükli eel-retseptiivses faasis (c) ja tsükli retseptiivses (d) faasis 40x suurendusega.

2.4 Arutelu

Täpse implantatsiooniakna ehk endomeetriumi retseptiivse faasi identifitseerimine on reproduktiivmeditsiini seisukohalt äärmiselt oluline ning aitab seletada teadaolematu viljatuse juhtumeid ja parandada kunstliku viljastamise edukust. Endomeetriumi küpsemine ning ettevalmistumine retseptiivsuse saavutamiseks võib toimuda naistel veidi erineva kiirusega ning seetõttu võib mõnede IVF patsientide embrüo implantatsiooni ebaõnnestumine olla seotud WOI kerge nihkega. Just seetõttu on olulised diagnostilised testid, millega ennustada täpselt individuaalne WOI ning parandada sellega embrüote pesastumise toimumise võimalust. Käesolevas töös kinnitusid kõigi 10 uuritud geeni kõrgemad ekspresioonitasemed endomeetriumi retseptiivses faasis ning seetõttu on need geenid potentsiaalsed markerid, mida kasutada uute endomeetriumi retseptiivsuse hindamise diagnostiliste testide väljatöötamisel. Antud magistritöö on suunatud inimese endomeetriumis implantatsiooniakna ajal ekspresseeruvate geenide identifitseerimisele, eesmärgiga leida markereid endomeetriumi

retseptiivsuse hindamiseks. Samuti annab selline analüüs informatsiooni geenidest, mis võiksid olla olulised endomeetriumi retseptiivsuse saavutamiseks. Sellest tulenevalt võrreldi antud uurimustöös endomeetriumi eel-retseptiivse ja retseptiivse faasi endomeetriumi geeniekspressiooni profile nii endomeetriumi täiskoes kui ka endomeetriumi FACS meetodil eraldatud rakupopulatsioonides.

Viimasel aastakümnel on RT-qPCR oma märkimisväärse kiiruse, täpsuse ja tundlikuse tõttu saanud peamiseks geeniekspressiooni uuringutel kasutatavaks mRNA transkriptsiooni kvantifikatsiooni meetodiks. RT-qPCR'i tulemuste õigsuse seisukohalt on äärmiselt oluline mõõdetud ekspresioonitaseme korrektne normalisatsioon ehk õigete kontrollgeenide valik analüüside teostamiseks, mis võimaldaks elimineerida proovide algmaterjali kogusest, kvaliteedist või ettevalmistusest tingitud erinevused (Vandesompele jt. 2002). Koduhoidja geenid on vajalikud raku esmaste funktsioonide tagamiseks ning seetõttu peaksid nad olema stabiilselt ekspresseeritud kõikides rakkudes. Siiski näitavad ka kõige tihemini geeniekspressiooni uuringutes kasutatavad referentsgeenid proovide ja kudede vahel varieeruvust. Seega on hädavajalik identifitseerida kontrollgeenid, mis sobiksid kõige paremini spetsiifiliselt analüüsitava koega (Ginzinger, 2002; Radonić jt. 2004; Vandesompele jt. 2002). Kuna varasemalt ei ole endomeetriumi retseptiivsus uuringutes referentsgeenide sobivusele tähelepanu pööratud, otsustati antud töös hinnata kuidas erinevate referentsgeenide ekspressioon sõltub endomeetriumi retseptiivsuse faasist (eel-retseptiivne vs. retseptiivne). Uuring näitas väga selgelt, et kaks uuritud referentsgeeni (*HPRT* ja *B2M*) ei sobi kasutamiseks endomeetriumi retseptiivsuse töödes, kuna nende geenide ekspressioon muutus endomeetriumi retseptiivses faasis oluliselt kõrgemaks võrreldes eel-retseptiivse faasiga. Kõik ülejäänud kaheksa referentsgeeni sobisid kasutamiseks endomeetriumi retseptiivsuse uuringutes. Siiski tuleb märkida, et kuna endomeetrium on väga dünaamiline kude, siis antud referentsgeenide sobivust menstruaaltsükli teistes faasides tuleb täiendavalt kontrollida.

Käesolevas töös valideeriti 10 endomeetriumi retseptiivsusega seostatud geeni, neist kolm (*CLU*, *DDX52* ja *APOD*) olid varasemalt teadaolevad menstruaaltsükli regulatsioonis ja retseptiivsuse saavutamise protsessides osalevad geenid (Díaz-Gimeno jt. 2011; Kao jt. 2002). Antud geenidest 2, *CLU* ja *DDX52*, on välja toodud ka ERA diagnostilise testi nimekirjas. Neist esimene, *CLU* (*Clusterin*), on valku kodeeriv geen, mille produktiks on sekreteeritud šaperon-valk ning mis osaleb rakkude proliferatsiooni regulatsioonis, immuunvastuses, komplemendi kaskaadis ja apoptoosis. Endomeetriumis esineb *CLU* peamiselt epiteelis, mida on ka varasemalt näidatud ning on välja pakutud, et *CLU* osaleb menstruaaltsüklijärgses näärmeepiteeli regeneratsioonis, kuna sarnast protsessi on täheldatud pankrease näärmete puhul

(Konrad jt. 2016; Vercellini jt. 2013). *CLU* kõrgemat ekspressiooni on täheldatud peamiselt endomeetriumi hilises sekretoorses faasis ning arvatakse, et kahanev progesterooni tase võib indutseerida *CLU* produktsiooni endomeetriumi epiteeli rakkudes (Brown jt. 1995; Konrad jt. 2016). Geen osaleb tõenäoliselt koe remodelleerimises implantatsiooniprotsessil ning selle kõrgemat ekspressiooni võib täheldada ajal, kui steroidhormoonide kontsentratsioon on alanenud ning toimub apoptoos, mille markeriks *CLU*'d peetakse (Brown jt. 1995). Apoptootilised protsessid aktiveeruvad endomeetriumis valdavalt hilissekretoorses faasis ja saavutavad haripunkti menstruaalfaasis (Allegra jt. 2012). Teine ERA testis olev geen on *DDX52* (*DEAD-Box Helicase 52*), mis on ATP-sõltuv RNA helikaas ja mille peamine lokaliseerimine on rakutuumas. Millist rolli võiks *DDX52* endomeetriumi epiteelis ja implantatsiooniprotsessides mängida, ei ole siiani teada, kuid kuna ka varasemates implantatsiooniga seotud töödes on antud geeni kõrgemat ekspressiooni retseptiivse faasi endomeetriumis leitud, võiks antud geeni funktsiooni ja rolli endomeetriumi retseptiivsuses põhjalikumalt uurida. Kolmas geen, mida varasemalt on endomeetriumi retseptiivsusega seostatud on *APOD* (*Apolipoprotein D*). *APOD* on valku kodeeriv peamiselt ekstratsellulaarselt paiknev geen, mis seob hüdrofoobseid molekule ning on oluline kolesterooli transpordis (Haouzi jt. 2009; Kao jt. 2002; Mahley, 1988). *APOD*'i menstruaaltsüklist sõltuvat ekspressiooni endomeetriumis, mis viitab geeni rollile endomeetriumi moduleerimises, on varasemalt näidatud (Germeyer jt. 2013). *APOD* on märgatavalt üles-reguleeritud WOI ajal ja on strooma-spetsiifiline, ehk ekspresseerub kõrgemalt retseptiivse faasi endomeetriumi stroomarakkudes (Kao jt. 2002). Geeni kõrge ekspressioon endomeetriumis viitab selle olulisusele kolesterooli transpordi protsessides ning steroidhormoonide biosünteesis. *APOD*'i lokaalset produktsiooni on näidatud steroidhormoone tootvates kudedes, eriti munasarjas. Antud geeni rolli on näidatud ka vitamiinide, nukleosiidide, glükoosi ja teiste suhkrute transpordis ning angiogeneesis (Allegra jt. 2012; Kao jt. 2002; Zerbinatti jt. 2001). Kuna *APOD* on ülesreguleeritud endomeetriumi sekretoorses faasis, osaleb see tõenäoliselt endomeetriumi valmistumisel implantatsiooniks, aidates kaasa endomeetriumi tõusvale energia vajadusele (Germeyer jt. 2013).

Lisaks eelpool toodud kolmele geenile, kinnitati antud töös veel 7 geeni, mis on endomeetriumi vastuvõtlikuse seisukohalt uudsed ehk varasemalt endomeetriumi retseptiivsusega seostamata, oluliselt kõrgem ekspressiooni tase retseptiivses endomeetriumis ning näidati nende rakutuübist sõltuv ekspressioonimuster. Neist seitsmest geenist otsustati immunohistokeemilisel meetodil valideerida üks, *RGS16*, mis oli kõrgemalt ekspresseeritud geen retseptiivse faasi endomeetriumi stroomarakkudes. *RGS16* (*Regulator Of G-Protein Signaling 16*) geeni poolt

kodeeritud valk, kuulub G-valkude signalisatsiooni regulaatorite perekonda, mis inhibeerib signaali transduktsiooni suurendades G-valgu *alfa* allühiku GTP-asset aktiivsust. Lisaks kuulub *RGS16* peptiidide ligand-seonduvate retseptorite bioloogilisse ratta (Sun jt. 2015). Huvipakkuvalt on geenil roll ka kalmoduliini (*calmodulin*) seondumisel, mis vahendab organismis mitmeid, ka implantatsiooni seisukohalt, olulisi protsesse nagu apoptoos, põletikulised protsessid ja immuunvastus (Stevens, 1983). Ühtlasi on *RGS16* kõrgelt ekspresseeritud trombotsüütides ja omab tähtsat rolli nende funktsioonis. Samuti on *RGS16* identifitseeritud kui peamine faktor G-valkude poolt vahendatud lümfotsüütide aktivatsioonis, mis moduleerib mitmete rakutüüpide põletikulisi ja ellujäämise vastuseid (Karim jt. 2016; Xie jt. 2016). Antud töös läbiviidud pilootprojekti, kus analüüsiti kahe naise eel-retseptiivse ja retseptiivse faasi endomeetriumi *RGS16* valgu tasemeid, stroomarakkudes vastava antikehaga signaali ei tuvastatud. Küll aga oli üllatava tulemusena nähtav positiivne signaal endomeetriumi näärmeepiteelis. Miks antud juhul *RGS16* mRNA ja valgu tasemed omavahel ei korreleerunud, kas ja millist rolli antud geen endomeetriumi retseptiivsuses mängib, peavad välja selgitama edasised ja põhjalikumad uuringud.

Kuigi endomeetriumi täiskude on lihtne isoleerida ja analüüsida, kirjeldavad saadud tulemused koe kõikide rakkude transkriptomid, mille puhul võivad olulised rakutüübispetsiifilised markerid tuvastamata jääda. Uurides endomeetriumi vastuvõtlikust endomeetriumi epiteeli ja strooma rakkude transkriptomid analüüsi kaudu, võime leida rakutüübispetsiifilisi markereid, mida ei ole võimalik detekteerida endomeetriumi täiskoe analüüsil ning saada uut informatsiooni molekulaarsetest protsessidest, mis on vajalikud endomeetriumi retseptiivsuse saavutamiseks. Selliste uute markerite tuvastamine aitab kaasa täpse WOI määramise IVF tsükleid läbivatel patsientidel, suurendades embrüo pesastumise võimalust siirdamisel ning aitab lahendada seletamatu viljatuse juhtumeid. Käesolevas töös uuriti antud geenide ekspressioonitasemeid ka FACS meetodil eraldatud epiteeli ja strooma rakupopulatsioonides ning näidati iga konkreetse geeni rakutüübi spetsiifilist ekspressioonimustrit. Samuti kinnitati sekveneerimisel saadud tulemusi, kus näidati strooma- ja epiteeli-spetsiifiliste geenide kõrgemat avaldumist endomeetriumi retseptiivses faasis. Siiski tuleb välja tuua, et kõigi 10 antud töös uuritud geeni tasemed olid tuvastatavad nii täiskoest kui endomeetriumi strooma või epiteelipopulatsioonidest. Kuna antud töösse ei kaasatud IVF patsiente, kellel võiks viljatusravi ebaõnnestumine olla tingitud endomeetriumi retseptiivsuse häiretest, siis antud töö tulemusena ei ole võimalik hinnata, kas ja kuidas võiks sellistel patsientidel rakutüübispetsiifiline geeniekspressiooni muster erineda tervetest naistest. Töö järgmises etapis uuritaksegi

põhjalikumalt implantatsioonihäirega IVF patsientide täiskoe ja rakupopulatsioonide geeniekspressiooniprofiile.

Kokkuvõtteks võib öelda, et käesoleva töö tulemusena leidis kinnitust kõikide uuritud geenide kõrgem ekspressioon nii endomeetriumi täiskoes kui ka endomeetriumi epiteeli ja strooma rakupopulatsioonides endomeetriumi retseptiivses faasis ning võib teha järelduse, et kõik töös uuritud geenid on head markerid endomeetriumi vastuvõtlikuse hindamiseks nii täiskoes kui rakupopulatsioonides.

KOKKUVÕTE

Endomeetrium on dünaamiline kude, mis vastusena steroidhormoonidele läbib igakuiselt ulatuslikud füsioloogilised ja morfoloogilised muutused eesmärgiga saavutada endomeetriumi retseptiivne faas ja sellega sobilik keskkond embrüo implantatsiooniks.

Üle poole sajandi on endomeetriumi dateerimiseks kasutatud histoloogilist hindamist peetud kliiniliseks standardiks, kuid meetodi täpsus retseptiivsuse hindamiseks on seatud kahtluse alla ning välja on pakutud alternatiivseid meetodeid emaka limaskesta vastuvõtlikuse hindamiseks. Tänu molekulaarsete ja ülegenoomsete meetodite kasutuselevõtule teadusuuringutes, on võimalik analüüsida endomeetriumi muutuvat molekulaarset profiili menstruaaltsükli vältel ning endomeetriumi retseptiivse seisundi kujunemist transkriptoomi tasandil. Vaatamata aastatepikkustele uuringutele jätkuvad siiski otsingud parimate endomeetriumi retseptiivsuse markerite tuvastamiseks.

Käesoleva magistritöö eksperimentaalosa eesmärgiks oli valideerida endomeetriumi retseptiivsusega seotud geene, mis valiti välja endomeetriumi spetsiifiliste rakupopulatsioonide sekveneerimise töö tulemustest.

RT-qPCR analüüsides tulemusena kinnitati 8 potentsiaalse koduhoidja geeni sobivus endomeetriumi geeniekspressiooni analüüsides teostamiseks ning valiti välja sobivaim referentsgeen valideerimiskatsete läbiviimiseks. Valideerimiskatse tulemusena kinnitati RT-qPCR meetodil nii endomeetriumi täiskoes kui ka FACS meetodil eraldatud rakupopulatsioonides kümne geeni, viie strooma- spetsiifilise ja viie epiteeli-spetsiifilise geeni, kõrgem ekspressioon retseptiivses endomeetriumis ja kinnitati nende sobilikkus markeritena endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks. Immunohistokeemilise katse tulemusena endomeetriumi strooma-spetsiifilise geeni *RGS16* avaldumist valgu tasemel endomeetriumi stroomas ei nähtud.

Uute endomeetriumi retseptiivsuse markerite tuvastamine ning valideerimine on oluline, et parandada arusaamist endomeetriumi vastuvõtlikuse kujunemisest. Lisaks üldisele protsessi mõistmisele annavad uued markerid vastuvõtlikuse hindamiseks võimaluse töötada välja uusi diagnostilisi teste, mida kasutada kliinilises praktikas ning aidata seeläbi mitte-retseptiivsest endomeetriumist põhjustatud viljatuse all kannatavaid patsiente ning tõsta potentsiaalselt IVF tsüklite edukust.

Novel transcriptomic markers for the evaluation of endometrial receptivity

Grete-Katariine Kuum

SUMMARY

The endometrium is a dynamic tissue that under the influence of steroid hormones goes through monthly cyclic changes to prepare for the implantation of the embryo. A nonreceptive endometrium is responsible for a large portion of implantation failures. Over half a century the histological dating of the endometrium established by Noyes et al. has been the gold standard of evaluating receptivity. Nonetheless, its accuracy has been under question in recent studies and new methods have been proposed for a more precise evaluation of the exact state of endometrial receptivity. With new molecular and genom-wide methods it has become feasible to analyse the changing molecular profile of the endometrium during the menstrual cycle and understand the processes and molecular mediators responsible for achieving its receptive state. Although studies aimed at identifying biomarkers for the evaluation of the receptive endometrium have yielded a considerable amount of potential marker candidates, the search for best markers is ongoing.

In this study, we gave an overview of common causes of infertility, the menstrual cycle and changes that occur in the endometrium during that time, endometrial receptivity and how it can be evaluated and previous studies conducted on endometrial gene expression. The main aim of this thesis was to validate transcriptomic markers for evaluating endometrial receptivity.

As a result of RT-qPCR analyses, 8 housekeeping genes were confirmed as good reference genes for studying the gene expression of endometrial tissue. The higher expression of 10 genes, 5 stromal-specific and 5 epithelium-specific genes, was confirmed in the receptive phase with RT-qPCR method, both in endometrium whole tissue and FACS cell populations which confirms their applicability as markers of endometrial receptivity. As a result of the immunohistochemical analyse, the protein levels of the endometrium stromal-specific gene RGS16, were not detected.

Identifying and validating new markers for the evaluation of endometrial receptivity is important for improving our knowledge about achieving the receptive state of the endometrium and giving new potential genes for developing diagnostic tools used in clinical practice.

This study was carried out in the Competence Centre of Health Technologies.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid Merli Saaret ja Ants Kurge võimaluse eest teostada oma magistritöö nii huvitaval teemal. Eriti suured tänusõnad sooviksin anda Merli Saarele mõistva ja abistava suhtumise, kannatlikuse ning näpunäidete eest antud lõputöö valmimisel. Lisaks tahan tänada Külli Samueli, kes oli abiks immunohistokeemiliste katsete teostamisel.

Viimasena läheb suur tänu perekonnale, kelle toetavate sõnadega töö valmis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdallah, Y., Naji, O., Saso, S., Pexsters, A., Stalder, C., Sur, S., ... Bourne, T. (2012). Ultrasound assessment of the peri-implantation uterus: a review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 39(6), 612–619. <https://doi.org/10.1002/uog.10098>
- 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>
- Aghajanova, L., Hamilton, A. E., & Giudice, L. C. (2008). Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.10.008>
- Allegra, A., Marino, A., Peregrin, P. C., Lama, A., García-Segovia, Á., Forte, G. I., ... Volpes, A. (2012). Endometrial expression of selected genes in patients achieving pregnancy spontaneously or after ICSI and patients failing at least two ICSI cycles. *Reproductive BioMedicine Online*, 25(5), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.07.019>
- Altmae, S., Martinez-Conejero, J. A., Salumets, A., Simon, C., Horcajadas, J. A., & Stavreus-Evers, A. (2010). Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Molecular Human Reproduction*, 16(3), 178–187. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap102>
- Beier, H., & Beier-Hellwig, K. (1998). Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, 4(5), 448–458. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.5.448>
- Boggavarapu, N. R., Lalitkumar, S., Joshua, V., Kasvandik, S., Salumets, A., Lalitkumar, P. G., & Gemzell-Danielsson, K. (2016). Compartmentalized gene expression profiling of receptive endometrium reveals progesterone regulated ENPP3 is differentially expressed and secreted in glycosylated form. *Scientific Reports*, 6(1), 33811. <https://doi.org/10.1038/srep33811>
- Borthwick, J. M., Charnock-Jones, D. S., Tom, B. D., Hull, M. L., Teirney, R., Phillips, S. C., & Smith, S. K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 9(1), 19–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529417>
- Brown, T. L., Moulton, B. C., Baker, V. V, Mira, J., & Harmony, J. A. (1995). Expression of

- apolipoprotein J in the uterus is associated with tissue remodeling. *Biology of Reproduction*, 52(5), 1038–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626703>
- Carson, D. D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M. C., Vernon, M., ... Lessey, B. (2002). Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Molecular Human Reproduction*, 8(9), 871–879. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.9.871>
- Child, T. J., Gulekli, B., Sylvestre, C., Tan, S. L., Vanrell, J., & Balasch, J. (2003). Ultrasonographic assessment of endometrial receptivity at embryo transfer in an in vitro maturation of oocyte program. *Fertility and Sterility*, 79(3), 656–658. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04811-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04811-2)
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alamá, P., Pellicer, A., & Simón, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and Sterility*, 95(1), 50–60.e15. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.063>
- Díaz-Gimeno, P., Ruíz-Alonso, M., Blesa, D., & Simón, C. (2014). Transcriptomics of the human endometrium. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(2-3-4), 127–137. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130340pd>
- Dimitriadis, E., Nie, G., Hannan, N. J., Paiva, P., & Salamonsen, L. A. (2010). Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3), 313–22. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082772ed>
- Edgell, T. A., Rombauts, L. J. F., & Salamonsen, L. A. (2013). Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(5), 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.014>
- Evans, G. E., Martínez-Conejero, J. A., Phillipson, G. T. M., Simón, C., McNoe, L. A., Sykes, P. H., ... Evans, J. J. (2012). Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation. *Fertility and Sterility*, 97(6), 1365–1373.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.007>
- Fadare, O., & Zheng, W. (2005). Histologic dating of the endometrium: accuracy, reproducibility, and practical value. *Advances in Anatomic Pathology*, 12(2), 39–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731571>
- Fassbender, A., Burney, R. O., F. O, D., D’Hooghe, T., Giudice, L., & Giudice, L. (2015).

- Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *BioMed Research International*, 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/130854>
- Ferraretti, A. P., Goossens, V., Kupka, M., Bhattacharya, S., de Mouzon, J., Castilla, J. A., ... Baranowski, R. (2013). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 28(9), 2318–2331. <https://doi.org/10.1093/humrep/det278>
- Garrido-Gómez, T., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Diaz-Gimeno, P., Vilella, F., & Simón, C. (2013). Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.005>
- Gelbaya, T. A., Potdar, N., Jeve, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(2), 109–115. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000043>
- Germeyer, A., Capp, E., Schlicksupp, F., Jauckus, J., von Rango, U., von Wolff, M., & Strowitzki, T. (2013). Cell-type specific expression and regulation of apolipoprotein D and E in human endometrium. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 170(2), 487–491. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.06.043>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- Giudice, L. C. (2004). Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *American Journal of Pharmacogenomics: Genomics-Related Research in Drug Development and Clinical Practice*, 4(5), 299–312. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15462608>
- Giudice, L. C. (2006). Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes. *Reprod Biol Endocrinol*, 4 Suppl 1, S4. Journal Article. <https://doi.org/1477-7827-4-S1-S4> [pii]10.1186/1477-7827-4-S1-S4
- Gómez, E., Ruíz-Alonso, M., Miravet, J., & Simón, C. (2015). Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a022996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022996>
- Haller-Kikkatalo, K., Altmäe, S., Tagoma, A., Uibo, R., & Salumets, A. (2014). Autoimmune activation toward embryo implantation is rare in immune-privileged human endometrium. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(5), 376–84. <https://doi.org/10.1055/s-0034->

- Hannan, N. J., & Salamonsen, L. A. (2007). Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *19*(3), 266–272. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e328133885f>
- Haouzi, D., Assou, S., Mahmoud, K., Tondeur, S., Reme, T., Hedon, B., ... Hamamah, S. (2009). Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Human Reproduction*, *24*(6), 1436–1445. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep039>
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). *The Menstrual Cycle*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1135*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
- Hershko-Klement, A., & Tepper, R. (2016). Ultrasound in assisted reproduction: a call to fill the endometrial gap. *Fertility and Sterility*, *105*(6), 1394–1402.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.012>
- Horcajadas, J. A., Mínguez, P., Dopazo, J., Esteban, F. J., Domínguez, F., Giudice, L. C., ... Simón, C. (2008). Controlled Ovarian Stimulation Induces a Functional Genomic Delay of the Endometrium with Potential Clinical Implications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *93*(11), 4500–4510. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0588>
- Horcajadas, J. A., Pellicer, A., & Simon, C. (2006). Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Human Reproduction Update*, *13*(1), 77–86. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml046>
- Hu, S., Yao, G., Wang, Y., Xu, H., Ji, X., He, Y., ... Sun, Y. (2014). Transcriptomic Changes During the Pre-Receptive to Receptive Transition in Human Endometrium Detected by RNA-Seq. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *99*(12), E2744–E2753. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2155>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, *21*(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Jones, R. E. (Richard E., & Lopez, K. H. (n.d.). *Human reproductive biology*.
- Jose-Miller, A. B., Boyden, J. W., & Frey, K. A. (2007). Infertility. *American Family Physician*, *75*(6), 849–856. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390595>
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., ... European Association of Urology Working Group on Male Infertility. (2012). European Association

- of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
- Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., ... Giudice, L. C. (2002). Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation. *Endocrinology*, 143(6), 2119–2138. <https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8885>
- Karim, Z. A., Alshbool, F. Z., Vemana, H. P., Conlon, C., Druey, K. M., & Khasawneh, F. T. (2016). CXCL12 regulates platelet activation via the regulator of G-protein signaling 16. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(2), 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.028>
- 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>
- Klentzeris, L. D., Bulmer, J. N., Trejdosiewicz, L. K., Morrison, L., & Cooke, I. D. (1993). Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 8(8), 1223–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691869>
- Koler, M., Achache, H., Tsafirir, A., Smith, Y., Revel, A., & Reich, R. (2009). Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Human Reproduction*, 24(10), 2541–2548. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep193>
- Konrad, L., Hackethal, A., Oehmke, F., Berkes, E., Engel, J., & Tinneberg, H.-R. (2016). Analysis of Clusterin and Clusterin Receptors in the Endometrium and Clusterin Levels in Cervical Mucus of Endometriosis. *Reproductive Sciences*, 23(10), 1371–1380. <https://doi.org/10.1177/1933719116641756>
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., & Pollard, J. W. (2010). Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium1. *Biology of Reproduction*, 82(4), 791–801. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>
- L. Stewart, C. (1994). Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 39(2), 233–238. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080390217>
- Lédée-Bataille, N., Laprée-Delage, G., Taupin, J.-L., Dubanchet, S., Frydman, R., & Chaouat,

- G. (2002). Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *17*(1), 213–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756390>
- Lédée, N., Munaut, C., Aubert, J., Sérazin, V., Rahmati, M., Chaouat, G., ... Foidart, J. M. (2011). Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failures (IF) or recurrent miscarriages. *The Journal of Pathology*, *225*(4), 554–564. <https://doi.org/10.1002/path.2948>
- Lee, S., Hong, S.-W., Min, B.-H., Shim, Y.-J., Lee, K.-U., Lee, I.-K., ... Park, I.-S. (2011). Essential role of clusterin in pancreas regeneration. *Developmental Dynamics*, *240*(3), 605–615. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22556>
- Lessey, B. A. (2000). Endometrial receptivity and the window of implantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *14*(5), 775–788. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0118>
- Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M., & Buck, C. A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *The Journal of Clinical Investigation*, *90*(1), 188–95. <https://doi.org/10.1172/JCI115835>
- Li, Y., Lin, H., Li, Y., & Cao, J. (2011). Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertility and Sterility*, *95*(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.031>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lobo, S. C., Huang, S.-T. J., Germeyer, A., Dosiou, C., Vo, K. C., Tulac, S., ... Giudice, L. C. (2004). The Immune Environment in Human Endometrium during the Window of Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, *52*(4), 244–251. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00217.x>
- Lopata, A., Martin, M., Oliva, K., & Johnston, I. (1982). Embryonic development and blastocyst implantation following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*, *38*(6), 682–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7141009>
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, N.Y.)*, *240*(4852), 622–30. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283935>

Marieb, E. N., & Hoehn, K. (n.d.). *Anatomy & physiology*.

Martín, J., Domínguez, F., Avila, S., Castrillo, J. L., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2002). Human endometrial receptivity: gene regulation. *Journal of Reproductive Immunology*, 55(1–2), 131–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062828>

Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>

Mazur, M. T., & Kurman, R. J. (2005). *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-26321-2>

Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J. I., Williams, S., ... Oehninger, S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Human Reproduction*, 20(8), 2104–2117. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei051>

Murray, M. J., Meyer, W. R., Zaino, R. J., Lessey, B. A., Novotny, D. B., Ireland, K., ... Fritz, M. A. (2004). A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and Sterility*, 81(5), 1333–1343. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.030>

Noyes, R. W., Hertig, A. T., & Rock, J. (1950). Dating the Endometrial Biopsy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 5(4), 561–564. Retrieved from http://journals.lww.com/obgynsurvey/Citation/1950/08000/DATING_THE_ENDOMETRIAL_BIOPSY_.44.aspx

Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction Update*, 14(6), 605–621. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn042>

Othman, R., Omar, M. H., Shan, L. P., Shafiee, M. N., Jamal, R., & Mokhtar, N. M. (2012). Microarray profiling of secretory-phase endometrium from patients with recurrent miscarriage. *Reproductive Biology*, 12(2), 183–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850470>

Pal, L., & Santoro, N. (2003). Age-related decline in fertility. *Endocrinology and Metabolism*

- Clinics of North America*, 32(3), 669–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560893>
- Paria, B. ., Lim, H., Das, S. ., Reese, J., & Dey, S. . (2000). Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(2), 67–76. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0153>
- Pauerstein, C. J., Eddy, C. A., Croxatto, H. D., Hess, R., Siler-Khodr, T. M., & Croxatto, H. B. (1978). Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 130(8), 876–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/416719>
- Ponnampalam, A. P., Weston, G. C., Trajstman, A. C., Susil, B., & Rogers, P. A. W. (2004). Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Molecular Human Reproduction*, 10(12), 879–893. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah121>
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2006). Optimal evaluation of the infertile female. *Fertility and Sterility*, 86(5), S264–S267. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.041>
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Reed, B. G., & Carr, B. R. (2000). *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905282>
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J. A., Polman, J., Pellicer, A., ... Simón, C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Molecular Human Reproduction*, 9(5), 253–264. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag037>
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J. A., Polman, J., Pellicer, A., ... Simón, C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Molecular Human Reproduction*, 9(5), 253–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728018>
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., & Simón, C. (2012). The genomics of the human endometrium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1931–1942.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.004>

- Sadro, C. T. (2016). Imaging the Endometrium: A Pictorial Essay. *Canadian Association of Radiologists Journal*, 67(3), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.carj.2015.09.012>
- Salamonsen, L., Hannan, N., & Dimitriadis, E. (2007). Cytokines and Chemokines during Human Embryo Implantation: Roles in Implantation and Early Placentation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25(6), 437–444. <https://doi.org/10.1055/s-2007-991041>
- Silber, S. J., & Barbey, N. (2012). Scientific molecular basis for treatment of reproductive failure in the human: An insight into the future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1981–1996. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.004>
- Simmen, F. A., & Simmen, R. C. M. (2006). Orchestrating the Menstrual Cycle: Discerning the Music from the Noise. *Endocrinology*, 147(3), 1094–1096. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1451>
- Simón, C., Gimeno, M. J., Mercader, A., O'Connor, J. E., Remohí, J., Polan, M. L., & Pellicer, A. (1997). Embryonic Regulation of Integrins β_3 , α_4 , and α_1 in Human Endometrial Epithelial Cells *in Vitro*¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(8), 2607–2616. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.8.4153>
- Spencer, T. E., Hayashi, K., Hu, J., & Carpenter, K. D. (2005). Comparative Developmental Biology of the Mammalian Uterus. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 68, pp. 85–122). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)68004-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)68004-0)
- Speroff, L., Glass, R. H., & Kase, N. G. (1999). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from https://books.google.ee/books/about/Clinical_Gynecologic_Endocrinology_and_I.html?id=yORsAAAAMAAJ&redir_esc=y
- Stevens, F. C. (1983). Calmodulin: an introduction. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 61(8), 906–910. <https://doi.org/10.1139/o83-115>
- Sun, X., Charbonneau, C., Wei, L., Chen, Q., & Terek, R. M. (2015). miR-181a Targets RGS16 to Promote Chondrosarcoma Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Molecular Cancer Research*, 13(9), 1347–1357. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0697>
- Talbi, S., Hamilton, A. E., Vo, K. C., Tulac, S., Overgaard, M. T., Dosiou, C., ... Giudice, L. C. (2006). Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women.

Endocrinology, 147(3), 1097–1121. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1076>

- Tapia, A., Vilos, C., Marin, J. C., Croxatto, H. B., & Devoto, L. (2011). Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 9, 14. Journal Article. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-14>
- Timeva, T., Shterev, A., & Kyurkchiev, S. (2014). Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *Journal of Reproduction & Infertility*, 15(4), 173–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473625>
- Tonsiver, T., Ehrenberg, A., Ringmets, I., Saare, K., Lepik, K., & Kiivet, R.-A. (2013). Kehavälise viljastamise efektiivsus ja kulud Eestis. *Tartu Ülikool, Tervisehoiu Instituut*. Retrieved from <http://rahvatervis.ut.ee/handle/1/5682>
- van der Gaast, M. H., Beier-Hellwig, K., Fauser, B. C. J. M., Beier, H. M., & Macklon, N. S. (2003). Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates. *Reproductive Biomedicine Online*, 7(1), 105–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930588>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002a). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002b). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>
- Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2013). Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(5), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>
- Vilella, F., Ramirez, L. B., & Simón, C. (2013). Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.026>
- Vogiagis, D., Marsh, M. M., Fry, R. C., & Salamonsen, L. A. (1996). Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *The Journal of Endocrinology*, 148(1), 95–102. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1480095>

- von Grothusen, C., Lalitkumar, S., Rao Boggavarapu, N., Gemzell-Danielsson, K., & Lalitkumar, P. G. (2014). Recent Advances in Understanding Endometrial Receptivity: Molecular Basis and Clinical Applications. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(2), 148–157. <https://doi.org/10.1111/aji.12226>
- Xie, Z., Chan, E. C., & Druey, K. M. (2016). R4 Regulator of G Protein Signaling (RGS) Proteins in Inflammation and Immunity. *The AAPS Journal*, 18(2), 294–304. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9847-0>
- Yang, I. V. (2006). [4] Use of External Controls in Microarray Experiments. In *Methods in enzymology* (Vol. 411, pp. 50–63). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)11004-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)11004-6)
- Zerbinatti, C. V, Mayer, L. P., Audet, R. G., & Dyer, C. A. (2001). Apolipoprotein E is a putative autocrine regulator of the rat ovarian theca cell compartment. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1080–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259253>
- Zhang, D., Sun, C., Ma, C., Dai, H., & Zhang, W. (2012). Data Mining of Spatial-Temporal Expression of Genes in the Human Endometrium During the Window of Implantation. *Reproductive Sciences*, 19(10), 1085–1098. <https://doi.org/10.1177/1933719112442248>
- Ylikorkala, O., Kauppila, A. (2008). II Hormonaalsed häired ja muud haigused p. 62, 79. *Sünnitusabi ja günekoloogia*. Tallinn: AS Medicina.

KASUTATUD VEEBILEHED

www.bioinfo.ut.ee/genometester

www.primer3.ut.ee

www.proteinatlas.org

Lisa 1. Endomeetriumi retseptiivsusega seotud geeniekspressiooni uuringud

<i>Autorid ja aasta</i>	<i>Proovide aeg</i>	<i>Võrdlus (faas)</i>	<i>Üles- ja alla-reguleeritud geenid</i>
Terved viljakad patsiendid			
Borthwick jt. 2003	p 9-11, LH+6-8	Kesk-sekretoorne vs. proliferatiivne	↑90 ↓46
Carson jt. 2002	LH+2-4, LH+7-9	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑323 ↓370
Haouzi jt. 2009	LH+2, LH+7	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑945 ↓67
Kuokkanen jt. 2010	p 11-13	Kesk-sekretoorne vs. proliferatiivne	↑2206 ↓1038
Mirkin jt. 2005	LH+3, LH+8	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑49 ↓58
Ponnampalam jt. 2004	Terve tsükkel	Terve tsükkel	↑425 ↓-
Riesewijk jt. 2003	LH+2, LH+7	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑153 ↓58
Talbi jt. 2006	Vara-sekretoorne, kesk-sekretoorne	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑1415 ↓1463
Diaz-Gimeno jt. 2011	LH+1, LH+3, LH+5, LH+7	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑143 ↓95
Hu jt. 2014	LH+1, LH+2, LH+7	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑1099 ↓1273
Viljatud/viljakad patsiendid			
Altmäe jt. 2010	p 7, LH+7	Kesk-sekretoorne vs. proliferatiivne	↑920 ↓1257
Koler jt. 2009	p 21	Viljakad vs. viljatud naised	↑25 ↓288
Stimuleeritud tsükkel			
Kao jt. 2002	p 8-10, LH+8-10	Kesk-sekretoorne vs. proliferatiivne	↑156 ↓377
Horcajadas jt. 2008	LH+1, LH+9	Vara-sekretoorne vs. kesk-sekretoorne	↑133 ↓218
Korduv implantatsiooni ebaõnnestumine või raseduse katkemine			
Othman jt. 2012	Sekretoorne faas	Viljakad vs korduva raseduse katkemisega naised	↑175 ↓171
Lédée jt. 2011	Kesk-sekretoorne faas	Viljakad vs korduva raseduse katkemise või implantatsiooni häirega	↑↓ 2477

p-menstruaaltsükli päev

Lisa 2. Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Grete-Katariine Kuum

(sünnikuupäev: 27.01.1993)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Uudsed transkriptoomi markerid endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks, mille juhendajad on Merli Saare ja Ants Kurg

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2017