МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ

ПЛЕВЕН

Факултет „Медицина“

Катедра „Анатомия, хистология, цитология, биология“

Сектор „Биология“

Нина Пекова Айвазова

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ММР-2, ММР-9 И ТЕХНИТЕ ИНХИБИТОРИ, КАТО БИОМАРКЕРИ ЗА КАЧЕСТВОТО НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ И ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИТЕ ЕМБРИОНИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен

„Доктор“

по научна специалност „Медицинска биология“

Шифър 4.3

Научен ръководител: ***Доц. Милена Атанасова***

Официални рецензенти:

Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, д.м.н.

Доц. Милена Истилянова Мурджева-Андонова, д.б.

ПЛЕВЕН, 2021

Дисертационният труд съдържа 141 страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел, Задачи, Материали и методи, Резултати от собствени проучвания, Дискусия, Обобщени изводи, Заключение и Приноси. Илюстриран е с 19 таблици и 40 фигури. Библиографската справка включва 268 източника на латиница.

Включените в дисертациионния труд изследвания са извършени в:

Медицински център „Клиничен институт по репродуктивна медицина" – Плевен

Сектор „Биология" на Медицински университет – Плевен

Работата по дисертационния труд е финансирана от нучно-изследователски проекти на Медицински университет – Плевен:

D3/2017 „Функционален анализ на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от периовулторни фоликули при жени, подложени на in vitro оплождане и определяне на активността на ензимите в кондиционирани среди вследствие култивиране на човешки предимплантационни ембриони"

D2/2018: „Експресионни нива и активности на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от човешки периовулаторни фоликули и в кондиционирани среди от човешки предимплантационни ембриони".

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология" Медицински университет – Плевен, проведен на 26.01.2021 год. Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.06.2021 год. от 12:00 ч., в зала „Амброаз Паре" на Медицински университет – Плевен.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (http://www.mu-pleven.bg)

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ 3
II. ЦЕЛ 4
III. ЗАДАЧИ 4
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 4
1.1. Материали: Пациенти и биологични течности 4
2. Методи 5
2.1. Определяне активността на MMP-2 и MMP-9 чрез зимография. 5
2.2. Определяне на концентрацията на MMP-2, MMP-9, TIMP-1 и TIMP-2 във фоликулни течности и културелни среди 5
2.3. Статистически анализ 5
V. РЕЗУЛТАТИ 5
1. Резултати от желатинова зимография за MMP-2 и MMP-9 протеазна активност във фоликулни аспирати. 5
1.1. Статистически анализ на получените резултати 8
1.2. Активност на MMP и степен на експанзия на кумулус-оофорните комплекси 8
1.3. Активност на MMP и степен на зрялост на яйцеклетките 10
1.4. Активност на MMP и морфология на яйцеклетките 12
2. Резултати от ELISA за определяне на концентрацията на MMP-2, MMP-9 и техните инхибитори TIMP-1 и TIMP-2 във фоликулни течности. 22
2.1. Зависимост на степента на зрялост на яйцеклетките и концентрацията на MMP-2 и MMP-9 23
2.2. Дефекти в размера на ПВП 25
2.3. Фрагменти в ПВП 26
2.4. Цитоплазмени дефекти 28
2.5. Морфология на полярното телце 31
2.6. Опложданe 32
2.7. Качество на предимплантационните ембриони 34
2.8. Резултат от процедурата 34
2.9. Изход от бременността 35
3. Концентрация на MMP в среди от култивирани предимплантационни ембриони 36
3.1. Разпределение на данните 36
3.2. Качество на ембрионите и концентрация на MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в културелни среди. 37
3.3. Концентрация на MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, изход от култивирането и резултат от процедурата 38
VI. ДИСКУСИЯ 39
VII. ИЗВОДИ 51
VIII. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 52
IX. ПРИЛОЖЕНИЯ 53

I. Въведение

Основната функция на човешкия яйчник е продукцията на яйцеклетки, годни за оплождане. Развитието на фоликулите, руптурирането на фоликулната стена, образуването на жълто тяло и лутеолизата изискват обширно ремоделиране на тъканите и екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ), клетъчна миграция и бърза ангиогенеза. Комплекси от компоненти на ЕЦМ се откриват отложени между гранулозните клетки, като по този начин внасят полярност и поддържат функционалната специализация на гранулозния слой клетки, и осигуряват регулирано навлизане на протеини във вътре-фоликулната среда. Съставът и интегритетът на ЕЦМ регулира формата на клетките, комуникацията помежду им, стероидогенезата. Реорганизацията на ЕЦМ изисква координираното действие на протеази и протеазни инхибитори. Въпреки че ролята на матриксните металопротеинази (MMP) в тъканното ремоделиране на яйчника по време на фоликулогенезата е добре проучена, все още е неясна връзката между активността на тези ензими и техните инхибитори (TIMP) от една страна, и стареенето на яйцеклетките от друга. MMP-TIMP системата участва в протеолитичната мрежа на фоликулното развитие и руптурирането на стената на фоликула при успешна овулация. Дисбалансът в секрецията на MMP/TIMP е свързан със състояния на нарушена овариална функция, като поликистозен овариален синдром и менопауза. В основата на най-широко прилаганата биотехнология за асистирана репродукция при пациенти с репродуктивни проблеми лежи успешното взаимодействие на гаметите (сперматозоиди и яйцеклетки) в условия на *in vitro* оплождане. Това взаимодействие се осъществява с участието на специфични клетъчни и извънклетъчни фактори, свързани с гаметите, с репродуктивния тракт, както и с обкръжаващата ги среда. По-доброто разбиране на факторите, участващи във взаимодействието между ембрионите и ендометриума по време на ранното ембрионално развитие, би допринесло за увеличаване на успеваемостта от процедурите по асистирана репродукция. Бъдещите търсения в тази област са насочени към откриването на точен маркер, свързан с качеството на яйцеклетките и ембрионите, което би било важно за успеха на асистираната репродукция.

II. Цел

Тъй като ролята на ММР в безплодието при жената, както и по време на КОХС при прилагане на АРТ при хора все още не е напълно изяснена, в настоящото проучване си поставихме задача да оценим връзката между активността и концентрацията на ММР (ММР-2 и ММР-9) и TIMP (TIMP-1 и TIMP-2) във фоликулна течност и зрелостта и морфологията на яйцеклетките, както и качеството на получените след оплождане ембриони. Целта ни бе да установим дали нивата на експресия на ММР във фоликулната течност и среди от култивирани ембриони, са надеждни маркери за прогнозиране на качеството на яйцеклетките и селекция на ембриони за извършване на ембриотрансфер.

III. Задачи

Във връзка с постигане на така формулираната цел си поставихме следните задачи:

- Подбор на критерии за оценка морфологията и качеството на яйцеклетки и ембриони получени в резултат на АРТ след проведена КОХС;
- Установяване ензимната активност на ММР-2 и ММР-9 във фоликуларни течности;
- Определяне концентрацията на ММР2, ММР-9, TIMP-1 и TIMP-2 във фоликуларни течности;
- Определяне концентрацията на ММР-2 и ММР-9 в среди от култивирани ембриони;
- Статистически анализ на получените резултати.

IV. Материали и методи

1.1. Материали: Пациенти и биологични течности

Изследванията бяха проведени върху 149 фоликулни течности и 54 среди от култивирани до пети ден ембриони, от 33 пациенти, които бяха подложени на КОХС и последващо инвитро оплождане по метода ICSI, за периода 2017-2019 г. За всяка яйцеклетка беше проследен и описан резултатът от оплождането,

развитието и качеството на получените предимплантационни ембриони, както и изходът от процедурата. Бяха събирани само бистри фоликулни аспирати, без кръв.

2. Методи

2.1. Определяне активността на MMP-2 и MMP-9 чрез зимография.

За идентифициране и определяне на ензимната активност на металопротеинази MMP2 и MMP9 беше използвана желатинова зимография.

2.2. Определяне на концентрацията на MMP-2, MMP-9, TIMP-1 и TIMP-2 във фоликулни течности и културелни среди

Бяха използвани китове от фирмата „Elabscience", които определят концентрация на металопротеиназите и техните инхибитори на принципа на сандвич ELISA.

2.3. Статистически анализ

За статистически анализ на експерименталните данни беше използвана описателна статистика, както и следните параметрични и непараметрични тестове:

- Тест за нормалност на разпределението (Shapiro-Wilk W test);
- Тест за анализ на вариацията (Kruskal-Wallis);
- Тест за различия между две групи (Mann-Whitney U test);
- One Way ANOVA и Post-hoc тест (LSD);
- Тест за различия между две групи (Student's t-test).

V. Резултати

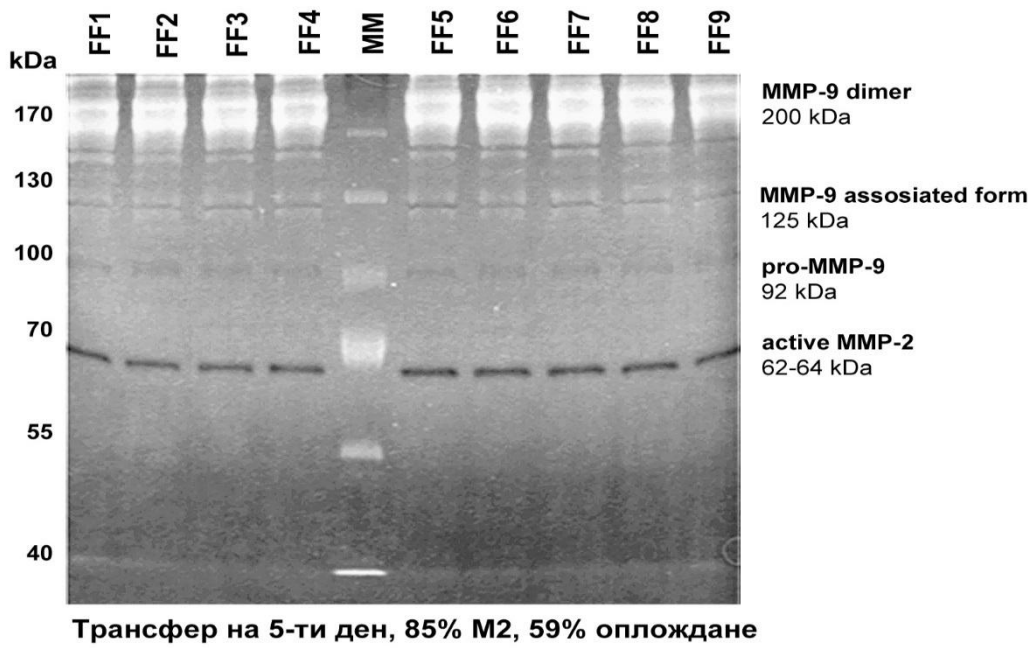
1. Резултати от желатинова зимография за MMP-2 и MMP-9 протеазна активност във фоликулни аспирати.

При проведеното първоначално проучване бяха изследвани 74 фоликулни течности. Ензимната активност на двете желатинази, MMP-2 и MMP-9, беше проследена чрез желатинова зимография, която разкрива активността на латентните проензими и тази на вече активираните желатинази. Желатинолитичните ивици във всяка проба бяха идентифицирани на базата на тяхното молекулно тегло съгласно използвания маркер и таблица на Youssepf

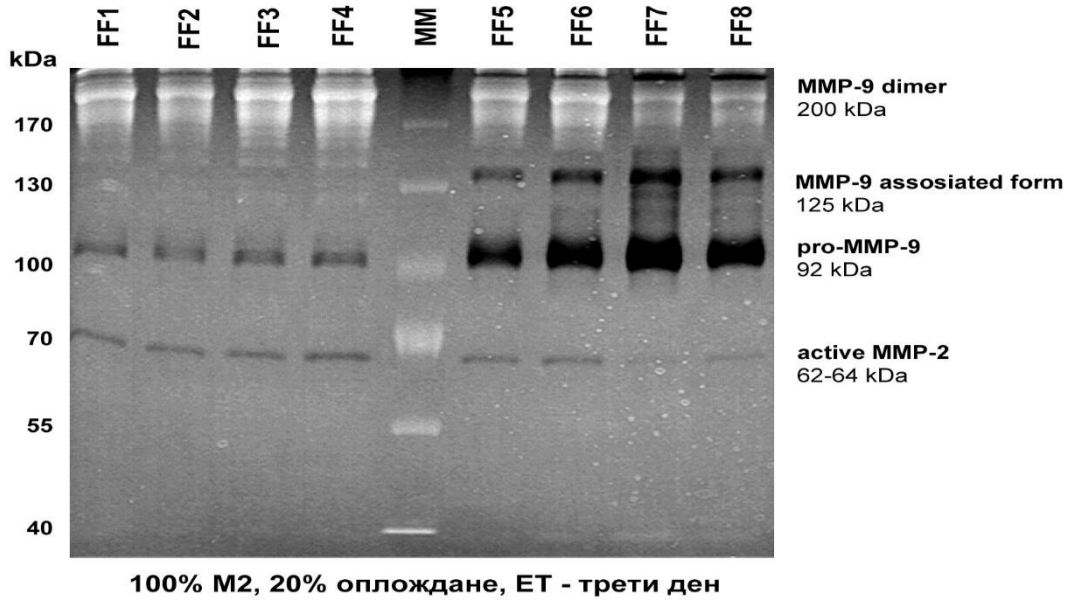
Farhat, protocol-plase.com, last update5/10/13. Получените стойности на ензимната активност на ММР-2 и 9 бяха разпределени в групи в зависимост от сравняваните показатели, а именно: степен на експанзия на кумулус-оофорния комплекс (СОС), зрялост на яйцеклетката, дефекти в зона пелуцида (ЗП), перивителинното пространство (ПВП), цитоплазмата на яйцеклетката, както и морфологията на полярното телце (ПТ). За всяка яйцеклетка беше проследен и описан резултата от оплождането, развитието и качеството на получените предимплантационни ембриони, както и изхода от процедурата. При почти всички изследвани фоликулни течности беше установена желатинолитична активност на ММР-2 и ММР-9 в различна степен. Ензимната активност на всяка проба беше отчитана в относителни единици с програмата Image J. Основните форми на изследваните ензими, които се установяват са 200 кDa ММР-9 димер, 125 kDa ММР-9 асоцииран с 25 kDa микроглобулин, 92 kDa pro-ММР-9, 82 kDa act-ММР-9 и 62-64 kDa act-ММР-2 (Таблица 1).

Таблица 1. Желатинова зимография – интерпретация на бандовете. Модифицирана по Youssepf Farhat, protocol-plase.com, last update5/10/13

Молекулно тегло (kDa)	**Интерпретация**
240	ММР мултимер
215	ММР-9 димер, асоцииран с 25-kDa микроглобулин
~200	ММР-9 димер
180	ММР-9 димер (Chemicon International gelatinase zymography standards, #CC073)
~140-144	ММР-2 димер
125	ММР-9 асоцииран с 25-kDa микроглобулин
92	Про -ММР-9
82	Активен ММР-9
72	Про-ММР-2
67-68	Активен ММР-9
62	Активен ММР-2
58	Акитвен ММР-2



Фигура 1. Желатинолитична активност при пациент с висок процент зрели яйцеклетки от общия пул, както и задоволителен процент оплождане, като се наблюдава изразено по-висока активност на act-MMP-2 в сравнение с MMP-9.

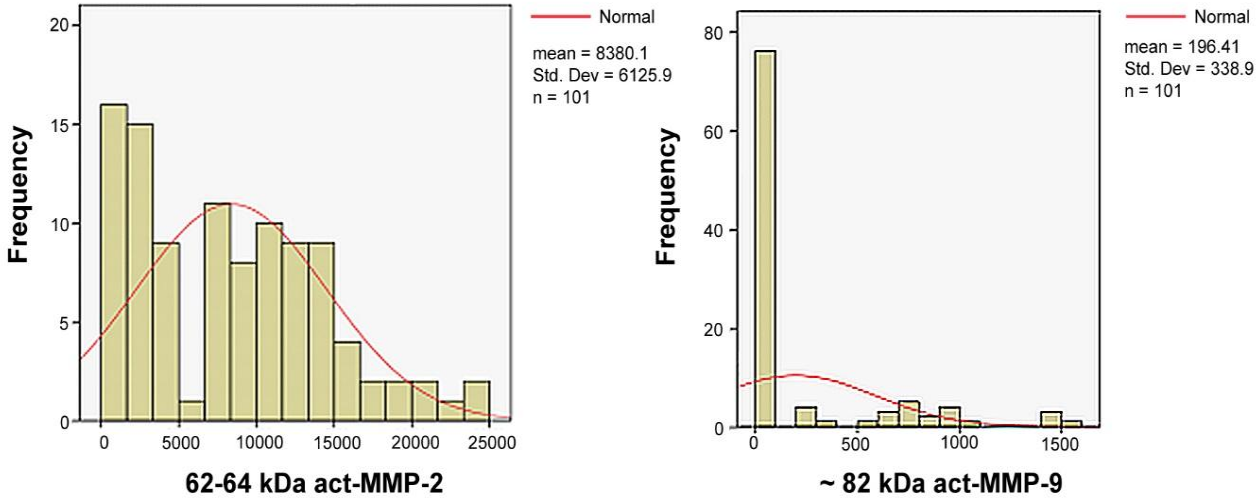


Фигура 2. Желатинолитична активност при пациент със 100% зрели яйцеклетки, но много нисък процент на оплождане. Наблюдава се силно изразена активност на pro-MMP-9 в сравнение с act-MMP-2.

1.1. Статистически анализ на получените резултати

Нормалност на разпределението

Всички параметри бяха тествани за нормалност на разпределението чрез Shapiro-Wilk W test. При достоверност на теста ($p<0.05$) нулевата хипотеза за нормално разпределение се отхвърля, т.е. разпределението на данните е различно от нормалното. Разпределението при изследваните количествени променливи достоверно се отличаваше от нормалното, което наложи използването на непараметрични тестове за анализ.



Фигура 3. Хистограма за разпределението на данните, получени за активността на активната форма на MMP-2 и MMP-9. Наблюдава се значително разминаване между разпределението в реалните експериментални данни и нормалното разпределение.

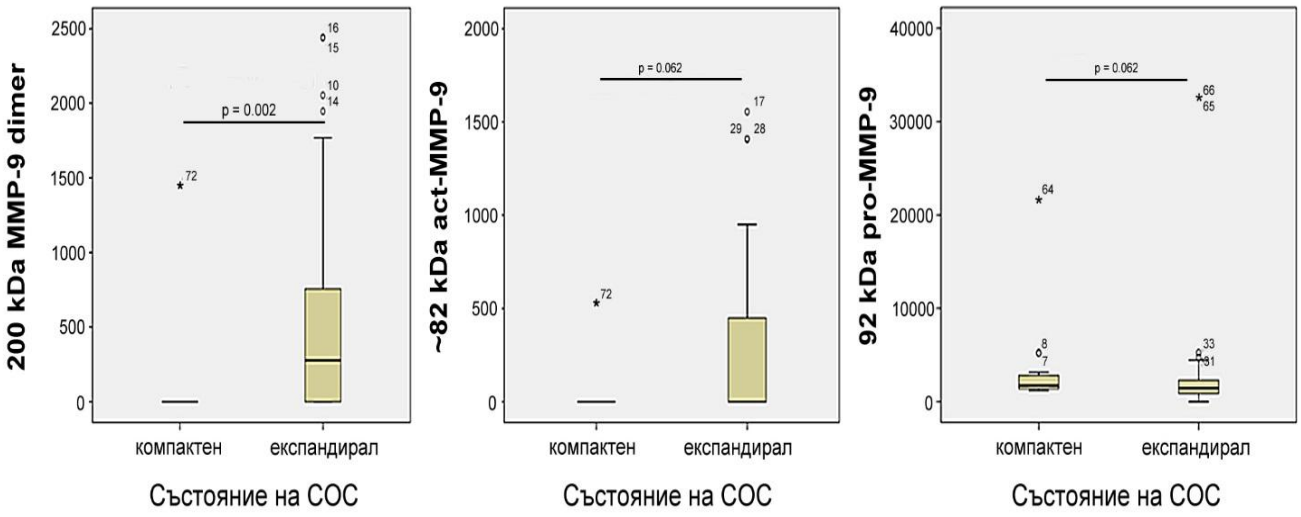
1.2. Активност на MMP и степен на експанзия на кумулус-ооформните комплекси

При изследване активността на MMP във фоликулни течности и връзката им със степента на експандиране на COC получените резултати бяха разпределени в две групи – фоликулни течности с овоцити с компактен COC и такива с експандирал COC. При тестване на различията между групите с Mann-Whitney U test, бяха установени следните зависимости: Наблюдават се

сигнификантни различия в ензимната активност на MMP-9 димер (200 kDa), (p=0.002), като тя е значително по-висока в случаите, когато COC е експандирал. По отношение на активността на act-MMP-9 (82 kDa) и pro-MMP-9 (92 kDa), се наблюдава тенденция близка до сигнификантната, като активността на act-MMP-9 е по-висока в групата с експандирал кумулусен комплекс (p=0,062), докато активността на pro-MMP-9 е по-ниска във фолукиларните течности с експандирали COC (p=0.062) (Фиг. 4). Всички дадени по-долу бокс-плот диаграми представят медианата, данните между 25% и 75%, минималната и максималната стойност.

Таблица 2. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test). Достоверните различия са маркирани в сиво.

Променлива	**Компактен COC (n)**	**Експандирал COC (n)**	**P**
200 kDa MMP-9димер	13	60	0,002
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	13	60	0,447
92 kDa pro-MMP-9	13	60	0,062
~82 kDa act-MMP-9	13	60	0,062
62-64 kDa act-MMP-2	13	60	0,936



Фигура 4. Бокс-плот диаграми, на ензимната активност на ММР-9 димер, act-ММР-9 и pro-ММР-9 в зависимост от степента на експадиране на СОС.

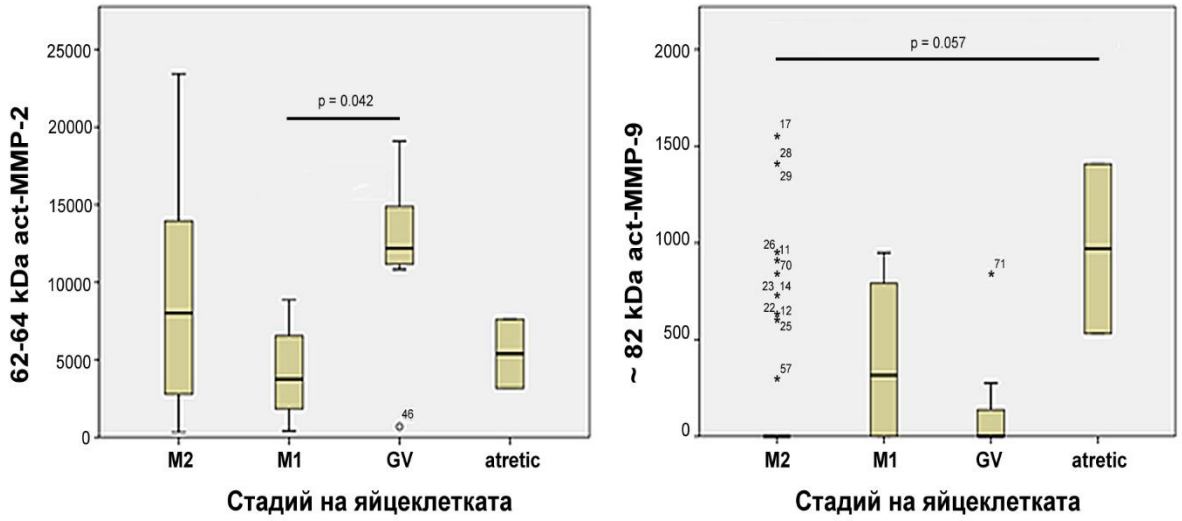
1.3. Активност на ММР и степен на зрялост на яйцеклетките

При проведения анализ на вариацията (Kruskal-Wallis) между групите с различна степен на зрялост на яйцеклетките бяха установени различия ($p<0,05$) по отношение на ~82 kDa act-ММР-9. Различията между всеки две от групите бяха анализирани чрез Mann-Whitney U test, в резултат на който беше установена значително по-висока ензимна активност на act-ММР-2 при силно незрели яйцеклетки в профаза I (герминални везикули, GV), в сравнение с яйцеклетки с интермедиерна степен на зрялост (метафаза I, M1) ($p=0,042$). Не бяха установени значими разлики в активността на ензима при сравняване на зрели (метафаза II, M2) и незрели яйцеклетки. Във фоликулни течности, съдържащи атретични яйцеклетки се наблюдава зависимост, близка до сигнификантната ($p=0,057$) на по-силно изразена активност на act-ММР-9 в сравнение с тези, съдържащи M2 яйцеклетки (фиг. 5, табл. 3).

Таблица 3. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от степента на зрялост на яйцеклетките

Променлива	**Степен на зрялост на яйцеклетката**		**P**
200 kDa ММР-9димер	M2	M1	0.803
		GV	0.443

		atretic	0.186
	M1	GV	0.648
		atretic	0.533
	GV	atretic	0.222
125 kDaMMP-9 асоциран с 25kDa микроглобулин	M2	M1	0.626
		GV	0.651
		atretic	0.430
	M1	GV	0.927
		atrtic	0.533
	GV	atretic	0.667
92 kDa pro-MMP-9	M2	M1	0.968
		GV	0.525
		atretic	0.891
	M1	GV	0.788
		atretic	0.800
	GV	atretic	1.000
~82 kDa act-MMP-9	M2	M1	0.346
		GV	0.700
		atretic	0.057
	M1	GV	0.527
		atretic	0.533
	GV	atretic	0.111
62-64 kDa act-MMP-2	M2	M1	0.232
		GV	0.246
		atretic	0.640
	M1	GV	0.042
		atretic	1.000
	GV	atretic	0.222



Фигура 5. Бокс-плот диаграма, на инвитро ензимната активност на act-MMP-2 и act-MMP-9 в зависимост от степента на зрялост на яйцеклетката.

1.4. Активност на MMP и морфология на яйцеклетките

При анализ на получените резултати по отношение на морфологията на изваденитe яйцеклетки за по-голямата част от изследваните признаци, като цвят на зона пелуцида, наличие на фрагменти в перивителинното пространство, вискозитет на цитоплазмата, наличие на рефрактилни телца, некротични телца, вакуоли и др. включения, не се установяват сигнификантни разлики в ензимната активност на MMP-2 и 9 между отделните групи.

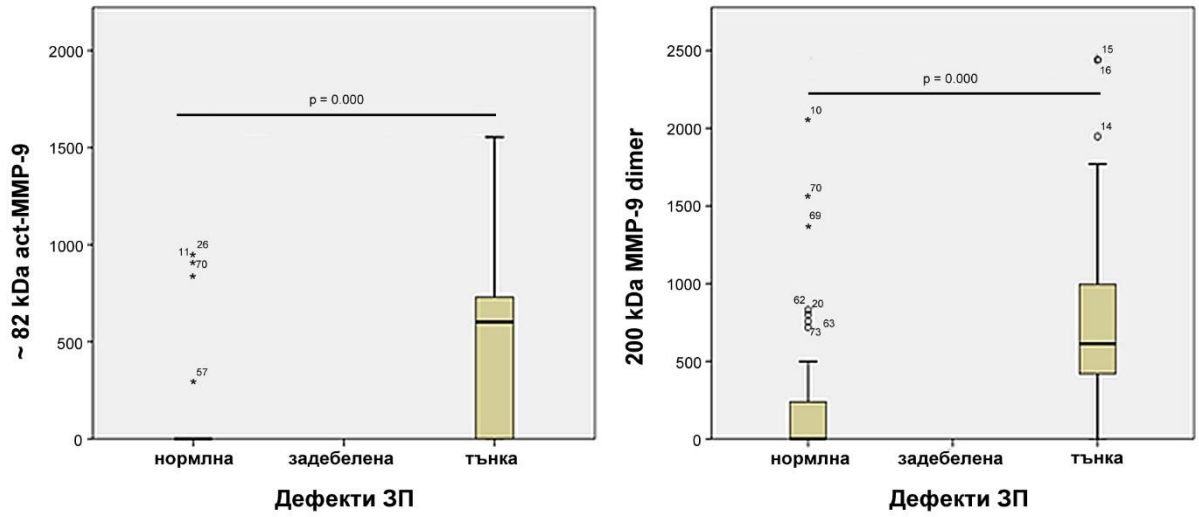
1.4.1. Размер на зона пелуцида (ЗП)

Според размера на ЗП, яйцеклетките бяха групирани в три групи - с нормална дебелина на ЗП, със задебелена и с тънка ЗП. При изследвания пул от овоцити не бяха идентифицирани такива със задебелена ЗП. Сравняването на резултатите за ензимната активност на двете желатинази показа значително по-висока активност на act-MMP-9 (p=0.000) и MMP-9 димер (p=0.000) в аспирати от яйцеклетки с тънка ЗП. По отношение на MMP-2 не бяха установени сигнификантни различия между групите (табл. 4, фиг. 6).

Таблица 4. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от размера на зона пелуцида.

Променлива	Нормална ЗП (n)	Тънка ЗП (n)	P

200 kDa MMP-9димер	48	19	0,000
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	48	19	0,211
92 kDa pro-MMP-9	48	19	0,362
~82 kDa act-MMP-9	48	19	0,000
62-64 kDa act-MMP-2	48	19	0,108



Фигура 6. Бокс-плот диаграми на ензимната активност на act-MMP-9 и MMP-9 димер, при различни размери на ЗП.

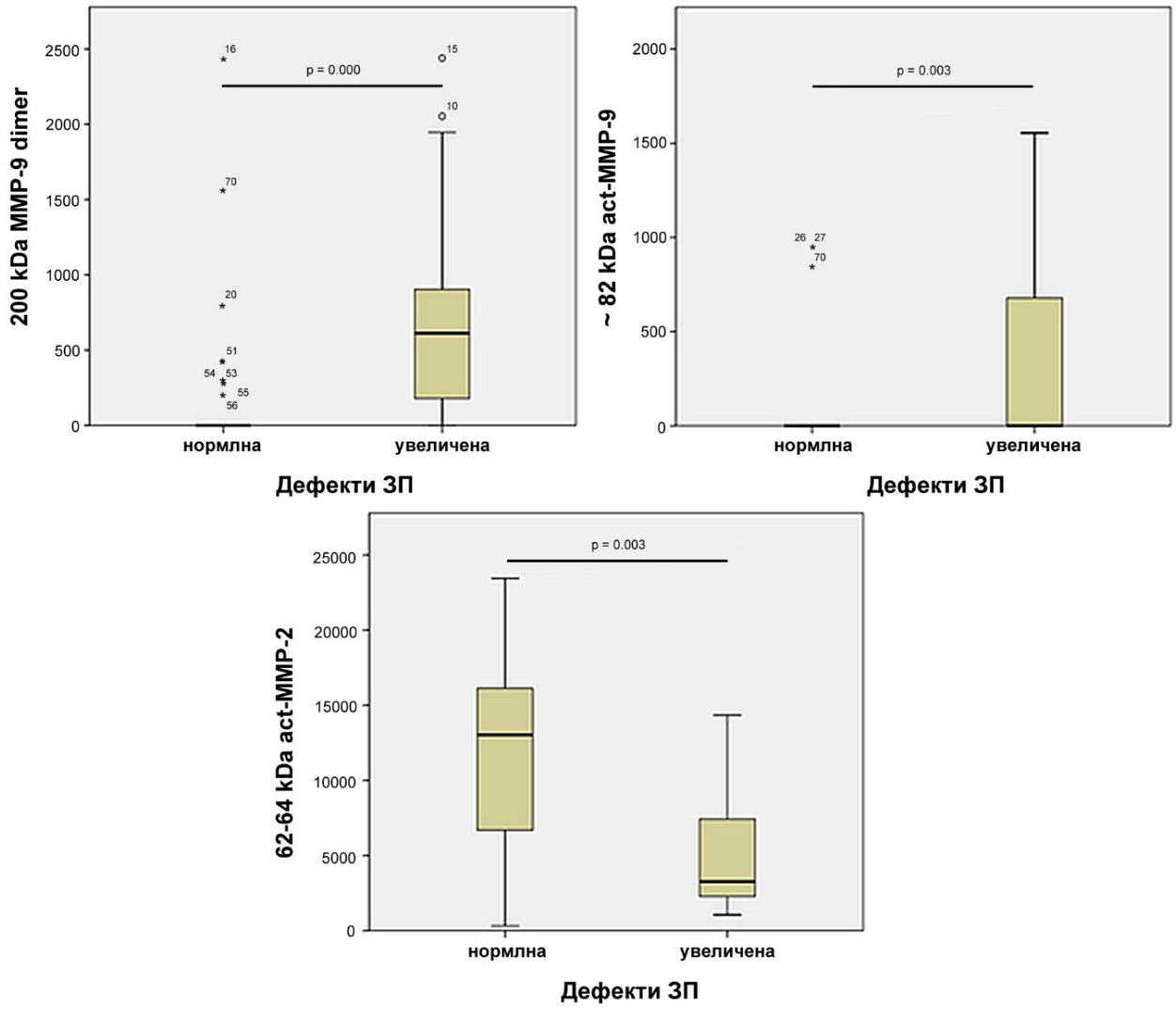
1.4.2. Размери на перивителинното пространство

По отношение на размера на ПВП и активността на изследваните ензими, резултатите бяха групирани в две групи - яйцеклетки с нормални размери на ПВП и такива с увеличено ПВП. При яйцеклетки с увеличени размери на ПВ активността на MMP-9 димер и act-MMP-9 във фоликулните течности е значително по-висока в сравнение с яйцеклетките с нормални размери на ПВП (Mann-Whitney; p=0.000; p=0.003). Фоликулните течности от яйцеклетки с нормална морфология на ПВП се характеризират с по-висока активност на act-

MMP-2 в сравнение с тези, съдържащи яйцеклетки с увеличено ПВП (Mann-Whitney; p=0,000) (Фиг. 7).

Таблица 5. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от размерите на перивителинното пространство.

Променлива	**Нормално ПВП (n)**	**Увеличено ПВП (n)**	**P**
200 kDa MMP-9димер	39	28	0,000
125 kDaMMP-9 асоциран с 25kDa микроглобулин	39	28	0,002
92 kDa pro-MMP-9	39	28	0,829
~82 kDa act-MMP-9	39	28	0,003
62-64 kDa act-MMP-2	39	28	0,000



Фигура 7. Бокс-плот диаграми на ензимната активност на MMP-9 димер, act-MMP-9 и act-MMP-2 в зависимост от размера на ПВП.

1.4.3. Дефекти в цитоплазмата

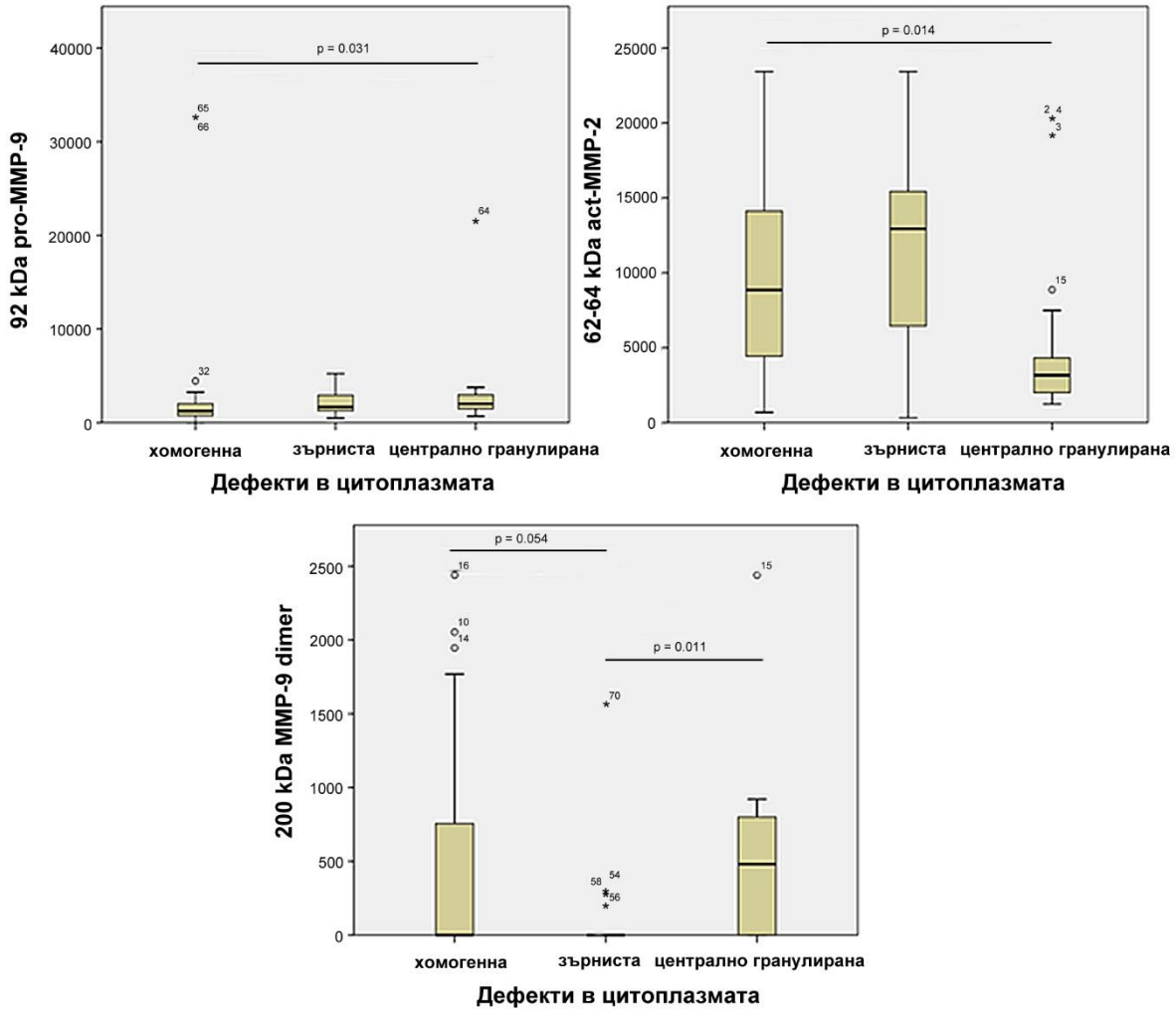
По отношение на вида на цитоплазмата, яйцеклетките бяха разпределени в три групи: нормална (хомогенна) цитоплазма, зърниста и централно гранулирана. При проведения анализ на вариацията (Kruskal-Wallis) бяха установени различия ($p<0,05$) между групите по отношение на активната форма на MMP-2. Различията между всеки две групи бяха тествани с Mann-Whitney U test (табл. 6).

Таблица 6. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от дефектите в цитоплазмата.

Променлива	Цитоплазмени дефекти	Цитоплазмени дефекти	P
200 kDa MMP-9 димер	Хомогенна	Зърниста	0.054
		Централно гранулирана	0.475
	Зърниста	Централно гранулирана	0.011
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	Хомогенна	Зърниста	0.077
		Цетрално гранулирана	0.615
	Зърниста	Централно гранулирана	0.100
92 kDa pro-MMP-9	Хомогенна	Зърниста	0.089
		Централно гранулирана	0.031
	Зърниста	Централно гранулирана	0.512
~82 kDa act-MM-P9	Хомогенна	Зърниста	0.672
		Централно гранулирана	0.094
	Зърниста	Централно гранулирана	0.133
62-64 kDa act-MMP-2	Хомогенна	Зърниста	0.507
		Централно гранулирана	0.014
	Зърниста	Централно гранулирана	0.078

При яйцеклетки с хомогенна цитоплазма се наблюдава по-ниска активност на pro-MMP-9 в сравнение с аспирати от яйцеклетки с централно гранулирана цитоплазма (p=0,031). Активността на 200 kDa MMP-9 димер е значително по-висока при яйцеклетки с централно гранулирана цитоплазма (p=0,011) в сравнение с тези със зърниста цитоплазма. Активността на същия ензим не се различава между групите с хомогенна цитоплазма и централно гранулирана цитоплазма, докато при яйцеклетките с хомогенна цитоплазма се наблюдава тенденция близка до сигнификантната за по-висока активност на MMP-9 димер в сравнение с тези със зърниста цитоплазма (p=0,054). От друга страна активността на act-MMP-2 във фоликулни течности, съдържащи яйцеклетки с

хомогенна цитоплазма е значително по-висока в сравнение с тази от аспирати, съдържащи яйцеклетки с централно гранулирана цитоплазма (p=0,014) (фиг. 8).



Фигура 8. Бокс-плот диаграми на ензимната активност на MMP-9 димер, pro-MMP-9 и act-MMP-2 при яйцеклетки с различна степен на гранулираност на цитоплазмата.

1.4.4. Цитоплазмени включения

По отношение на наличието на цитоплазмени включения – некротични и рефрактилни телца, вакуоли и клъстери от гладък ендоплазмен ретикулум, не се установиха никакви различия в ензимната активност на изследваните ендопептидази между отделните групи.

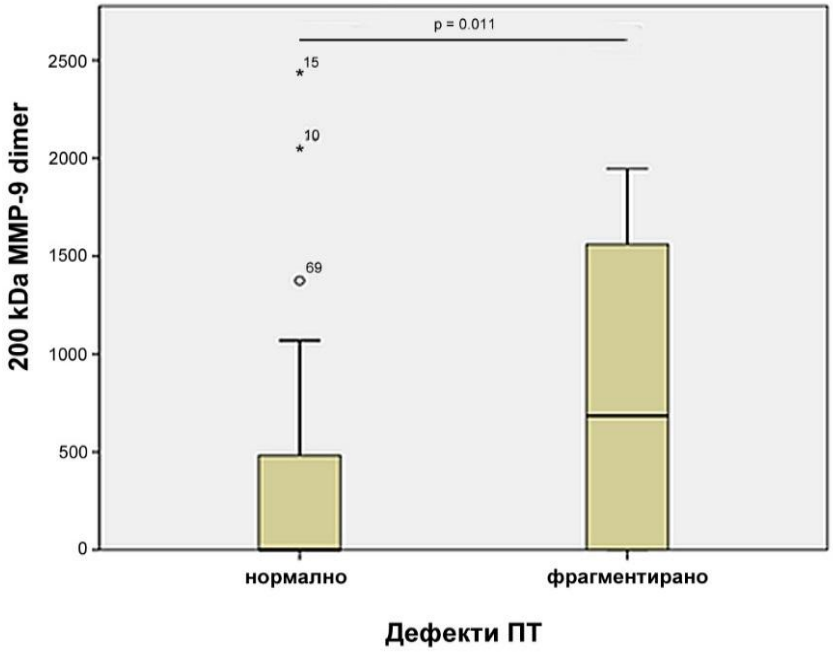
1.4.5. Дефекти на полярното телце

При сравняване на ензимната активност във фоликуларни течности при яйцеклетки с нормална морфология на ПТ и с фрагментирано ПТ единствената

наблюдавана разлика беше по-високата активност на MMP-9 димер в групата на аспирати от яйцеклетки с фрагментирано полярно телце (p=0,031).

Таблица 7. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от дефектите на полярното телце.

Променлива	**Нормално ПТ (n)**	**Фрагментирано ПТ (n)**	**P**
200 kDa MMP-9 димер	52	10	0,031
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	52	10	0,149
92 kDa pro-MMP-9	52	10	0,114
~82 kDa act-MMP-9	52	10	0,150
62-64 kDa act-MMP-2	52	10	0,450



Фигура 9. Бокс-плот диаграма на ензимната активност на MMP-9 димер, при различна морфология на ПТ.

1.4.6. Активност на ММР и активация на яйцеклетките

По отношение на настъпило оплождане на ден първи яйцеклетките бяха разделени в три групи: оплодени – наличие на активация, включва както нормално оплодени яйцеклетки така и полиплоидни и хаплоидни зиготи; неоплодени - липса на активация; некротични – лизирали след ICSI. При сравняване на отделните групи не се установиха разлики по отношение на ензимната активност на изследваните ендопептидази.

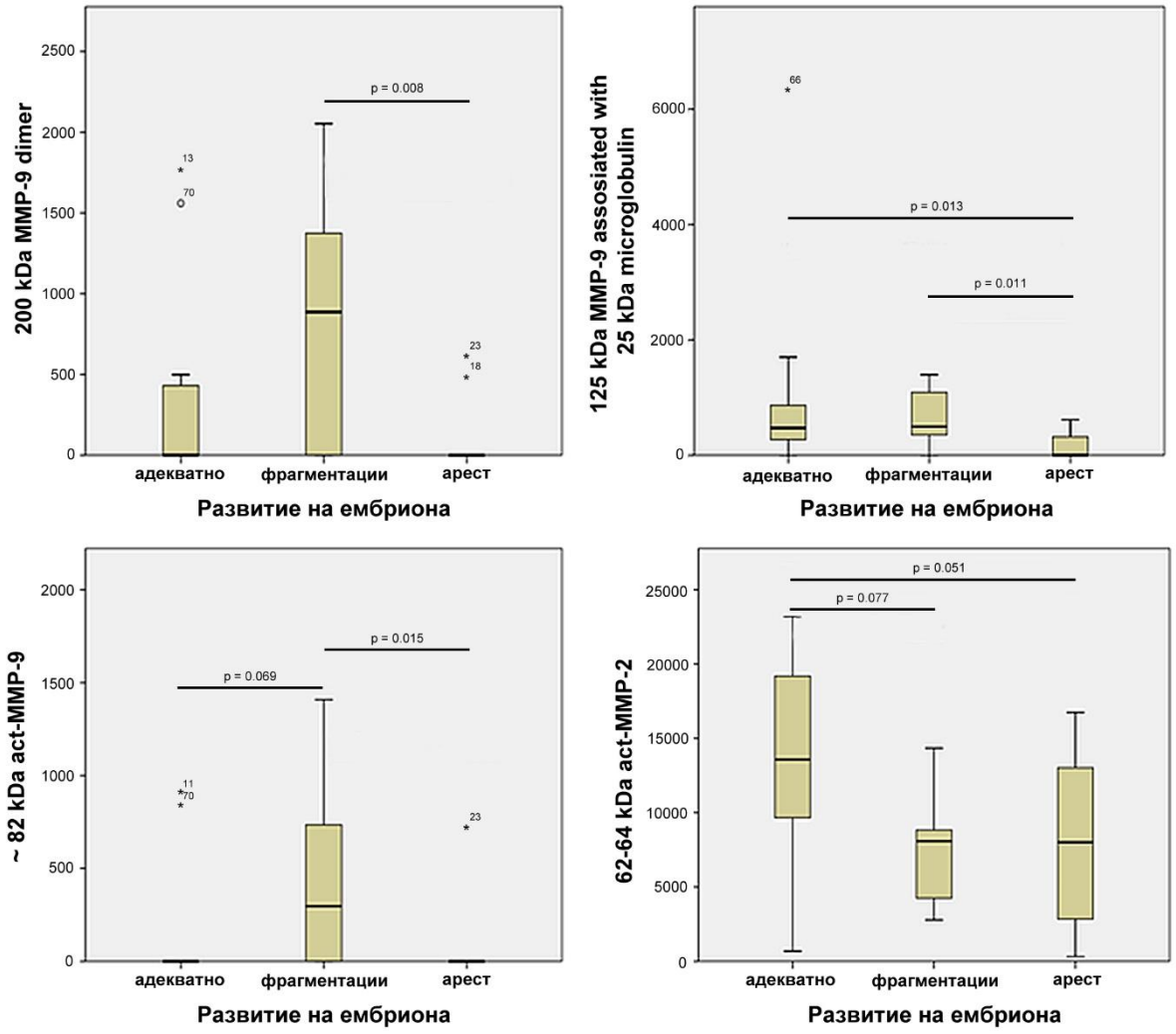
1.4.7. Активност на ММР и развитие на предимплантационни ембриони

Според развитието на ембрионите, получени след оплождането на яйцеклетките, последните бяха разпределени в следните групи: адекватно развитие, наличие на фрагментации, арест в развитието. При тестване на различията между групите с Mann-Whitney U test бяха установени различия между ембрионите с фрагменти и тези с арест в развитието по отношение активността на MMP-9 димер, 125 kDaMMP-9, асоцииран с 25kDa микроглобулин и акт-MMP-9 (табл. 8). Активността на посочените ензими е значително по-висока в групата на ембрионите с фрагменти (съответно p=0,008; p=0,011; p=0,015) (Фиг. 10). Наблюдава се по-висока активност на 125 kDa MMP-9 асоцииран с 25kDa microglobulin в групата с нормално развиващи се ембриони, сравнена с ембрионите с арест в развитието (p=0,011).

Таблица 8. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от развитието на предимплантационните ембриони.

Променлива	**Ембрионално развитие**	**Ембрионално развитие**	**P**
200 kDa MMP-9 димер	Адекватно	Фрагментации	0,108
		Арест	0,201
	Фрагментации	Арест	0,008
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	Адекватно	Фрагментации	0,867
		Арест	0,013

	Фрагментации	Арест	0,011
92 kDa pro-MMP-9	Адекватно	Фрагментации	0,404
		Арест	0,663
	Фрагментации	Арест	0,841
~82 kDa act-MMP-9	Адекватно	Фрагментации	0,069
		Арест	0,488
	Фрагментации	Арест	0,015
62-64 kDa act-MMP-2	Адекватно	Фрагментации	0,077
		Арест	0,061
	Фрагментации	Арест	0,815



Фигура 10. Бокс-плот диаграми на ензимната активност на MMP в зависимост от качеството на предимплантационните ембриони.

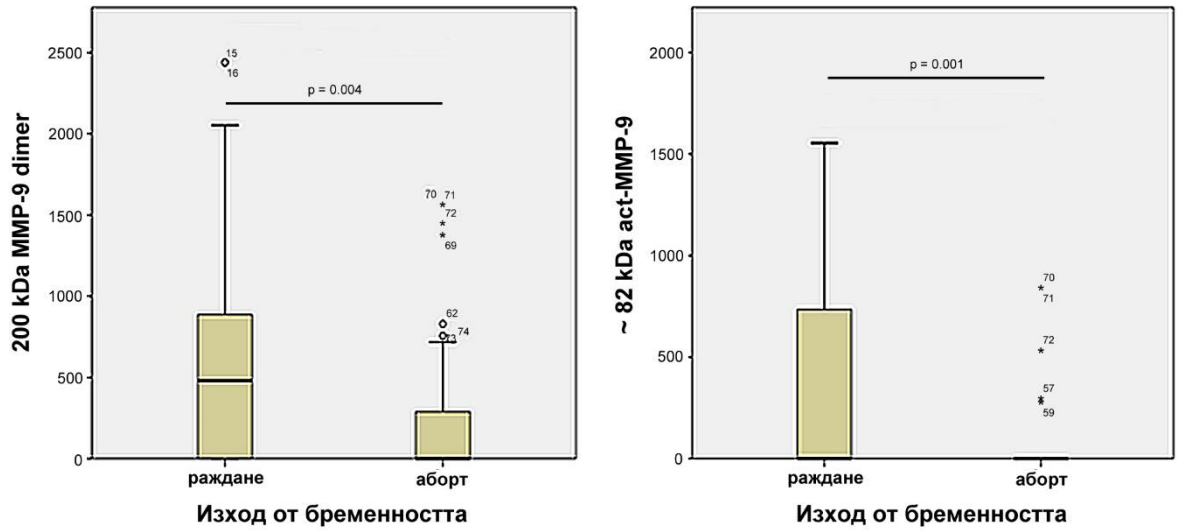
При акт-MMP-9 се наблюдава разлика, близка до сигнификантната (p=0,069) между групите с адекватно развиващи се ембриони и с фрагментации, като активността на ензима е по-висока в групата с фрагментирани ембриони. Обратната тенденция, макар и не статистически значима се наблюдава при act-MMP-2, чиято активност е по-висока при ембриони с адекватно развитие в сравнение с тези, при които се наблюдават фрагменти и арест в развитието (фиг. 10).

1.4.8. Активност на MMP и изход от бременността

При всички пациенти от изследваната група тестът за бременност е положителен, в два от случаите бременността е протекла нормално и е приключила с раждане (30 фоликулни течности), при останалите пет случая бременността е приключила с мисед аборт (44 фоликулни течности). При тестване на различията между групите с Mann-Whitney U test, беше установена значително по-висока активност на MMP-9 димер (p=0.004) и act-MMP-9 (p=0.001) във фоликулни течности при пациенти, при които бременността е приключила с раждане (Фиг. 11). Прави впечатление, че в случаите на аборт активността на act-MMP-9 е изключително слабо изразени или изобщо не се отчита такава във фоликулните аспирати (табл. 9, фиг. 11).

Таблица 9. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната активност в зависимост от изхода от бременността.

Променлива	**Раждане (n)**	**Аборт (n)**	**P**
200 kDa MMP-9 димер	30	44	0,004
125 kDaMMP-9 асоцииран с 25kDa микроглобулин	30	44	0,094
92 kDa pro-MMP-9	30	44	0,467
~82 kDa act-MMP-9	30	44	0,001
62-64 kDa act-MMP-2	30	44	0,947

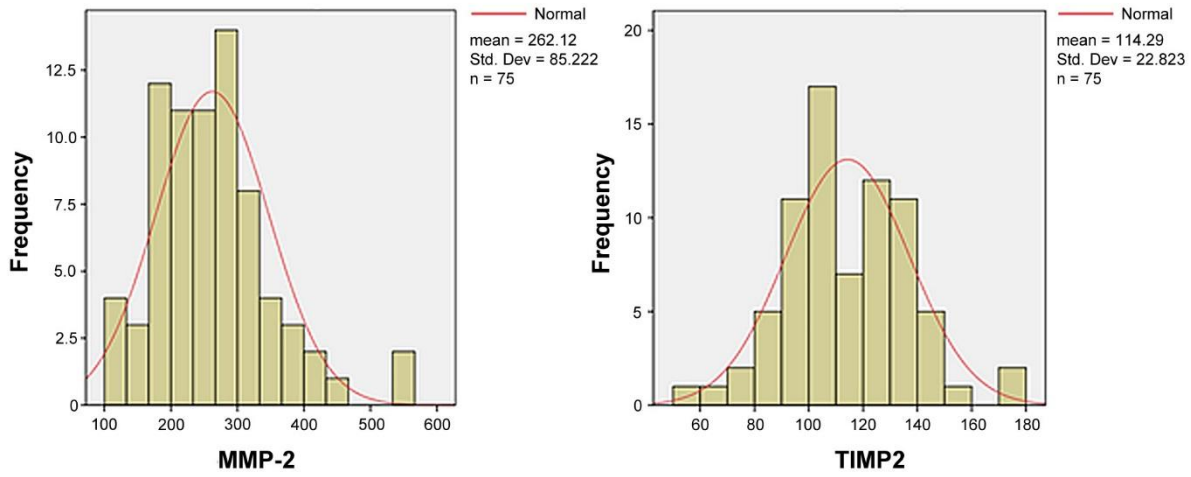


Фигура 11. Бокс-плот диаграми на ензимната активност на MMP-9 и връзката ѝ с изхода от бременността.

2. Резултати от ELISA за определяне на концентрацията на MMP-2, MMP-9 и техните инхибитори TIMP-1 и TIMP-2 във фоликулни течности.

Анализирани бяха 75 фоликулни течности. Концентрациите на MMP-9 (pg/ml), MMP-2 (ng/ml), TIMP-1 (ng/ml) и TIMP-2 (ng/ml) бяха определени чрез ELISA. Бяха изчислени съотношенията, MMP-2/TIMP-2 и MMP-9/TIMP-1. Данните за концентрацията на двете желатинази и техните инхибитори, както и съответните съотношения бяха разпределена в групи по същите признаци, като при резултатите от зимографиите.

След тестване на всички променливи с тест за нормалност на разпределението (Shapiro-Wilk W test) беше установено, че при всички изследвани променливи разпределението на данните е различно от нормалното ($p<0.05$), поради което бяха приложени непараметрични тестове за анализ. Изключение прави само TIMP-2, където се наблюдава нормално разпределение ($p=0,696$) и за анализ на зависимостите бяха приложени Student's t-test и One Way ANOVA.



А Б

Фигура 12. А. Хистограма за разпределението на данните получени за концентрацията на активната форма на MMP-2. Наблюдава се разминаване между разпределението в реалните експериментални данни и нормалното разпределение. Б. Хистограма за разпределението на данните получени за концентрацията на TIMP-2. Разпределението на експерименталните данни съвпада с нормалното разпределение.

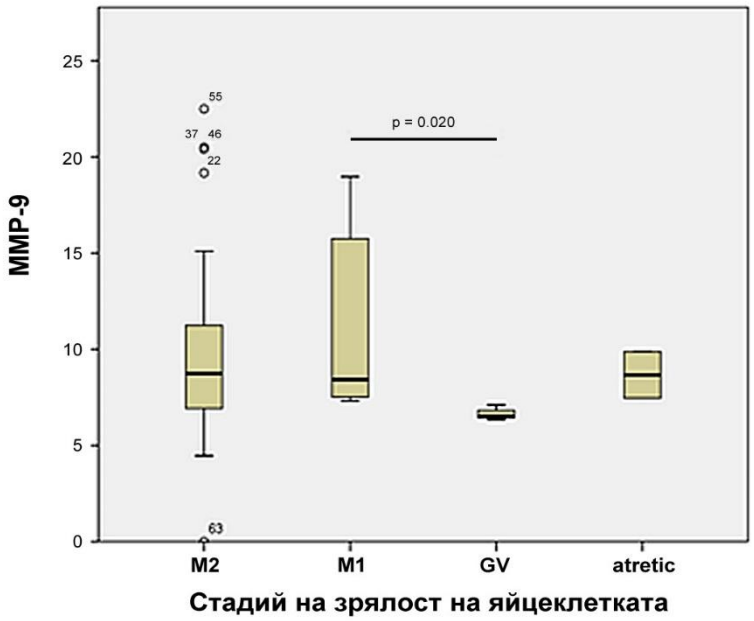
По отношение на степента на експанзия на COC, размера на ЗП и цитоплазмените включения, не се установиха никакви зависимости между концентрациите на изследваните ензими и техните инхибитори. При анализ на данните за TIMP-2 чрез Student's t-test и One Way ANOVA, не се установиха никакви разлики в концентрацията между групите при нито един от изследваните параметри.

2.1. Зависимост на степента на зрялост на яйцеклетките и концентрацията на MMP-2 и MMP-9

При тестване на различията между групите с Mann-Whitney U test, бяха установени значително по-висока концентрация на MMP-9 при яйцеклетки от M1 в сравнение с GV (p=0,020) (Фиг. 13). По отношение на концентрацията на MMP-2 и останалите изследвани съотношения не се установяват разлики между отделните степени на зрялост на яйцеклетките (табл. 10).

Таблица 10. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от степента на зрялост на яйцеклетката.

Променлива	**Степен на зрялост на яйцеклетката**		**P**
MMP-2	M2	M1	0,431
		GV	0,146
		atretic	0,614
	M1	GV	0,071
		atretic	0,739
	GV	atretic	0,248
MMP-9	M2	M1	0,450
		GV	0,122
		atretic	0,970
	M1	GV	0,020
		atrtic	0,739
	GV	atretic	0,083
TIMP-1	M2	M1	0,622
		GV	0,785
		atretic	0,466
	M1	GV	0,439
		atretic	0,739
	GV	atretic	0,564
MMP-9/TIMP-1	M2	M1	0,667
		GV	0,090
		atretic	0,667
	M1	GV	0,121
		atretic	0,733
	GV	atretic	0,248
MMP-2/TIMP-2	M2	M1	0,373
		GV	0,880
		atretic	0,322
	M1	GV	0,439
		atretic	0,182
	GV	atretic	0,564



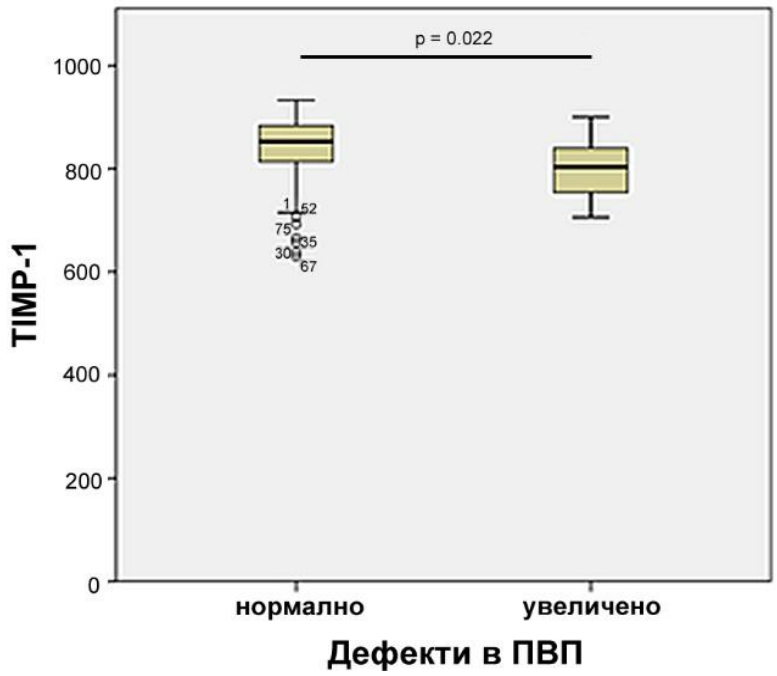
Фигура 13. Бокс-плот диаграми, на концентрацията на MMP-9 и връзката и със степента на зрялост на яйцеклетките.

2.2. Дефекти в размера на ПВП

При тестване на различията между групите с Mann-Whitney U test, беше установена единствено значително по-висока концентрация на TIMP-1 при яйцеклетки с нормални размери на ПВП в сравнение с увеличено такова (p=0,022). За останалите измервани параметри не се установиха никакви зависимости.

Таблица 11. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от перивителинното пространство.

Променлива	Нормално ПВП (n)	Увеличено ПВП (n)	P
act-MMP-2	58	13	0,527
pro-MMP-9	58	13	0,806
TIMP-1	58	13	0,022
MMP-9/TIMP-1	58	13	0,457
MMP-2/TIMP-2	58	13	0,656



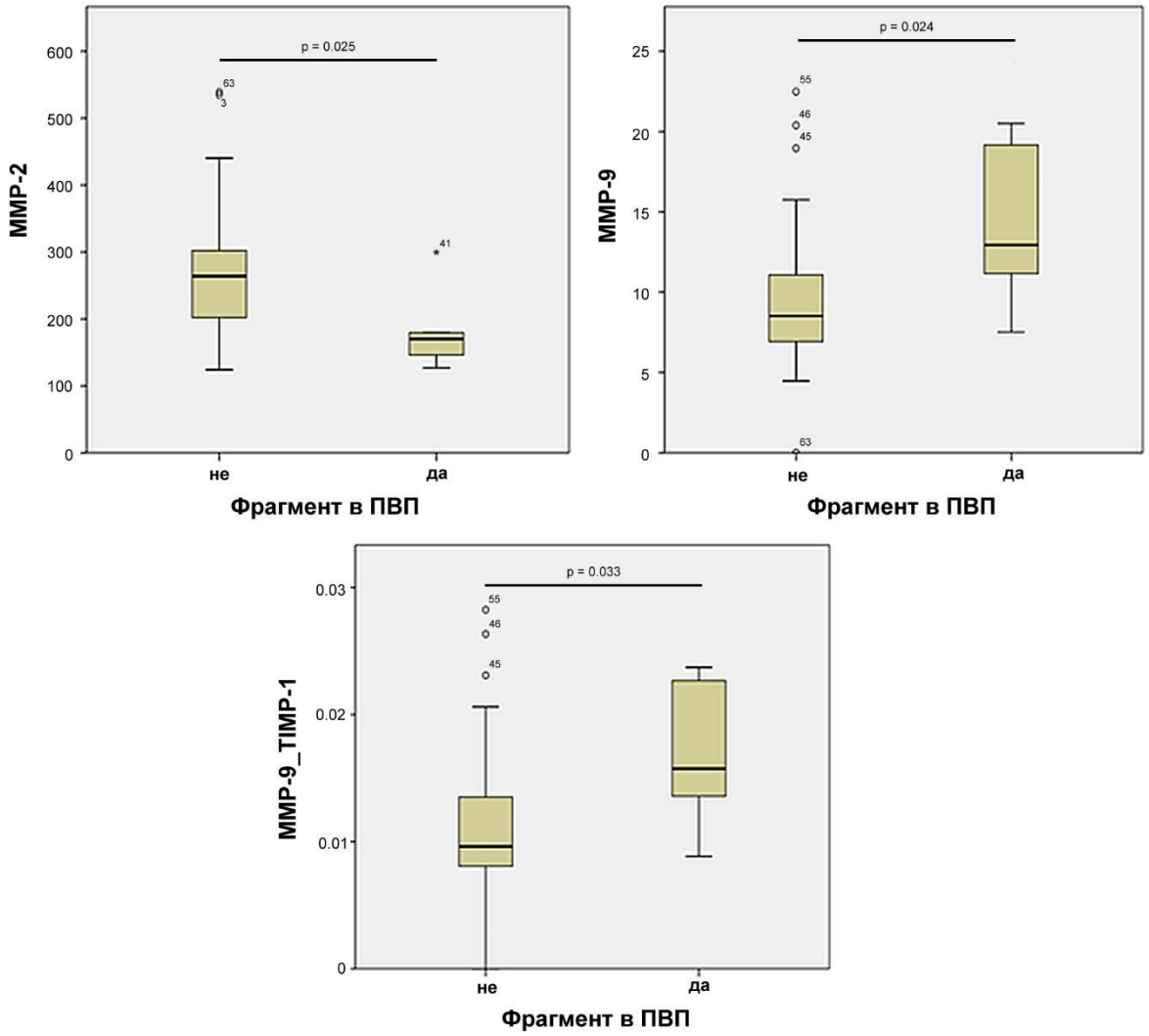
Фигура 14. Бокс-плот диаграми на концентрацията на TIMP-1 и връзката ѝ с размера на ПВП.

2.3. Фрагменти в ПВП

Резултатите от концентрацията на изследваните ензими бяха разпределени в две групи – наличие на фрагменти в ПВП и яйцеклетки без фрагменти в ПВП. Анализът на данните показа значително по-високи концентрации на act-MMP-2 в групата на яйцеклетки без фрагменти в ПВП (p=0,025). Pro-MMP-9 се експресира предимно във фоликулни течности, съдържащи яйцеклетки с фрагменти в ПВП (p=0,024). Съотношението MMP-9/TIMP-1 също е по-високо в групата с фрагменти в ПВП (p=0,033). По отношение на концентрацията на TIMP-1 и съотношението MMP-2/TIMP-2 не се установяват статистически значими разлики между изследваните групи.

Таблица 12. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от наличието на фрагменти в ПВП.

Променлива	**Без фрагменти в ПВП (n)**	**С фрагменти в ПВП (n)**	**P**
MMP-2	66	5	0,025
MMP-9	66	5	0,024
TIMP-1	66	5	0,982
MMP-9/TIMP-1	66	5	0,033
MMP-2/TIMP-2	66	5	0,056



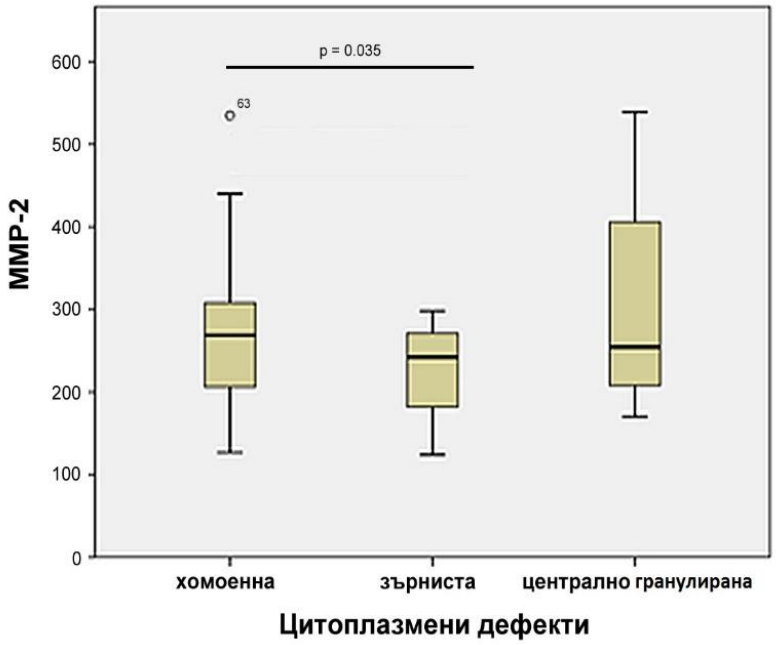
Фигура 15. Бокс-плот диаграми на концентрацията на изследваните желатинази в зависимост от наличието или отсъствието на фрагменти в ПВП на яйцеклетките.

2.4. Цитоплазмени дефекти

Дефектите бяха групирани в три групи в зависимост от вида на цитоплазмата: хомогенна, зърниста и централно гранулирана. Различията между всеки две от групите бяха анализирани чрез Mann-Whitney U test, в резултат на който бяха установени различия в концентрацията на MMP-2 и MMP-9 (табл. 13) между групите с хомогенна и зърниста, и зърниста и централно гранулирана цитоплазма. Концентрацията на MMP-2 е по-висока в групата с хомогенна цитоплазма в сравнение със зърниста (p=0,035) (Фиг. 16).

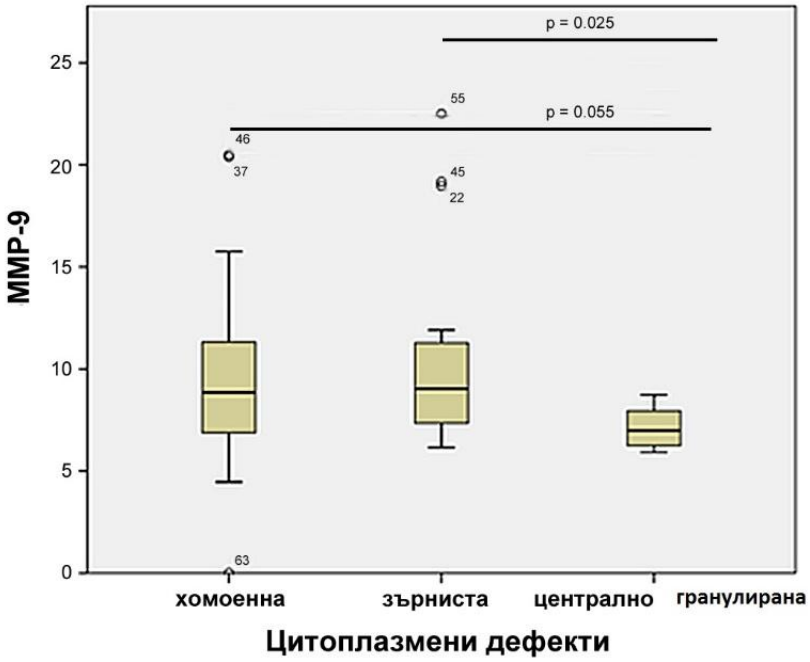
Таблица 13. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от цитоплазмената морфология.

Променлива	**Цитоплазмени дефекти**	**Цитоплазмени дефекти**	**P**
MMP-2	Хомогенна	Зърниста	0,035
		Централно гранулирана	0,621
	Зърниста	Централно гранулирана	0,238
MMP-9	Хомогенна	Зърниста	0,656
		Цетрално гранулирана	0,055
	Зърниста	Централно гранулирана	0,025
TIMP-1	Хомогенна	Зърниста	0,392
		Централно гранулирана	0,454
	Зърниста	Централно гранулирана	0,132
MMP-9/TIMP-1	Хомогенна	Зърниста	0,911
		Централно гранулирана	0,099
	Зърниста	Централно гранулирана	0,084
MMP-2/TIMP-2	Хомогенна	Зърниста	0,504
		Централно гранулирана	0,527
	Зърниста	Централно гранулирана	0,382



Фигура 16. Бокс-плот диаграма на концентрацията на MMP-2 при яйцеклетки с различна цитоплазмена морфология.

По отношение на MMP-9 се наблюдава по-висока концентрация на ензима при яйцеклетки със зърниста цитоплазма в сравнение с групата с централно гранулирана цитоплазма (p=0,025). Подобна тенденция, близка до статистически значимата, се наблюдава и при сравняване на групите с хомогенна и централно гранулирана цитоплазма (p=0,055) (Фиг. 17). При сравняване на концентрацията на TIMP-1 и съотношенията MMP-9/TIMP-1 и MMP-2/TIMP-2 не се установяват значими разлики между групите.



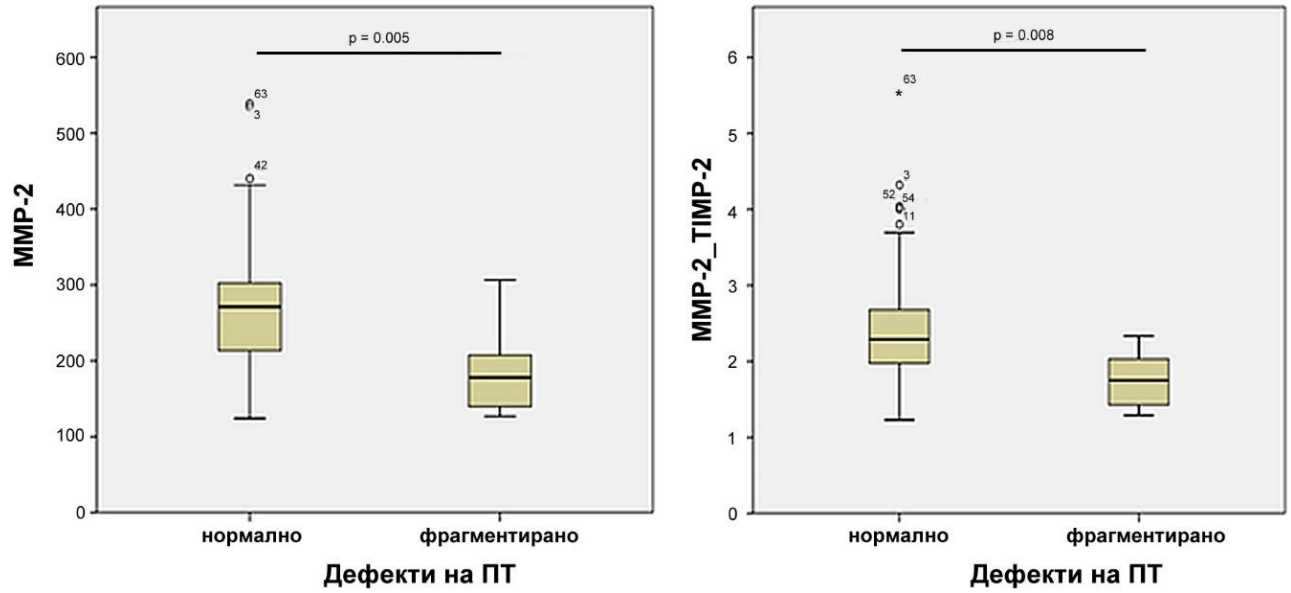
Фигура 17. Бокс-плот диаграми на концентрацията на MMP-9 при яйцеклетки с различна цитоплазмена морфология.

2.5. Морфология на полярното телце

Съгласно проведения тест за достоверност (Mann-Whitney U тест), се установи повишена концентрация на MMP-2 във фоликуларни течности, съдържащи ПТ с нормална морфология в сравнение с групата с фрагментирани ПТ (p=0,005). Същата зависимост се наблюдава и при съотношението MMP-2/TIMP-2 (p=0,008) (фиг. 18, табл. 14).

Таблица 14. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от морфологията на полярното телце.

Променлива	Нормално ПТ (n)	Фрагментирано ПТ (n)	P
MMP-2	59	8	0,005
MMP-9	59	8	0,368
TIMP-1	59	8	0,650
MMP-9/TIMP-1	59	8	0,246
MMP-2/TIMP-2	59	8	0,008



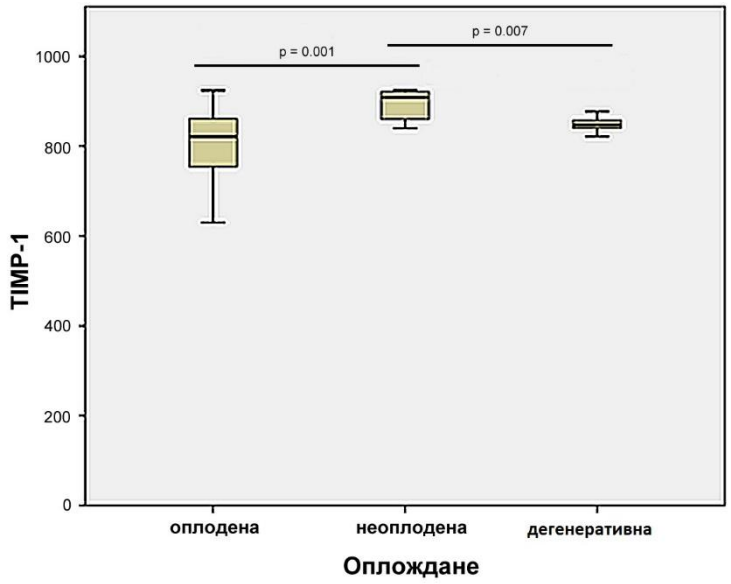
Фигура 18. Бокс-плот диаграми на концентрацията на MMP-2 и съотношението MMP-2/TIMP-2 при яйцеклетки с различна морфология на ПТ.

2.6. Опложданe

Анализът не показа съществени разлики между групите за концентрацията на двете изследвани желатинази. Установява се по-висока концентрация на TIMP-1 в групата аспирати от неоплодени яйцеклетки, сравнена с оплодените (p=0,001) и дегенеративните (p=0,007) (фиг. 19). Съотношенията между ензимите и техните инхибитори също не показват разлики между групите (табл. 15).

Таблица 15. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от оплождането.

Променлива	Оплождане	Оплождане	P
MMP-2	Оплодена	Неоплодена	0,400
		Дегенеративна	0,873
	Неоплодена	Дегенеративна	0,220
MMP-9	Оплодена	Неоплодена	0,466
		Дегенеративна	0,684
	Неоплодена	Дегенеративна	0,288
TIMP-1	Оплодена	Неоплодена	0,001
		Дегенеративна	0,244
	Неоплодена	Дегенеративна	0,007
MMP-9/TIMP-1	Оплодена	Неоплодена	0,092
		Дегенеративна	0,974
	Неоплодена	Дегенеративна	0,165
MMP-2/TIMP-2	Оплодена	Неоплодена	0,467
		Дегенеративна	0,261
	Неоплодена	Дегенеративна	0,567



Фигура 19. Бокс-плот диаграми на концентрацията на TIMP-1 в случаите на оплодени, неоплодени и дегенеративни яйцеклетки след ICSI.

2.7. Качество на предимплантационните ембриони

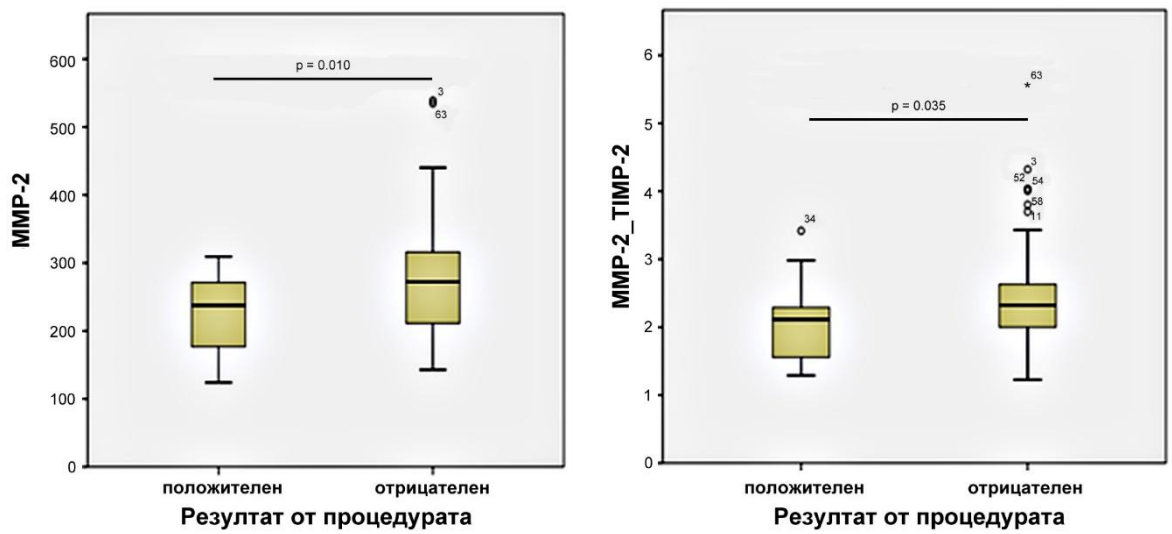
Не се установяват съществени разлики в концентрациите на изследваните ензими, отнесени към качеството на предимплантационните ембриони на трети и пети ден след оплождане.

2.8. Резултат от процедурата

Концентрацията на MMP-2 е значително повишена в групата с отрицателен тест за бременност (p=0,010), същата зависимост се наблюдава и при съотношението MMP-2/TIMP-2 (p=0,035). За MMP-9 не се наблюдава разлика в концентрацията между двете групи.

Таблица 16. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от наличието на бременност.

Променлива	Положителен тест за бременност (n)	Отрицателен тест за бременност (n)	P
MMP-2	22	53	0,010
MMP-9	22	53	0,866
TIMP-1	22	53	0,576
MMP-9/TIMP-1	22	53	0,963
MMP-2/TIMP-2	22	53	0,035



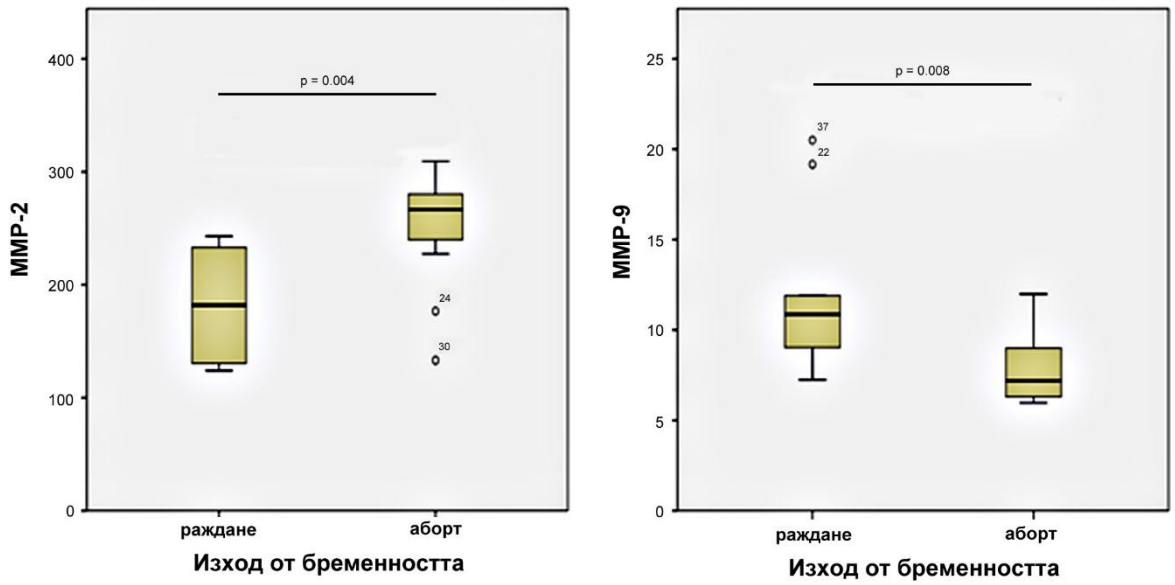
Фигура 20. Бокс-плот диаграми на концентрацията на MMP-2 и съотношението MMP-2/TIMP-2 в зависимост от резултата от процедурата.

2.9. Изход от бременността

В случаите, при които е постигната бременност, фоликуларните течности бяха разделени в две групи: бременност приключила с раждане и бременност приключила с аборт. Беше установена значително по-висока концентрация на MMP-2 при случаите, приключили с аборт (p=0,004), докато концентрацията на MMP-9 беше значително повишена в групата на родилите (p=0,008) (Фиг. 21). Тези зависимости се повтарят и при съотношенията на MMP-2/TIMP-2 (p=0,008) и съответно MMP-9/TIMP-1 (p=0,010).

Таблица 17. Степен на достоверност (p, Mann-Whitney U test) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от изхода от бременността.

Променлива	Раждане (n)	Аборт (n)	P
MMP-2	10	12	0,004
MMP-9	10	12	0,008
TIMP-1	10	12	0,582
MMP-9/TIMP-1	10	12	0,010
MMP-2/TIMP-2	10	12	0,008



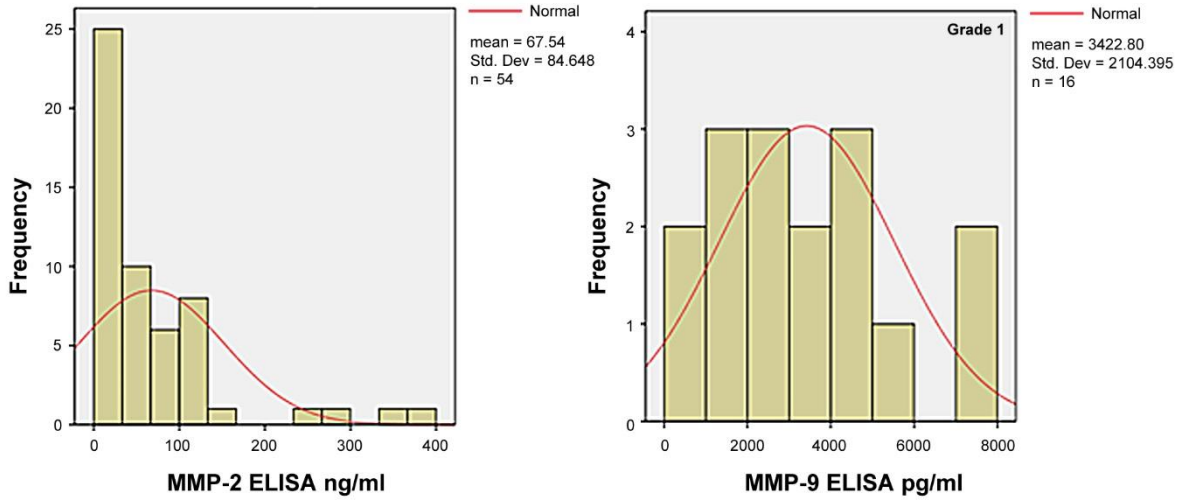
Фигура 21. Бокс-плот диаграми на концентрацията на MMP-2 и MMP-9 в зависимост от изхода от бременността.

3. Концентрация на MMP в среди от култивирани предимплантационни ембриони

Бяха анализирани 54 среди от култивирани ембриони на пети ден след опложданe, като всеки ембрион беше култивиран самостоятелно в 50 µl среда. За всеки ембрион беше определена концентрацията на тотална MMP-2, MMP-9 и TIMP-1. Получените резултати бяха разпределени в групи в зависимост от качеството на ембрионите, изхода от култивирането, а именно дали съответния ембрион е бил трансфериран в матката, унищожен или замразен, както и в зависимост от резултата от теста за бременност.

3.1. Разпределение на данните

Според теста на Shapiro-Wilk W данните за MMP-2 имаха разпределение различно от нормалното ($p<0,05$), докато данните за MMP-9 и TIMP-1 показаха равномерно разпределение ($p>0,05$). При анализа на данните за MMP-2 бяха използвани непараметрични методи за анализ, докато при MMP-9 и TIMP-1 бяха приложени One way ANOVA и Student T-test.



А Б

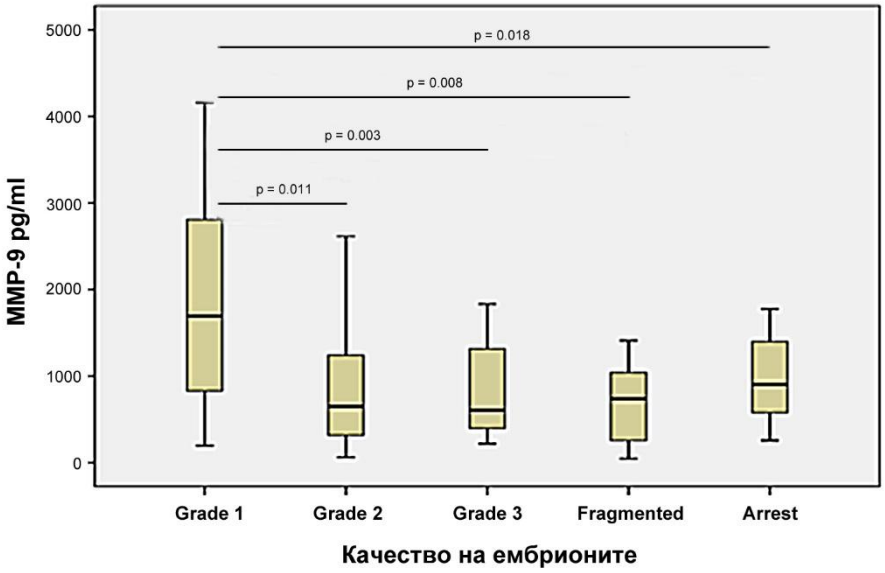
Фигура 22. А. Хистограма за разпределението на данните получени за концентрацията на MMP-2. Наблюдава се значително разминаване между разпределението в реалните експериментални данни и нормалното разпределение. Б. Хистограма за разпределението на данните получени за концентрацията на MMP-9. Разпределението на експерименталните данни съвпада с нормалното разпределение.

3.2. Качество на ембрионите и концентрация на MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в културелни среди.

В зависимост от тяхното качество изследваните ембриони, данните за концентрацията на изследваните ензими бяха разделени в четири групи, *Grade 1, Grade 2, Grade 3, Fragmented, Arrest.* Концентрацията на MMP-2 не показа статистически значими разлики между сравняваните групи. По отношение на MMP-9, Post-hoc тестът (LSD) показа значителни различия в концентрацията на ензима между групата с ембриони с отлично качество, *Grade 1* и всички останали групи, като концентрацията на MMP-9 е значително по-висока в групата ембриони с качество *Grade 1* (Фиг. 23). При сравняване на концентрацията на ензима между останалите групи не се установяват различия. При анализ на данните за TIMP-1 не се установява разлики между групите с различно качество на ембрионите (табл. 18).

Таблица 18. Степен на достоверност (p, LSD) на разликите в ензимната концентрация в зависимост от качеството на ембрионите

Променлива	Качество на ембрионите	Качество на ембрионите	P
MMP-9	Grade 1	Grade 2	0,011
		Grade 3	0,003
		Fragmented	0,008
		Arrest	0,018
	Grade 2	Grade 1	0,011
		Grade 3	0,762
		Fragmented	0,591
		Arrest	0,884
	Grade 3	Grade 1	0,003
		Grade 2	0,762
		Fragmented	0,752
		Arrest	0,652
	Fragmented	Grade 1	0,008
		Grade2	0,591
		Grade3	0,752
		Arrest	0,515
	Arrest	Grade 1	0,018
		Grade 2	0,884
		Grade 3	0,652
		Fragmented	0,515



Фигура 23. Бокс-плот диаграми на концентрацията на MMP-9 в зависимост от качеството на предимплантационните ембриони на пети ден от култивирането.

3.3. Концентрация на MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, изход от култивирането и резултат от процедурата

По отношение на изхода за ембриона от култивирането – дали е бил трансфериран, унищожен или замразен не се наблюдават разлики в концентрацията на нито един от изследваните показатели. По отношение на резултата от процедурата т.е. дали трансферираният ембрион се е имплантирал в матката и тече бременност, също не се наблюдават никакви зависимости.

VI. Дискусия

Зрялост на яйцеклетките

Установено е, че фоликулната течност се отличава с огромна сложност и много широк динамичен обхват на протеини, участващи в множество различни пътища, които могат да повлияят растежа на фоликулите, съзряването и качеството на яйцеклетките (Bianchi et al. 2013). При хора фоликулната течност се формира предимно чрез капилярна дифузия, както и от секреция на гранулозни, кумулусни и тека клетки. Тека и гранулозните клетки изграждат стената на фоликула, докато кумулусните клетки са в директен контакт с развиващата се яйцеклетка (Hennet & Combelles 2012). Тази непосредствена близост позволява да се извършва тясна комуникация между соматичните клетки, изграждащи фоликула и развиващата се яйцеклетка, което води до правилна диференциация на кумулусните клетки, чрез пряко въздействие върху генната експресия и синтеза на протеини (Gilchrist et al. 2008; Fragouli et al. 2014). Това тясно метаболитно сътрудничество оказва влияние върху процесите на узряването и опложданe на яйцеклетката (Dumesic et al. 2015).

Въз снова на проведени протеомни анализи на човешки фоликулни течности е установено, че матриксните металопротеинази MMP-2 (95 kDa) и MMP-9(84 kDa) са двата основни ензима, участващи в различни взаимовръзки с 40% от изследваните протеини във фоликулите (Bianchi et al. 2016). Селективната протеолитична активност на MMP е фино балансирана от ендогенни тъканни инхибитори на металопротеинази (TIMP) (Baker et al. 2002; Brew & Nagase 2010). Доказано е, че TIMP-1 е специфичен инхибитор на MMP-9 (Sakata et al. 2000), и че TIMP-2 регулира активността на MMP-2 в няколко тъкани (Visse & Nagase 2003) и по-специално в кумулусните клетки (Hulboy et al. 1997). Тези данни предполагат важното участие на MMP и TIMP както в хомеостазата на яйчниковия фоликул, така и в узряването и детерминирането на компетентността на яйцеклетките (Luddi et al. 2018).

Многобройни проучвания документират важната роля на MMP-2 и MMP-9 за развитието на фоликулите и в овулаторния процес. MMP-2 и MMP-9 са локализирани в теката на развиващите се фоликули и в стромата на яйчника.

Желатинолитичната активност съответства на локализацията на MMP-2 и MMP-9 около развиващите се фоликули и в апикалната част на преовулаторните фоликули. При животински модели намалените концентрации на MMP във фоликулни течности от преовулаторни фоликули се свързват с нарушения на овулаторния процес и абнормална фоликулна инволюция (Russell et al. 1995; O'Sullivan et al. 1997). Тъй като ролята на MMP в човешкото безплодие и при хиперстимулация на яйчниците по време на циклите на *in vitro* оплождане при хората все още не е напълно изяснена, в настоящото проучване се опитахме да оценим нивата и активността на две MMP, MMP-2 и MMP-9, и техните инхибитори TIMP-1 и TIMP-2, във фоликулна течност, при пациентки подложени на *in vitro* оплождане, в деня на вземане на яйцеклетката. Понастоящем ограничен брой проучвания са изследвали интрафоликулни нива на MMP, с противоречиви заключения (Liu et al. 2008; Baka et al. 2010; Gomes et al. 2011). Въпреки това, MMP теоретично могат да бъдат важни участници в процесите на *in vitro* оплождането. Тези ензими са ключови за развитието на фоликулите, овулацията и образуването на жълтото тяло и неговата регресия, и участват в обширно ремоделиране на тъканите. Развитието на яйчниковите фоликули и разграждането на фоликулната стена за освобождаване на зряла яйцеклетка по време на овулация изискват обширна ангиогенеза и ремоделиране (D'Ascenzo et al. 2004). В повечето проведени към момента проучвания върху фоликулни течности, концентрацията или активността на MMP са определяни в общ пул от фоликулни аспирати, или след култивиране на изолирани гранулозни клетки, като не са ни известни такива, при които получените резултати да са свързани с качеството на гаметите и получените в резултат на оплождането ембриони (Lahav-Baratz et al. 2003; Fedorcsák et al. 2010; Horka et al. 2012; Yang et al. 2015; Luddi et al. 2018). Основните методи, които са използвани в проучванията са желатинови зимографии, ELISA, или е изследвана експресията на иРНК за MMP-2 и MMP-9 от гранулозните клетки.

Субстратната зимография е прост, чувствителен, количествено измерим и функционален тест за анализ на MMP и TIMP в биологични проби (Leber & Balkwill 1997). При зимографията протеините се разделят чрез електрофореза при денатуриране [натриев додецил сулфат (SDS)] при нередуциращи условия.

Разделянето се извършва в полиакриламиден гел, съдържащ специфичен субстрат, който е ко-полимеризиран с акриламида (Fernandezresa et al. 1995). По време на електрофорезата SDS води до денатуриране на MMP, които стават неактивни. След електрофореза гелът се измива с Triton® X-100, което води до отстраняване на SDS, и ензимите частично се ренатурират и възстановяват своята активност (Frederick Woessner 1995). Проензимите в този случай се активират без протеолитично разцепване (Oliver et al. 1997). Впоследствие гелът се инкубира в подходящ буфер за активиране. По време на тази инкубация, концентрираните, ренатурирани MMP в гела ще разградят субстрата (Frederick Woessner 1995). След приключване на инкубацията гелът се оцветява с Coomassie® Blue и MMP се визуализират като светли ивици на син фон от не разграден субстрат (Hawkes, S.P., H. Li 2001; Fernandezresa et al. 1995). Светлите ивици в гела могат да бъдат количествено определени чрез денситометрия (Frederick Woessner 1995). Зимографията се основава на следните принципи: (i) по време на електрофорезата желатинът се задържа в гела; (ii) MMP активността е обратимо инхибирана от SDS по време на електрофореза; и (iii) SDS причинява дисоциирането на MMP-TIMP комплекси по време на електрофореза. Това позволява откриването на MMP и TIMP независимо един от друг (Hawkes, S.P., H. Li 2001). Допълнително предимство на зимографията е, че както проензимите, така и активните форми на MMP могат да бъдат разграничени въз основа на тяхното молекулно тегло (Frederick Woessner 1995). За откриването на MMP-2 и MMP-9, се използва желатинова зимография, при която могат да бъдат открити нива на ензима от 10 pg (Kleiner & Stetlerstevenson 1994). При използването на ELISA за определянето на MMP не можем да оценим реалната активност на металопротеиназите, а така също и това дали те са в свободна или свързана с инхибиторите форма, тъй като в повечето случаи използваните антитела срещу MMP-2 и MMP-9 разпознават както активните, така и неактивните форми на ензимите. Специфичността и чувствителността на метода също са по-ниски в сравнение със зимографията. От друга страна методът е по-бърз и не така трудоемък и лесно може да се приложи в клиничната практика. В настоящото проучване използвахме и двата метода за изследване на MMP-2 и MMP-9, но нямахме възможност да проследим дали се запазват тенденциите при

сравняваните показатели в зависимост от метода за анализ, тъй като за всяка от изследваните течности бяха прилагани един от двата метода.

Получените от проведеното проучване резултати показват значително повишена активност на MMP-9 димер при яйцеклетки с експандирали кумулусни комплекси. Pro-MMP-9 съществува в две основни форми: мономерна (92 kDa) и дисулфидно свързана хомодимерна (220 kDa) форма. Както мономерните, така и димерните форми, са идентифицирани в различни клетки, продуциращи pro-MMP-9, включително нормални (Triebel et al. 1992; Kjeldsen et al. 1993; Toth et al. 1997) и туморни клетки (Moll et al. 1990) и в различни биологични течности (Mautino et al. 1997) и тъкани (Upadhya et al. 1997; González-Avila et al. 1998). Това показва, че те са физиологични форми на ензима. Установено е, че мономерните и димерните форми на pro-MMP-9 свързват TIMP-1 със сходни афинитети. За разлика от това, TIMP-2 се свързва само с активните форми (Olson et al. 2000).

Макар и несигнификатна наблюдаваме тенденция за повишена активност на act-MMP-9 при експандирали кумулусни комплекси, докато активността на pro-MMP-9 е понижена в сравнение с не експандиралите. При естествените спонтанни цикли ядреното съзряване на яйцеклетките протича паралелно на постепенното ФСХ-зависимо експандиране на кумулусните клетки и корона радиата, този синхрон може да бъде нарушен в стимулирани цикли (Laufer et al. 1984). При стимулираните цикли, 34–38 часа след тригериране на овулацията, се наблюдава типичен зрял преовулаторен COC с радииращи клетки на корона радиата, заобиколени от експандирала и разрехавена маса от кумулусни клетки. В по-голямата си част, експандиралите COC съдържат зрели яйцеклетки на стадий MII, въпреки че е възможно след стимулация с гонадотропин да се открият незрели яйцеклетки на стадий GV или MI в COC с муцифициран кумулус и радиираща корона радиата. Това води до заключението, че активността на MMP-9 е повишена след индукция на овулацията в големите преовулаторни фоликули. По отношение на активността на MMP-2 не установяваме подобни зависимиости. Концентрацията и на двата ензима, както и на техните тъканни инхибитори, не показва разлика между групите с експандирал и компактен COC.

В проучвания направени при животни е установена регулаторната роля на MMP-2 в процеса на овулация и формирането на жълтото тяло (Gottsch et al. 2002). В проучване от 2015 година (Yang et al. 2015) установяват корелация между активността на MMP-2 и степента на зрялост на яйцеклетките. В настоящото проучване данните сочат за наличие на подобна връзка, но това, което установяваме е точно обратното, а именно значително повишена активност на act-MMP-2 във фоликули, съдържащи незрели яйцеклетки GV в сравнение с активността във фоликули, съдържащи яйцеклетки с интермедиерна степен на зрялост MI, но не и с тези съдържащи зрели яйцеклетки (MII). Предполага се, че MMP-2 има активно участие в ранното развитие на фоликулите (D'Ascenzo et al. 2004). В проучване, проведено при плъхове се установява висока имунореактивност на MMP-2 в гранулозни клетки и повърхностен епител при фоликули в ранните етапи от развитието им (Bagavandoss 1998). При хора също е установена повишена експресия на MMP-2 иРНК в клетки, заобикалящи малки развиващи се фоликули, което потвърждава ролята на ензима в ранното фоликулно развитие (Shalev et al. 2001). От друга страна установяваме близка до сигнификантната разлика в активността на act-MMP-9, която е по-висока във фоликулни течности, съдържащи атретични яйцеклетки в сравнение с тези, съдържащи MII. Вероятно повишената активност на MMP-9 би могла да бъде свързана с фоликулна атрезия, тъй като е установено акумулирането на MMP-9 в лутеинизирали гранулозни клетки (Fedorcsák et al. 2010), като повишената секреция на MMP-9 и понижената на TIMP се считат за ключови по време на лутеолиза (Duncan 2000). Според някои автори активната форма на MMP-2 и pro-MM-9 се установяват само в атретични фоликулни течности (Goldman & Shalev 2004). Проследявайки концентрацията на изследваните от нас матриксни металопротеинази откриваме връзка със зрелостта на яйцеклетките единствено за MMP-9, като установяваме, че концентрацията на MMP-9 е значително повишена при яйцеклетки с интермедиерна степен на зрялост MI в сравнение с тази при фоликули съдържащи незрели GV. Не установяваме разлика в концентрациите на ензима между MI и MII яйцеклетки. Според някои автори, концентрацията на MMP-9 и TIMP е свързана с качеството на фоликулите и биха могли да бъдат използвани като маркери за фоликулното развитие, като установяват значителна корелация

между нивата на ММР-9 иРНК в гранулозни клетки от преувулаторни фоликули и броя на зрелите яйцеклетки, което не се потвърждава от получените от нас резултати. Причината за това разминаване би могло да се дължи на факта, че изследваните от нас фоликулни течности са резултат на контролирана овариална хиперстимулация, при която се селектират и развиват повече фоликули за разлика от физиологичната селекция на фоликули, която се извършва по време на овариалния цикъл. При сравняване на концентрациите на ММР-2 и ММР-9 във фоликулни течности от нормално овулиращи жени и жени в *in vitro* процедура, се установяват по-ниски стойности на ММР при жените от IVF/ICSI циклите (D'Ascenzo et al. 2004). Трябва да се има предвид и факта, че в нашето проучване за първи път се изследват фоликулни течности, събирани поотделно и данните получени за ММР се съотнасят за яйцеклетките, получени от съответния фоликул, както и към съответните ембриони, получени след оплождането на яйцеклетките. Резултатите от направените до сега проучвания показват, че най-вероятно ММР-2 играе важна роля по време на фоликулния растеж и развитие, докато ММР-9 участва предимно в руптурирането на фоликулната стена по време на овулация (D'Ascenzo et al. 2004; Goldman & Shalev 2004; Yang et al. 2015). Предвид голямото разнообразие от субстрати и биологични пътища, които повлияват матриксните металопротеинзаи, ензимната им активност е комплексно регулирана на ниво генна ескресия, протеинова секреция, зимогенна активация и специфично инхибирана от няколко тъканни инхибитори на металопротеиназите. Установена е повишена експресия на TIMP около моментът на настъпване на овулация (Lind et al. 2006), докато други проучвания установяват повишена експресия на ММР и понижена такава на TIMP (Hulboy et al. 1997). В нашето проучване не установяваме връзка на концентрацията на TIMP-1 и 2 и степента на зрялост на яйцеклетката, което потвърждава данни от други подобни проучвания (Yang et al. 2015).

Качество на яйцеклетките, оплождане и ембрионално развитие

До голяма степен качеството и потенциалът за развитие на ембрионите, получени по време на асистирана репродукция зависят от степента на ядрена и цитоплазмена зрялост на яйцеклетките. След провеждането на контролирана

овариална хиперстимулация наред с качествените яйцеклетки се събират и такива, които при физиологични условия никога не биха стигнали до овулация. Наличието на различни дисморфизми при яйцеклетките се свързва с намален оплодителен потенциал и влошено качество на ембрионите. Дисморфизмите условно се разделят на две групи – цитоплазмени (включения, рефрактилни телца, централна гранулираност, вакуоли, агрегати от гладък ендоплазмен ретикулум) и екстрацитоплазмени дисморфизми (морфология на ПТ, размер и гранулираност на ПВП, дефекти в ЗП и аномалии във формата на яйцеклетката), като наличието на фрагментирани ПТ и увеличено ПВП, както и фрагменти в ПВП са индикатори за стареене на яйцеклетката (Balaban et al. 2011). Получените от нас резултати показват значително повишена активност на act-MMP-2 в аспирати от фоликули, съдържащи яйцеклетки с нормална морфология на ПТ и хомогенна цитоплазма в сравнение с централно гранулираните. Концентрацията на ензима във фоликулни течности на яйцеклетки с различни морфологични особености не показва различия. От друга страна концентрацията на MMP-2 е повишена в случаите на яйцеклетки без фрагменти в ПВП, с хомогенна в сравнение със зърниста цитоплазма и с нормална морфология на ПТ. Съотношението MMP-2/TIMP-2 също е значително по-високо във фоликулни течности, съдържащи яйцеклетки с нормална морфология на ПТ, което е в подкрепа на теорията за водещата регулаторна роля MMP-2 в предовулаторното развитие на фоликулите, и значението на финия баланс на регулация на ензимната активност за адекватното протичане на процесите на матурация на яйцеклетките (Yang et al. 2015). Би могло да се спекулира, че повишената секреция на MMP-2 във фоликулни течности е маркер за качеството на яйцеклетките. Това се потвърждава от факта, че установяваме тенденция, активността на ензима да е повишена и при адекватно развиващи се ембриони с добра морфология.

Активността на act-MMP-9 и MMP-9 димер е значително повишена при яйцеклетки с тънка зона пелуцида, увеличено ПВП. MMP-9 е с повишена активност също и при яйцеклетки с фрагментирано ПТ. При яйцеклетки с централно гранулирана цитоплазма установяваме също повишена активност на pro-MMP-9 и MMP-9 димер. Концентрацията на MMP-9 е повишена при

яйцеклетки с фрагменти в ПВП, както и съотношението MMP-9/TIMP-1. От друга страна наблюдаваме по-висока концентрация на MMP-9 при фоликулни течности, съдържащи яйцеклетки с хомогенна и зърниста цитоплазма в сравнение с централно гранулирана. По отношение на концентрацията на TIMP-1 и TIMP-2 не се установяват значителни разлики за нито една от изследваните групи, касаещи морфологията на яйцеклетките. Единствено се наблюдава повишена концентрация на TIMP-1 при яйцеклетки с нормални размери на ПВП в сравнение с увеличено такова, което най-вероятно е свързано с преобладаваща инхибираща активност на MMP-9 в адекватно развиващите се преовулаторни фоликули. Предполага се, че MMP-9 участва в руптурирането на фоликулите (Goldman & Shalev 2004), като повишената експресия на иРНК за MMP-9 от гранулозните клетки корелира значително с броя на зрелите и качествени яйцеклетки, получени след фоликулна пункция (Robert et al. 2001). Тези наблюдения не се потвърждават от нашето проучване, което е първото свързващо конкретната концентрация и активност на MMP и техните инхибитори във фолукулни течности с качеството на съответните яйцеклетки. Получените от нас резултати по-скоро показват връзка между нормалната морфология на яйцеклетките и значително по-високата концентрация на MMP-2 във фоликулните течности. И обратното, наблюдаваме много по-висока концентрация на MMP-9 във фоликулните течности, съдържащи яйцеклетки с морфологични дефекти (фрагменти в ПВП, фрагментирани ПТ и тънка зона пелуцида), които обикновено се асоциират с пост-матурни яйцеклетки с лошо качество. Тези резултати се подкрепят от факта, че установяваме значително повишена активност на MMP-9 в случаите на ембриони с фрагменти в сравнение с тези, които са в арест, както и близко до сигнификатното повишение в сравнение с ембрионите с добра морфология. Неубедителните резултати, които получаваме, може да се дължат на малкия брой случаи в някои от сравняваните групи, което пък се дължи на ограниченията, наложени от работата с материали, които са обект на множество етични ограничения.

Предишни проучвания върху експресията на MMP-2 хвърлят светлина върху ролята на ензима за метаболизма на гранулозните клетки, като потвърждават важната роля на MMP-2 във физиологията на фоликула и

яйцеклетката. Дисбаланс в експресията и активността на MMP-2 би довел до нарушения във фоликулния растеж и развитие и липса на овулация (Luddi et al. 2018). Не са много проучванията по отношение на ролята на MMP-9 за физиологията на овариалните фоликули. MMP-9 вероятно играе роля при разграждането на извънклетъчния матрикс по време на растежа и развитието на фоликулите, при миграцията на фоликулите в яйчниковия кортекс, има значение за овулацията и за контрола на други процеси, включително клетъчния цикъл (Jovanović et al. 2010).

Освен в контрола на реорганизацията на ЕЦМ, MMP участват и в контрола на био наличността на хормоните, растежните фактори и осмотично активните молекули чрез регулиране на локалното натрупване и активиране на тези фактори, както и клетъчния отговор към извънклетъчните стимули и комуникацията между клетките (Taipale & Keski-Oja 1997; Visse & Nagase 2003; Nagase et al. 2006; Ambekar et al. 2013; Fan et al. 2014). В резултат на това нарушеният контрол на активността на MMP може да има сериозен отрицателен ефект върху развитието и узряването на фоликулите и яйцеклетките, причиняващи прекомерно разграждане не само на фоликулния ЕЦМ, но също така и на местните растежни фактори и кофактори, на рецептори на клетъчната повърхност на фоликула, и вероятно също и върху нарастващите яйцеклетки (Nissinen & Kähäri 2014).

Аберантната активност на MMP може също да повлияе върху кумулусно-ооцитния комплекс и целостта на зона пелуцида, което се изразява в деградация на междуклетъчните връзки, както между самите кумулусни клетки, така и между кумулусните клетки и яйцеклетките, с последващо увреждане качеството на самите яйцеклетки. Роля за тази абнормна активност вероятно имат и нарушения баланс MMP/TIMP, както и повишените нива на оксидативния стрес в самите фоликули (Bianchi et al. 2016).

По отношение на концентрацията на TIMP-1 и TIMP-2 не се установяват значими разлики за нито една от изследваните групи, касаещи морфологията на яйцеклетките и получените след оплождането им ембриони. В направеното от нас проучване не установяваме връзка на MMP2, MMP-9 и TIMP-2 с фертилизационния индекс. Експресията на TIMP в яйчника достига своя

максимум около момента на овулация (Lind et al. 2006). Освен инхибиране активността на MMP, TIMP имат отношение към регулация на клетъчен растеж и апоптозата посредством свързване към специфични клетъчни рецептори (Stetler-Stevenson 2008). Те също така участват на автокринно и паракринно ниво в регулацията на клетъчната пролиферация, диференциация, неоваскуларизация и стероидогенеза в растящите фоликули (D'Ascenzo et al. 2004). Регулацията на стероидната синтеза от TIMP-1 се извършва при значително по-ниски концентрации от тези, необходими за инхибирането на MMP (Boujrad et al. 1995). Това, което установяваме е значително повишена концентрация на TIMP-1 във фоликулни течности, в случаите на неосъществена фертилизацията на яйцеклетките. Установените от нас повишени нива на експреся TIMP-1 в кумулусни клетки от жени над 38 годишна възраст, трудно реагиращи на стимулация, очертават значението на тази молекула в хомеостазата на ЕЦМ. Повишената експресия на TIMP-1 в тези клетки може да бъде свързана с намалена фертилност, вероятно поради промяна на финото балансиране между активността на MMP и техните инхибитори (Luddi et al. 2018).

Имплантация и бременност

Известно е, че трансферирането на качествени ембриони е свързано с по-висока вероятност от настъпване на бременност, но все още не е открит серумен или фоликулен биомаркер, който директно показва качеството на ембрионите. Ролята на MMP по отношение на човешката репродукция остава неясна. Според резултати от предходни проучвания не се установява разлика в концентрацията на MMP-2 при бременни или небременни след *in vitro* процедура (Lee et al. 2005; Horka et al. 2012; Luddi et al. 2018). Нашето проучване не потвърждава данните от литературата, тъй като ние установяваме, че концентрацията на фоликулната MMP-2 е значително повишена в групата, при която не се установява имплантация и в случаите на спонтанни аборти. Същата зависимост установяваме и по отношение на съотношението MMP-2/TIMP-2 в описаните две групи. Установената значително по-висока концентрация на MMP-2 в случаите на липса на ембрионална имплантация и спонтанни аборти, показва, че продуцирането на зрели и качествени яйцеклетки от яйчника е резултат от

финия баланс на експресията и ензимна активност на MMP-2, както и участието на други фактори. В случая повишената концентрация на MMP-2, вероятно е признак за функционална незрялост на яйцеклетките. По отношение на концентрацията на MMP-9 и TIMP-1 и 2 не установяваме връзка с процента забременели пациенти. Интересен е фактът, обаче, че наблюдаваме значително повишена активност на act-MMP-9 и MMP-9 димер, както и високи концентрации на MMP-9 и съотношението MMP-9/TIMP-1 в случаите, когато бременността протича без проблем и приключва с раждане. Доказано е, че тази металопротеиназа е основополагаща за фертилитета при бозайниците. Установеное, че мишки с дефицит на MMP-9 раждат средно по-малко на брой малки, отколкото мишки с не нарушена продукция на MMP-9 (Dubois et al. 2000). При хората еднонуклеотиден полиморфизъм в промоторния регион на MMP-9 е свързан с повишен риск от идиопатични повтарящи се спонтанни аборти (Pereza et al. 2012). Освен това Goldman et al. (Goldman & Shalev 2004) предполагат, че MMP-9 може да участва в разпадането на фоликулите, а високите нива на pro-MMP-9 в преовулаторни фоликулни течности са предпоставка за успешна имплантация и бременност при *in vitro* циклите (Lee et al. 2005).

В заключение, концентрацията на MMP-9 може да бъде предиктор за успешния резултат от *in vitro* процедурата, което се потвърждава и от други автори (Lee et al. 2005; Horka et al. 2012; Yang et al. 2015; Luddi et al. 2018)

Културелни среди от ембриони

Точният механизъм на прикрепяне на ембрионите към ендометриума при хора не е напълно изяснен. Дълго време механизмът на трофобластна инвазия през първия триместър от бременността е основният модел за обяснение на бластоцистната имплантация. Съществува недостатъчно информация относно това кога човешките ембриони започват да експресират MMP и TIMP. Някои ранни проучвания в тази насока (Puistola et al. 1989; Fisher & Damsky 1993) установяват наличието на MMP-9 активност в среда от култивирани ембриони. За да се стимулира процесът на имплантация е необходимо протичането на

биохимичен „диалог” между майката и ембриона, при който едометриума и ембрионите взаимно си влияят, индуцирайки промени, водещи до стимулиране на ембрионалното развитие и ендометриалната рецептивност. Установена е експресията на екстрацелуларни матриксни протеини, хормони, цитокини, растежни фактори и техните рецептори периимплантационно във фалопиеви тръби и ендометриум (Bischof & Campana 1996; Raheem 2018). Тези важни биологични молекули участват в диалога между клетките, необходим за ембрионалното развитие, подготовката на ендометриума за имплантация и същинския процес на имплантация. Информационни РНК молекули за ММР и TIMP и съответстващите им протеини са открити в репродуктивни тъкани от различни бозайници. ММР и техните инхибитори са локализирани предимно в местата на имплантация (Reponen et al. 1995; Huang et al. 1998). При хора ММР и TIMP се откриват в трофобластни клетки, изолирани от плацентарни вили в първия триместър от бременността. Wang и сътрудници (Wang et al. 2003) установяват експресията на MMP-1, MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, TIMP-2 и TIMP-3 от човешки предимплантационни ембриони. Известно е, че ембрионалният геном при човек се активира на стадий 4-8 клетки. Детекцията на тези ензими и техните инхибитори в този ранен стадий на развитие предполага, че гените за матриксните металопротеинази са сред първите, които се активират в човешки ембриони и имат съществена роля в процесите на имплантация, като осъществяват автокринна и паракринна регулация на процеса (Wang et al. 2003). Други проучвания установяват секрецията на ММР-9 от двуклетъчни човешки ембриони, като нивата на есекспресия се повишават с напредване на ембрионалното развитие. Това показва, че ММР-9 най-вероятно е важен фактор в процеса на развитие на ембрионите и е тясно свързан с тяхното качество и имплантационен потенциал (Gu & Han 2015).

В настоящото проучване след анализ чрез ELISA метод на културелни среди от ембриони култивирани до пети ден след оплождането, установяваме, че секрецията на ММР-9 от ембриони качество I степен е значително по-висока в сравнение с тези от II и III степен, което е в съответствие с резултатите от други подобни проучвания (Wang et al. 2003; Lee et al. 2005; Gu & Han 2015). За разлика от други автори (Gu & Han 2015), не установяваме връзка между

концентрацията на MMP-9 и имплантацията и изхода от бременността, което може да се дължи на малкия брой случаи в групите, което не позволява да се извърши достоверен анализ. В друго проучване, направено от Sallam et al., концентрацията на MMP-9 както в културелна среда така и във фоликулната течност чрез (ELISA) не корелира с качеството на ембрионите и изхода от бременността (Orief et al. 2013). Не установяваме зависимости между секрецията на MMP-2 и TIMP-1 и 2 и качеството на ембрионите, както и резултата от процедурата. Това потвърждава данните от други подобни проучвания, които не установяват връзка между експресията на MMP-2 (установена както чрез ELISA така и чрез зимография), и степента на опложданe, имплантация и бременност (Orief et al. 2013). Така че разликата в тези параметри вероятно зависи от други фактори, а не от нивото на MMP-2 и TIMP-1 и 2 в културелната среда.

Взети заедно нашите констатации и данните от литературата показват, че MMP-9 има важна роля за регулацията на трофобластната инвазия при процеса на имплантация, което може да има важни последици за имплантирането на ембрионите, и насочва към разработването на нови стратегии за селекция на ембриони за ембриотрансфер с цел намаляването на риска от спонтанни аборти.

VII. Изводи

1. Активността на act-MMP-2 във фоликуларни течности по време на IVF / ICSI процедурата има значителна връзка със степента на зрялост на яйцеклетките. Тя е значително по-висока в случаите на незрели яйцеклетки. Активността на act-MMP-9 е по-висока във фоликуларни течности, съдържащи атретични яйцеклетки.
2. Не установяваме връзка между концентрацията на TIMP-1 и степента на зрялост на яйцеклетката, което потвърждава данни от други подобни проучвания (Yang et al. 2015).
3. Наличието на яйцеклетки с добра морфология е свързано със значително по-високи концентрации на MMP-2 във фоликуларните течности. Концентрацията на MMP-9 е по-висока в фоликуларните течности съдържащи яйцеклетки с морфологични дефекти (фрагменти в ПВП,

фрагментирани ПТ и тънка зона пелуцида) които обикновено се асоциират с “презрели” яйцеклетки с лошо качество.

4. Активността на ММР-9 във фоликулни течности е значително повишена при ембриони с лоша морфология. Наблюдава се тенденция за повишена активност на act-ММР-2 във фоликулни течности при ембриони с адекватно развитие.
5. Концентрацията на фоликуларната act-ММР-2 е значително повишена в случаите, когато не се установява имплантация и в случаите на спонтанни аборти. Наблюдава се значително повишена активност и концентрация ММР-9 в случаите, когато бременността протича без проблем/нормално и приключва с раждане.
6. При анализ на данните за TIMP-2 не се установиха никакви разлики в концентрацията между групите при нито един от изследваните параметри.
7. Секрецията на ММР-9 от морфологично добри ембриони е значително повишена, което е в съответствие с резултатите от други подобни проучвания (Wang et al. 2003; Lee et al. 2005; Gu & Han 2015).
8. Не установяваме връзка между концентрацията на ММР-9 в културелни среди и имплантацията и изхода от бременността.
9. За ММР-2 и TIMP-1 не установяваме зависимости по отношение на тяхната концентрация в среди от култивирани ембриони и качеството на ембрионите, както и резултата от процедурата.

VIII. Приноси във връзка с дисертационния труд

Приноси с оригинален характер:

1. За първи път се изследват фоликуларни течности, събирани поотделно и данните получени за ММР се съотнасят за оценка на зрялост и морфология на конкретните яйцеклетки, получени от съответния фоликул, както и към съответните ембриони, получени след оплождането им.
2. Установява се по-висока концентрация на ММР2 във фоликуларните течности, съдържащи яйцеклетки с добра морфология.
3. Доказана е връзката на повишената концентрация на ММР-9 фоликуларни течности с наличието морфологични дефекти в яйцеклетките.

4. Установява се повишена активност на MMP-9 във фоликулни течности при ембриони с лоша морфология.
5. Установяваме, че повишената активност и концентрация на MMP-2 във фоликулните течност са свързани с повишен риск от спонтанни аборти.

Приноси с потвърдителен характер:

6. Потвърждават се литературните данни относно високи концентрации на MMP-9 и в случаите, когато бременността протича без проблем и приключва с раждане.
7. Потвърдена е повишената секреция на MMP-9 от ембриони с добро качество в сравнение с тези с лоша морфология.

IX. Приложения

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията:

1. Ayvazova N, Ilieva L, Konova E, Atanasova M. Levels of MMP-2, Timp1 and Timp2 in follicular fluids in women undergoing *in vitro* fertilization and their relationship to oocyte quality.: JBCR. 2019

2. N. Ayvazova, V. Rilcheva, E. Konova, R Roussev, P. Rashev. Matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 activities in seminal plasma. JBCR, vol. 9 (2), 2016, 21-29

Списък на участията в научни конференции във връзка с дисертацията:

1. Ayvazova N, Ilieva L, Konova E, Atanasova M. Levels of MMP-2, Timp1 and Timp2 in follicular fluids in women undergoing *in vitro* fertilization and their relationship to oocyte quality [poster]: Jubilee Scientific Conference “45 years Medical University – Pleven”; 31 October – 2 November; 2019; Pleven. JBCR 2019,12(1),suppl.2. p.26. ISSN 1313-6917

2. Айвазова Н, Мартинов Д, Илиева Л, Конова Е, Атанасова М. Концентрация на матриксни металопротеинази 2 и 9 и timp1 и 2 във фоликулни течности при жени подложени на контролирана овариална хиперстимулация

[постер]: XIII Национална конференция по медицинска биология; 2019 септември 13-15;Варна.

3. Ayvazova N, Martinov D, Konova E, Atanasova M, P31.Matrix metalloproteinases 2 And 9 activity In follicular fluids of women undergoing controlled ovarian hyperstimulation and their relationship to follicular maturation and oocytes quality. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, June 15-17, 2018, Varna, Bulgaria

4. Ayvazova N, Martinov D, Gincheva D, Atanasova M, Konova E, Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity and concentration in follicular fluids from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation and their relationship to oocyte's and embryo's quality. V National Congress of Immunology, 24-28 October 2018, Plovdiv, Bulgaria

5. N. P. Ayvazova, L. O. Ilieva , E. I. Konova, P. I. Rashev, M.A. Atanasova. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in follicular fluid and their relationship to the quality of the oocytes and embryos. XII National Conference of Medical Biology, September 8-10, 2017. Folia Medica, 2017. Vol. 59, Suppl 1.p.25. ISSN1314-2143

6. Ayvazova N, Ilieva L, Konova E, Atanasova M. Levels of expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in follicular fluid in women undergoing COHS and their relationship to the quality of the oocytes. Seventh Workshop in reproductive medicine 2017 – controversies and consensus. 28-30 April 2017, Pleven, Bulgaria

7. Ayvazova N, Owku D, Sonde S, Atanasova M, Martinov D, Konova E, Difference in metalloproteinase activity in seminal plsma of normozoospermic and teratozoospermic semen samples. 18th Craiova International Students' Conference, 10-13th November 2016. ISSN 2285-6420

Участие в проекти:

Участие в 2 проекта в МУ-Плевен

D3/2017 „Функционален анализ на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от периовулторни фоликули при жени, подложени на *in vitro* оплождане и определяне на активността на ензимите в кондиционирани среди вследствие култивиране на човешки предимплантационни ембриони”

D2/2018: „Експресионни нива и активности на MMP-2 и MMP-9 и техните тъканни инхибитори в гранулозни клетки от човешки периовулаторни фоликули и в кондиционирани среди от човешки предимплантационни ембриони”.