



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2022, 9(1): 11-17

İnsan Endometriyum Epitel Hücrelerinde Farklı Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyonu Protokollerinin Eksozom Belirteci CD63 Üzerine Etkisi

Effect of Different Controlled Ovarian Hyperstimulation Protocols on Exosome Marker CD63 in Human Endometrial Epithelial Cells

Melike Özgül Önal^{1*}, Yıldız Uyar², Ulviye Cansu Öztürk², Hafize Seda Vatansever^{3,4}.

¹Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye.

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye.

³Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

⁴Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs.

e-mail: melikeozgulonal@gmail.com, yildizuyar@ttmail.com, u_cansu_basaran@hotmail.com,

sedavatansever@yahoo.com

Orcid: 0000-0001-6710-5729

Orcid: 0000-0003-1104-2786

Orcid: 0000-0002-1718-5422

Orcid:0000-0002-7415-9618

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Melike Özgül Önal

Gönderim Tarihi / Received: 07.05.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 03.10.2021

DOI: 10.34087/cbusbed. 933914

Öz

Giriş ve Amaç: Eksozomlar; protein, mRNA ve miRNA'ları taşıyan ve hedefledikleri hücrelerde/dokularda fonksiyonel değişikliklere neden olan kargo sistemleridir. CD63, eksozomların tanımlanması ve izolasyonu için anahtar proteindir. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu (KOH) protokollerinde kullanılan farmakolojik ajanların oosit sayısını ve kalitesini artırarak ovulasyonu indüklediği bilinmekte fakat endometriyum hücreleri üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada; CRL-1671 insan endometriyum hücrelerinde, KOH protokollerinde kullanılan ilaçlarının eksozom belirteci olan CD63 üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: CRL-1671 hücreleri; kontrol grubu, büyüme hormonu (GH) uygulanan grup, Gonadotropin (GnTR) uygulanan grup, GH+GnTR uygulanan grup, Letrozol (L)+GnTR uygulanan grup ve üçlü kombine (L+GnTR+GH) grubu olacak şekilde 8 gün boyunca kültüre edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerde CD63 dağılımı indirekt-immunositokimya tekniği ile incelendi.

Bulgular: CD63 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda orta (++) , GnTR ve L+GnTR gruplarında kuvvetli (+++) ve diğer ilaç uygulanan gruplarda orta (++) şiddette olduğu gözlemlendi. H-score değerleri sırası ile 298 ± 6,71; 300 ± 5; 397 ± 12,55; 303 ± 2,74; 302 ± 5,70 ve 391 ± 4,18 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GnTR ve L+GnTR uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlı farklılık belirlendi (p<0.001).

Sonuç: GnTR ve L+GnTR uygulanan gruplarda CD63 immunoreaktivitesinin arttığı görüldü ve bu artışın endometriyum epitel hücrelerinde eksozom biyogenezinin artması sonucunda ortaya çıktığı düşünülmüştür. GH uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmaması GH uygulamalarının eksozom biyogenezini etkilemediği sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde letrozol kullanımının eksozom biyogenezini etkilemediği de belirlenmiştir. Sonuç olarak KOH protokollerinde kullanılan ilaçların endometriyum hücrelerindeki eksozomların regülasyonunu nasıl etkilediklerinin aydınlatılmasıyla; bu regülasyonların endometriyal değişikliklerin tanısında ve IVF çalışmalarının başarılı infertilite oranlarının değerlendirilmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür.

Abstract

Objective: Exosomes are cargo systems that carry proteins, mRNAs and miRNAs and cause functional changes in the cells/tissues they target. CD63 is the key protein for the identification and isolation of exosomes. It is known that pharmacological agents used in controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocols induce ovulation by increasing the number and quality of oocytes, but their effects on endometrial cells are not fully understood. In this study, it was aimed to evaluate the effects of drugs used in COH protocols on CRL-1671 human endometrium cells on exosome marker CD63.

Materials and Methods: CRL-1671 cells were cultured for 8 days as control group, growth hormone (GH) treated group, Gonadotropin (GnTR) treated group, GH+GnTR treated group, Letrozole (L)+GnTR treated group and triple combined (L+GnTR+GH) group. At the end of the incubation, the distribution of CD63 in the cells was examined using the indirect-immunocytochemistry technique.

Results: It was observed that CD63 immunoreactivity was moderate (++) in the control group, strong (+++) in the GnTR and L+GnTR groups, and moderate (++) in the other treated groups. The H-score values were calculated as 298 ± 6.71 ; 300 ± 5 ; 397 ± 12.55 ; 303 ± 2.74 ; 302 ± 5.70 and 391 ± 4.18 , respectively. A significant difference was found between the GnTR and L+GnTR groups compared to the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: CD63 immunoreactivity increased in GnTR and L+GnTR groups and this increase was thought to be due to the increase in exosome biogenesis in endometrial epithelial cells. There wasn't significant difference between the GH treated groups and control group thus it was concluded that GH treatments did not affect the exosome biogenesis. Similarly, it was thought letrozole didn't affect exosome biogenesis. As a result, by clarifying how the drugs used in COH protocols affect the regulation of exosomes in endometrial cells, it is predicted that these regulations can be used in the diagnosis of endometrial changes and in the evaluation of successful infertility rates of IVF studies.

Keywords: CD63, COH, CRL-1671, Endometrium, Exosome.

1. Giriş

Günümüzde infertilite, teşhisi ve tedavisi ile global bir sorundur. İnfertil çiftler değerlendirildiğinde infertilite nedenlerinin %37'sinin dişi, %35'inin dişi ve erkek birlikte, %8'inin erkek kökenli olduğu görülmektedir. Dişi infertilitesinin %25'ini ovulasyon bozuklukları, %15'ini endometriyozis, %12'sini pelvik anormalilikler, %11'ini tubal tıkanıklıklar ve %11'ini uterin problemler oluşturmaktadır [1]. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu (KOH) tedavi protokolleri, in vitro fertilizasyon (IVF) için oosit toplamadan önce çok sayıda dominant folikül ve oositlerin oluşturulmasını sağlamak için yaygın olarak kullanılan tedavilerdir [2].

KOH; IVF ve embriyo transferinin kilit basamağı olarak kabul edilir. Büyüme hormonu (GH), gonadotropinler (GnTR) ve letrozol (L) dahil olmak üzere farklı ilaçları ve kombinasyonlarını içeren farklı KOH protokolleri bulunmakta ve vakaların durumuna göre farklı protokoller seçilebilmektedir. KOH protokollerinin, folikül/oosit sayısını ve kalitesini arttırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların endometriyum üzerindeki etkileri de implantasyon ve hamilelik sırasında kadın sağlığının ve embriyo gelişiminin devamlılığı için önemlidir [2].

Büyüme hormonu (GH) hipofiz bezinden salgılanır ve hem erken hem de geç foliküler fazlarda östradiol üretmek için granuloza hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır. Over rezervi, oosit gelişimi ve normal embriyo morfolojisi ile yakından ilgilidir. Bu nedenle GH, IVF tedavisi gören kadınlar için KOH protokollerinde yaygın olarak kullanılır [3]. KOH

sırasında GH uygulamasının, IVF sonuçları üzerinde faydalı etkiler gösterdiği belirtilmektedir. Genel olarak bu iyileşmenin, GH uygulamasının oosit kalitesi üzerindeki uyarıcı etkisinden kaynaklandığını belirten araştırmalar bulunurken aynı zamanda GH'nin endometriyum reseptivitesi üzerinde ki olası olumlu etkisinden kaynaklandığını söyleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu nedenle özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında ve düşük endometriyum kalınlığına sahip vakalarda GH kullanımının uterus düzeyinde ek bir potansiyel fayda sağlayabileceği belirtilmektedir [4].

Gonadotropinler, temel olarak folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH) ve insan koryonik gonadotropininden (hCG) oluşan bir grup hormondur. Normal foliküler gelişim için overlerde steroid hormonu üretimi için bu hormonların varlığı gereklidir [5]. Günümüzde gonadotropinlerin farklı çeşitleri ve bunların modifiye edilmiş formları olgun oosit elde etmek için kullanılmaktadır [6]. Gonadotropin tedavisi, genellikle anovuluar bozukluklar için kullanılan bir tıbbi yöntemdir. Gonadotropinler, çoklu klomifen sitrat kullanımlarından sonra gebe kalamayan kadınlar için ikinci basamak tedavi seçeneği olarak faydalı görülmektedir. Devam eden klomifen sitrat kullanımına kıyasla gonadotropinler ile canlı doğum oranının arttığını gösteren bir çalışma bulunmaktadır [7]. Buna rağmen 2010'da tamamlanan bir meta-analiz, bir tedavi seçeneğinin diğerine göre üstün olup olmadığına dair net bir kanıt olmadığını belirtmektedir [8].

Sebebi bilinmeyen infertilite tedavisi için kullanılan ve birinci basamak ilaç olan klomifen sitrat (CC), östrojen antagonistidir ve ön hipofizden gonadotropin salınımını artıran agonist etkileri olan seçici bir östrojen reseptör modülatörüdür [9]. Ovulasyon indüksiyonu için yaygın olarak kullanılan bir başka oral ilaç ise letrozoldür. Letrozol, androstenedion ve testosteronun estron ve estradiole dönüşmesini engelleyerek östrojen üretimini engelleyen bir aromataz inhibitörüdür [10]. Letrozol, meme kanserinin uzun süreli adjuvan tedavisi için endikedir ve ovulasyon indüksiyonu için kullanımı, etiket dışı kabul edilir. Bununla birlikte, ovulasyon indüksiyonunda kullanımının hem etkinliğini hem de güvenliğini destekleyen çok sayıda bilimsel çalışma ve çok sayıda komite görüşü vardır. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists)'ye göre letrozol, polikistik over sendromu (PCOS) olan kadınlarda klomifen sitrata göre birinci basamak tedavi olarak düşünülmelidir. Günümüzde letrozolün IVF tedavilerinde tek başına kullanımından çok diğer ajanlarla kombine tedavi şeklinde kullanımı yaygındır [11].

Eksozomlar; hücrelerden ekzositoz ile salınan, 40-100 nm boyutlarında, fosfolipid çift katmanlı veziküllerdir. Eksozomlar kültür süpernatantlarından veya idrar ya da kan gibi çeşitli vücut sıvılarından izole edilebilirler [12]. Eksozomlar bir hücreden diğer bir hücreye bilgi ve destek sağlayan kargolar gibi hareket etmekte ve hedef hücrede fonksiyonel değişikliklere neden olabilmektedirler [13]. Eksozomlar normal fizyolojiyi düzenledikleri gibi taşıdıkları protein, mRNA ve miRNA'lar ile patolojik süreçleri ortaya çıkarmada ya da ilerletmede de biyolojik rollere sahiptirler [12-13]. Yapılan çalışmalar ile eksozomlara özgü yüzey belirteçleri; tetraspaninler (CD63, CD9 ve CD81), Alix, Tümör Duyarlılığı Geni 101 proteini (TSG 101), majör histokompatibilite kompleksi I ve II (MHC I ve II) ve Isı Şok Proteini 70 (HSP 70) olarak tanımlanmıştır [14-15]. Eksozom sekresyonu, embriyonik kök hücreler ve embriyolar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde de *in vitro* olarak gösterilmiştir [16]. Bazı çalışmalar endometriyal epitelden türetilen eksozomların ve eksozomlardan daha büyük mikroveziküllerin (100-300 nm) uterus boşluğuna salındığını göstermiştir. Bu eksozomlar veya mikroveziküller taşıdıkları özel protein ve RNA içeriklerini implantasyonu desteklemek için trofektoderm hücrelerine veya endometriyumun diğer hücrelerine transfer edilebilmektedirler [17].

Bu çalışmada, farklı kontrollü ovarian hiperstimülasyon protokollerinin insan endometriyum epitel hücrelerinde ifade edilen CD63 üzerinde meydana getirdiği olası değişikliklerin karşılaştırılmasının immunositokimya tekniği ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre Kültürü, İlaçların Hazırlanması ve Deney Grupları

CRL-1671 (ATCC® RL95-2) insan endometriyal epitel hücreleri, %10 Föetal Sığır Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), 2 mM L-Glutamin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) içeren DMEM F-12 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) hücre kültür besiyeri ile 37°C ve %5 CO₂ koşullarına sahip nemli ortamda kültüre edildi.

Çalışmada, KOH protokollerinde kullanılan ilaçlar olan aromataz inhibitörlerinden letrozol (Femara; Novartis, Switzerland), büyüme hormonu olarak somatotropin (Saizen; Merck Serono, Italy) ve gonadotropin olarak follitropin alfa (Gonal-F; Serono, Switzerland) kullanıldı. Uygulamalar için kullanılacak doz ve günler belirlenirken rutin tedavilerde kullanılan standartlara bağlı kalındı. Ortalama 60 kg ağırlığında ve 160 cm boyunda olduğu varsayılan bir kişinin vücut yüzey alanı hesaplanarak kültür kabının yüzey alanına göre ilaç uygulamaları GH için 0.32922 µg/ml, GnTR için 0.00198 µg/ml ve Letrozol için 0.125 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

Çalışma; kontrol grubu, büyüme hormonu (GH) uygulanan grup, Gonadotropin (GnTR) uygulanan grup, GH + GnTR uygulanan grup, Letrozol (L) + GnTR uygulanan grup ve üçlü kombine (L + GnTR + GH) grup olmak üzere 6 grup olacak şekilde planlandı. GH uygulaması 1., 4., ve 8. günlerde, GnTR uygulaması 8 gün boyunca ve Letrozol uygulaması ise ilk 5 gün boyunca olacak şekilde klinik uygulamalardaki protokollere göre belirlenerek uygulandı. Letrozol ile GnTR birlikte uygulandığı gruplarda ise GnTR uygulamasına 3.gün başlandı ve 8.güne kadar devam edildi. *In vitro* olarak kullanılan ilaçların dozları ve uygulama zamanları **Tablo 1**'de verilmiştir

2.2. İmmunositokimya Analizi

İndirekt immunositokimya yöntemi, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 12 mm çapında steril cam yuvarlak lameller konularak gerçekleştirildi. Her gözde 5x10⁴ hücre/ml olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Hücreler %50 konfluensiye ulaştıklarında gruplara uygun olarak ilaç uygulamaları yapıldı. Çalışma tamamlandıktan sonra, her göz steril PBS (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) ile yıkandı ve tüm hücreler %4'lük paraformaldehit (387507, Carla Erba, France) ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyondan sonra 5'er dakikalık 3 kere PBS yıkaması ile fiksatif uzaklaştırıldı. Takiben %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (K31355100303, Merck, Darmstadt, Germany) uygulaması oda sıcaklığında gerçekleştirildi. PBS işlemi ile yıkama yapıldıktan sonra permeabilizasyon için %0,1'lik Triton®-X-100 (A4025, Biotomic, Kanada) ile hücreler 15 dakika buz üzerinde muamele edildi ve tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücreler 1 saat blokama solüsyonu (85-9043, Histostain®-Plus Bulk Kit, Invitrogen, Carlsbad, California, ABD) uygulamasından sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmeden anti-CD63 (sc-5275, Santa Cruz,

ABD) primer antikoru ile 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Ertesi sabah PBS ile yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikor (30 dakika) ve ardından streptavidin hidrojen peroksidaz (30 dakika) uygulandı (85-9043,

Histostain®-Plus Bulk Kit, İnvitrogen, Carlsbad, California, ABD).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ilaçların gruplara göre dozları ve uygulama zamanları

Grup	Doz (µg/ml)	Zaman
Kontrol	-	-
GH	0.32922	1., 4. ve 8. günlerde
GnTR	0.00198	8 gün boyunca
GH + GnTR	0.32922 + 0.00198	GH: 1., 4. ve 8. günlerde GnTR: 8 gün boyunca
L + GnTR	0.125 + 0.00198	L: İlk 5 gün GnTR: 3. günden 8. güne kadar
L + GnTR + GH	0.125 + 0.00198 + 0.32922	L: İlk 5 gün GnTR: 3. günden 8. güne kadar GH: 1., 4. ve 8. günler

uygulamasından sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmeden anti-CD63 (sc-5275, Santa Cruz, ABD) primer antikoru ile 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Ertesi sabah PBS ile yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikor (30 dakika) ve ardından streptavidin hidrojen peroksidaz (30 dakika) uygulandı (85-9043, Histostain®-Plus Bulk Kit, İnvitrogen, Carlsbad, California, ABD). İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra PBS ile yıkamalar yapıldı. DAB kromojeni (AEM080, ScyTek Laboratories, SensiTek HRP Anti-Polyvalent, Logan, Utah, ABD) oda sıcaklığında 1 dakika uygulanarak antijen antikor komplekslerinin görünürlüğü sağlandı. Daha sonra Mayer’in Hematoksilen (05-06002/L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boyası ile art alan boyaması gerçekleştirildi ve örnekler distile su ile yıkandı. Her bir gözdeki lameller lam üzerine alındı ve immunositokimyasal kapatma vasatı (AMT060, Aqueous-Mount, ScyTek Laboratories, Logan, Utah, ABD) ile kapatılarak ışık mikroskobu (BX43, Olympus, Japonya) altında incelendi. İndirekt immunositokimya yöntemi sırasında immunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile negatif kontrol boyamaları yapıldı. Her grup için deneyler üç kez tekrarlandı ve değerlendirmeler iki bağımsız araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

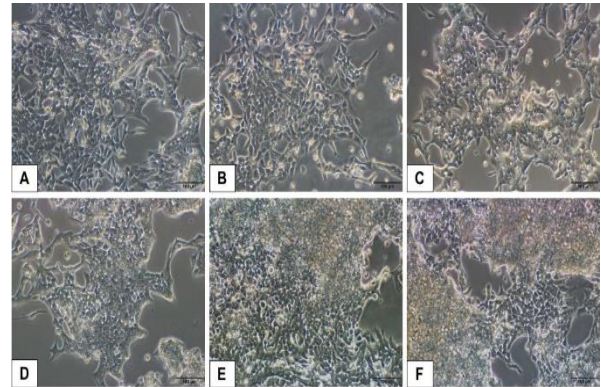
2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

İmmunositokimya boyama sonucu, örnekler 200x büyütmede değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Antikorların immunoreaktivite boyanma şiddetleri (i); hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olacak şekilde skorlandı. Her bir preparat için rastgele seçilmiş 5 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler sayılarak H-score değerleri belirlendi [H-score: $\sum P_i (i+1)$ (P_i: % pozitif boyanmış hücre sayısı; i: boyanma

şiddeti)]. Sonuçlar One-way ANOVA istatistiksel testi ile değerlendirildi ve değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi. İstatistiksel olarak p değeri 0.05’ten küçük elde edilen karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Her grup için deneyler üç kez tekrarlandı ve değerlendirmeler iki bağımsız araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

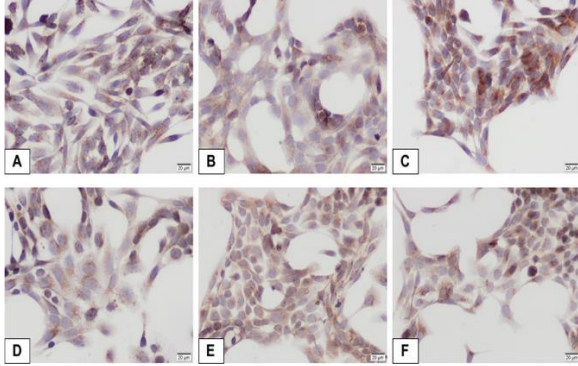
3. Bulgular ve Tartışma

CRL-1671 insan endometriyal epitel hücrelerinin, katmanlı tabakalar şeklinde büyüdükleri ve adherent hücre özelliklerine sahip oldukları belirlendi (Şekil 1A). İlaç uygulamaları gerçekleştirildikten sonra hücrelerde herhangi bir morfolojik değişiklik meydana gelmediği ve endometriyal epitel hücreleri arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinin bozulmadığı gözlemlendi (Şekil 1B-F).



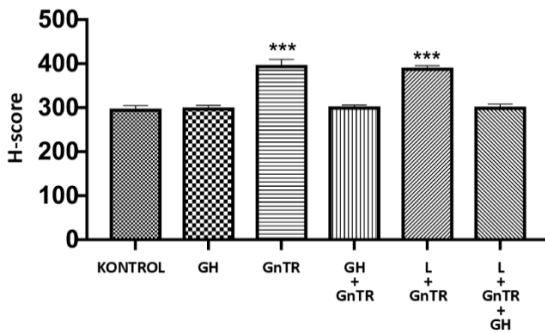
Şekil 1. CRL-1671 endometriyal epitel hücrelerinin ilaç uygulamaları sonrası sekizinci gündeki morfolojik görüntüleri. A: Kontrol Grubu; B: GH; C: GnTR; D: GH + GnTR; E: L + GnTR; F: GH + GnTR + L. Ölçek: 100 µm

CD63 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda orta (++) şiddette (Şekil 2A) ve GnTR ve L + GnTR gruplarında kuvvetli (+++) şiddette iken (Şekil 2C, Şekil 2E, sırasıyla), diğer ilaç uygulanan gruplarda orta (++) şiddette (Şekil 2B, Şekil 2D, Şekil 2F) olduğu gözlemlendi.



Şekil 2. CRL-1671 endometriyal epitel hücrelerine ait CD63 immunositokimyasal görüntüleri. CD63 immunoreaktivitesinin kontrol (A) grubunda orta (++) şiddette, GnTR (C) ve L + GnTR (E) gruplarında kuvvetli (+++) ve diğer gruplarda (B, D ve F) orta (++) şiddette olduğu görülmektedir. **A:** Kontrol Grubu; **B:** GH; **C:** GnTR; **D:** GH + GnTR; **E:** L + GnTR; **F:** GH + GnTR + L. Ölçek: 20 µm.

H-score değerleri sırası ile $298 \pm 6,71$; 300 ± 5 ; $397 \pm 12,55$; $303 \pm 2,74$; $302 \pm 5,70$ ve $391 \pm 4,18$ şeklinde bulundu (Şekil 3).



Şekil 3. Gruplara ait CD63 H-score değerleri (***) $p < 0.001$.

CD63 ifadesinin, GnTR uygulanan ve L + GnTR uygulanan iki tedavi grubunda arttığı belirlendi ($p < 0.001$). Diğer tedavi gruplarında CD63 seviyesi kontrol grubu ile benzer kalırken, ilaç uygulamalarının endometriyal epitel CRL-1671 hücrelerinde CD63 azalmasına neden olmadığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GnTR ve L + GnTR uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlı farklılık belirlenirken ($p < 0.001$) (Şekil 3), diğer uygulama yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Eksozomlar da dahil eksozomal veziküller, miRNA'lar ve proteinler gibi düzenleyici molekülleri taşıyan ve aktaran, bütün vücut sıvılarında bulunan ve hücreler ile dokular arasındaki hücre içi iletişime aracılık eden zar ile

çevrili veziküllerdir. Hem normal hem de patolojik koşullarda gametogenezden, fertilizasyona ve ardından implantasyona kadar olan süreçlerde eksozomların katkılarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, üreme sağlığını ilerletmek için değerli tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir [18].

İnfertilite tedavisi için uygulanan KOH protokollerinde kullanılan farmakolojik ajanların oosit sayısını ve kalitesini artırarak ovulasyonu indüklediği bilinmekte fakat endometriyum hücreleri üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir [2]. Bu nedenle KOH ajanlarının endometriyal hücrelerin biyogenezindeki etkilerini ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

GH genellikle PCOS'lu hastaların IVF tedavisinde ve over stimülasyonuna yetersiz yanıt veren, 35 yaş üstü ve oosit kalitesi düşük kadınların tedavisinde kullanılmaktadır. GH'nin oosit toplanması için gereken over stimülasyonunun süresini kısalttığı ve plasebo alan kadınlara göre daha fazla sayıda oosit toplanmasına yol açtığı bilinmektedir. Fakat literatürde GH tedavisi gören bir kadının canlı doğum şansının arttığını gösteren çalışmalar kısıtlıdır. GH'nin rolünün zayıf oosit kalitesinin tedavisinde mi, yoksa over rezervi azalmış ve over sitümlasyonuna düşük yanıtı tedavi etmede mi, yoksa ince endometriyum veya tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tedavisinde mi daha etkili olduğunun ortaya çıkarılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [19]. Bu nedenler ile çalışmamızda tek başına GH uygulaması yapılması planlanarak GH'nin adjuvan etkisinin endometriyal epitel hücrelerinde değerlendirilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada tek başına GH uygulanan grup değerlendirildiğinde, endometriyal epitel hücrelerinde ifade edilen CD63 ifadesinin değişmediği gözlemlendi. Bu durum tekli GH uygulamalarının, endometriyal hücrelerine ait eksozom biyogenezinin üzerinde etkili olmadığını düşündürdü. GnTR ve GH birlikte uygulanan gruba bakıldığında ise, GH uygulamasının GnTR uygulamasının ortaya çıkardığı CD63 ifade artışını tersi yöne çevirdiği gözlemlendi. Aynı durumun üçlü kombine grupta da ortaya çıkmış olması GH'nin GnTR'ye karşı CD63 ifadesinde azaltıcı etkiye sahip olduğu fakat tek başına uygulandığında endometriyal epitel hücrelerinin hücre içi eksozomal üretimi değiştirecek bir etki yaratmadığı belirlenmiş oldu. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde GH uygulamasının dahil olduğu kombine tedavilerin endometriyal epitel hücrelerinde hücre içi değişikliklere yol açabileceği öngörüldü.

Bu çalışmada GnTR uygulaması içeren deney gruplarına bakıldığında endometriyal epitel hücrelerinde, sadece GnTR uygulanan ve letrozol ile birlikte GnTR uygulanan gruplarda ifade edilen CD63'ün arttığı gözlemlendi. Fakat üçlü kombine tedavi grubunda kontrol grubuna göre herhangi bir artış ya da azalış olmadığı belirlendi. GnTR uygulamasının tek başına ya da letrozol ile birlikte uygulandığında, endometriyal epitel hücrelerinde eksozom seviyelerini arttırdığı belirlenmiş oldu. Bunun yanı sıra; GnTR'nin, GH ve letrozol ile birlikte uygulandığı üçlü kombine tedavi grubunda kontrol

grubuna göre CD63 seviyesinde bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Eksozom düzeylerinin endometriyal epitel hücrelerinde artmasının, endometriyal reseptivite, apozisyon, adezyon ve invazyon gibi implantasyonun ilerlemesindeki önemli basamakların düzenlenmesini etkileyeceği sonucuna varıldı. İlaç uygulamaları sonrasında endometriyal epitelde eksozomların hücre içi biyogenezinin artması ile yeniden düzenlendiği ve implantasyon mekanizmaları üzerine olumlu veya olumsuz sonuçlar ortaya çıkabileceği öngörüldü. Ayrıca eksozomların regülatör proteinler ve miRNA'lar için kargo sistemleri olduğu da göz önüne alındığında, bu artışın sonucunda parakrin olarak uterus dokusundaki diğer hücreleri ve blastokisti etkileyebileceği düşünöldü. Bu çalışmada letrozol uygulaması içeren deney gruplarına bakıldığında, endometriyal epitel hücrelerinde ifade edilen CD63 ifadesinin L ve GnTR'nin birlikte uygulandığı grupta arttığı ve GnTR ve GH ile birlikte uygulanan grupta ise değişmediği gözlemlendi. Bu veriler ile sadece GnTR uygulanan grup ile L + GnTR uygulanan grup arasında bir fark ortaya çıkmaması birlikte değerlendirildiğinde, letrozol kullanımının bu hücrelerde eksozomal düzeyde bir etki yaratmadığı ortaya çıkarıldı. Endometriyal epitel, implante olan embriyo ile etkileşime giren ilk maternal yüzeydir. Birçok çalışmada hücre dışı veziküllerin implantasyon sürecine dahil olmasının yeni bir fenomen olduğu belirtilmektedir [20]. Bu çalışmalarda, çeşitli RNA tiplerini ve proteinleri içeren hücre dışı veziküllerin uterus boşluğuna salındığı ve trofoblast hücrelerine veya endometriyal epitel hücrelerine ulaşarak implantasyonu teşvik ettikleri söylenmektedir [17, 21-23]. Braundmeier ve arkadaşları, insan uterin epitel hücrelerinin, insan uterin fibroblast hücreleri tarafından metaloproteinaz üretimini uyaran ve hücre dışı matriks yeniden şekillenmesini koordine eden glikosile edilmiş transmembran proteinini ekstraselülermatrix metalloproteinaz indükleyici (EMMPRIN) içeren ekstreveziküller salgıladığını göstermişlerdir [24]. Ng ve arkadaşları, fertil hastalara ait endometriyal yüzey epitel hücrelerinde CD63 pozitif eksozomların varlığını göstermişler ve yüksek CD63 seviyesinin implantasyon ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir [21]. GnTR ve L + GnTR uygulamalarının endometriyum epitel hücrelerinde CD63 seviyesini arttırdıklarının bulunması, bu tedavi seçeneklerinin implantasyon süreçlerine eksozom üretimi artırımı üzerinden olumlu katkı sağlayabileceğini düşöndürdü. İnfertil ve sağlıklı kadınlardan elde edilen uterus örneklerinde, endometriyum yüzey epitel hücrelerinde ve glandüler epitel hücrelerin CD63 ifadesinin farklı olduğu gösterilmiştir [25]. Birçok çalışmada embriyo ve uterin mikroçevre arasındaki etkileşimlerin başarılı implantasyon ve sağlıklı gebelik için kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir [26]. Rosenbluth ve arkadaşları bazı eksozomların IVF sikluslarında insan embriyoları tarafından kültür ortamına salgılanabileceğini ve bu eksozomlardan türetilen miRNA'ların, IVF başarısını ve sonucunu tahmin etmede biyobelirteç olarak kullanılabileceğini söylemektedir [27].

miRNA çalışmalarındaki son gelişmeler, miRNA'ların endometriyumun reseptivitesinde ve desidualizasyonunda rol oynadığını göstermektedir ve eksozomal miRNA'ların embriyo-endometriyum karşılıklı iletişimde aracı olarak işlev görebileceğine dikkat çeken çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır [27].

Hem normal hem de patolojik vakalarda eksozomların oynadııkları rolün ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasının gametogeneze, fertilizasyona ve implantasyona ait mekanizmaların anlaşılması için önemli veriler ortaya çıkaracağı düşünülmektedir. Hem sağlıklı hem de infertil koşullarda endometriyum hücrelerine ait eksozomların embriyonik süreçlere katkılarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, IVF uygulamalarında yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Aynı şekilde KOH protokollerinde kullanılan farklı ilaçların endometriyum hücrelerindeki eksozomların biyogenezini değiştirip değiştirmediğinin bilinmesi de önemlidir. Özellikle bu çalışma sonucunda gonadotropinlerin kullanıldığı KOH protokollerinde eksozomal regölasyonların meydana geldiği göz önüne alındığından, bu endometriyal değişikliklerin endometriyal reseptivite, apozisyon, adezyon, invazyon ve blastokist aktivasyonu mekanizmaları üzerinden tedavi etkinliğini değiştirebileceği düşünülmektedir.

4. Sonuç

Bu çalışma ile insan endometriyal epitel CRI-1671 hücrelerinde KOH protokollerinde kullanılan ilaçların etkisinde eksozom yüzey belirteci olan CD63 proteininde meydana gelen değişimler immunositokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, gonadotropin uygulamasının endometriyal epitel hücrelerinin eksozom sekresyonunu artacak şekilde düzenlediğini ve bu artış ile hücresele trafikte artışa neden olarak, endometriyal epitel hücrelerinde otokrin ve parakrin etkilere neden olabilecek moleküllerin salınımını desteklediği düşünöldü. Tek başına büyüme hormonu uygulaması ve diğer ilaçlar ile kombine şekilde letrozol uygulamasının eksozom sekresyonunun etkilemediği görülmesi üzerine endometriyal hücre homeostazında eksozomal salınım açısından etkili olamayacağı önerilebilir. Fakat büyüme hormonunun gonadotropinler ile birlikte uygulanmasının, gonadotropinlerin yarattığı artan eksozomal sekresyonu azaltıcı etki ortaya çıkardığında görülmesi ile kombine uygulamalarda endometriyal hücresele değişikliklerin ileri analizlerinin gerekli olabileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, KOH protokollerinde kullanılan ilaçların ovaryum dokusundaki etkilerinin yanı sıra, gebeliğin devamlılığında önemli olan endometriyum hücrelerindeki eksozomların regölasyonu ile birlikte olası diğer hücresele değişikliklerin incelenmesi gerektiği vurgusu ile IVF sonrası başarılı implantasyon oranlarının değerlendirilmesinde dikkate alınması öngörülmektedir.

Referanslar

1. Walker, M.H, Tobler, K.J, Female Infertility, In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

2. Kamath, M.S, Maheshwari, A, Bhattacharya, S, Lor, K.Y, Gibreel, A, Oral medications including clomiphene citrate or aromatase inhibitors with gonadotropins for controlled ovarian stimulation in women undergoing in vitro fertilisation. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2017, 11(11), CD008528.
3. Dunne, C, Seethram, K, Roberts, J, Growth Hormone Supplementation in the Luteal Phase Before Microdose GnRH Agonist Flare Protocol for In Vitro Fertilization, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2015, 37(9), 810-815.
4. Altmäe, S, Aghajanova, L, Growth Hormone and Endometrial Receptivity, *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2019, 24, 10, 653.
5. de Castro, F, Morón, F.J, Montoro, L, Real, L.M, Ruiz, A, Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation, *Pharmacogenomics*, 2005, 6(6), 629-37.
6. Wang, X, Tsai, T, Qiao, J, Zhang, Z, Feng, H.L, Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro, *Reproduction, Fertility and Development*, 2014, 26(5), 752-7.
7. Weiss, N.S, Nahuis, M.J, Bordewijk, E, Oosterhuis, J.E, Smeenk, J.M, Hoek, A, et al., Gonadotrophins versus clomifene citrate with or without intrauterine insemination in women with normogonadotropic anovulation and clomifene failure (M-OVIN): a randomised, two-by-two factorial trial, *Lancet*, 2018, 391(10122), 758-765.
8. Cantineau, A.E, Janssen, M.J, Cohlen, B.J, Synchronised approach for intrauterine insemination in subfertile couples, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010, 14, (4):CD006942.
9. Wu, C.H, Winkel, C.A, The effect of therapy initiation day on clomiphene citrate therapy, *Fertil Steril*, 1989, 52(4), 564-8.
10. Cole, P.A, Robinson, C.H, Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, 33(11), 2933-42.
11. ACOG Committee Opinion No. 738: Aromatase Inhibitors in Gynecologic Practice, *Obstetrics & Gynecology*, 2018, 131(6), e194-e199.
12. van Dommelen, S.M, Vader, P, Lakhali, S, Kooijmans, S.A, van Solinge, W.W, Wood, M.J, et al., Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2): 635-44.
13. Lee, Y, El Andaloussi, S, Wood, M.J, Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy, *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(R1), R125-34.
14. Abels, E.R, Breakefield, X.O, Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2016, 36(3), 301-12.
15. Rana, S, Yue, S, Stadel, D, Zöller, M, Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(9), 1574-84.
16. Rosenbluth, E.M, Shelton, D.N, Wells, L.M, Sparks, A.E, Van Voorhis, B.J. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation, *Fertil Steril*, 2014, 101(5), 1493-500.
17. Tannetta, D, Dragovic, R, Alyahyaei, Z, Southcombe, J, Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy, *Cellular & Molecular Immunology*, 2014, 11(6), 548-563.
18. Machtinger, R, Laurent, L.C, Baccarelli, A.A, Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation, *Human Reproduction Update*, 2016, 22(2), 182-93.
19. Hart, R.J, Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve, *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2019, 24, 10, 500.
20. Altmäe, S, Koel, M, Vösa, U, Adler, P, Suhorutšenko, M, Laisk-Podar, T, et al., A, Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers, *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 10077.
21. Ng, Y.H, Rome, S, Jalabert, A, Forterre, A, Singh, H, Hincks, C.L, Salamonsen, L.A, Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation, *PLoS One*, 2013, 8(3), e58502.
22. Vilella, F, Moreno-Moya, J.M, Balaguer, N, Grasso, A, Herrero, M, Martínez, S, Marcilla, A, Simón, C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome, *Development*, 2015, 142(18), 3210-3221.
23. Burns, G, Brooks, K, Wildung, M, Navakanitworakul, R, Christenson, L.K, Spencer, T.E, Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus, *PLoS One*, 2014, 9(3), e9091.
24. Braundmeier, A.G, Dayger, C.A, Mehrotra, P, Belton, R.J, Nowak, R.A, EMMPRIN is secreted by human uterine epithelial cells in microvesicles and stimulates metalloproteinase production by human uterine fibroblast cells, *Reproductive Sciences*, 2012, 19, 1292-1301.
25. Uyar, Y, Özgül, M, Gökop, S, Ok, G, Tan, A, Vatansever, H.S, The correlation between unexplained infertility and exosomes, *Ginekologia Polska*, 2020, 91(5):240-246.
26. Burnett, L.A, Nowak, R.A, Exosomes mediate embryo and maternal interactions at implantation and during pregnancy, *Frontiers in bioscience (Schol Ed)*, 2016, 8, 79-96.
27. Liu, W, Niu, Z, Li, Q, Pang, R.T, Chiu, P.C, Yeung, W.S, MicroRNA and Embryo Implantation, *American Journal of Reproductive Immunology*, 2016, 75(3), 263-71.

CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıf-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

