





İNFERTİL HASTALARIN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE LIQUIRİTİGENİN'İN LÖSEMİ İNHİBİTÖR FAKTÖR RESEPTÖRÜ ÜZERİNE ETKİLERİ

THE EFFECTS OF LIQUIRITIGEN ON THE LUKEMIA INHIBITORY FACTOR RECEPTOR IN GRANULOSA CELLS OF INFERTILE PATIENTS

Emel USTA¹ , Sibel KÖKTÜRK² , Sibel DOĞAN² , Ayşe ALTUN³ , Sibel BULGURCUOĞLU-KURAN³ ,
Feride KARAHAN² 

¹ İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: E.U.0000-0002-8549-0314; S.K. 0000-0001-5636-3300; S.D. 0000-0003-4627-478X; A. A. 0000-0002-2765-5766; S.B.K. 0000-0003-4267-2158; F.K. 0000-0003-1327-9146

Atf/Citation: Usta E, Korkturk S, Dogan S, Altun A, Bulgurcuoglu-Kuran S, Karahan F. The effects of liquiritigen on the leukemia inhibitory factor receptor in granulosa cells of infertile patients. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(3):172-178. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1129686>

ÖZ

Amaç: Granüloza hücreleri oosit beslenmesi ve olgunlaşması, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi oosit-sperm etkileşimi olayları üzerine önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, granüloza hücreleri ile ilgili çalışmalar, oositin sağlıklı gelişmesi ve fertilizasyon için de önemlidir. Çalışmada ovulatuvar faktör (OF, infertil) ve erkek faktörü nedeniyle (EF, sağlıklı bireyler) in vitro fertilizasyon (IVF) ünitesine başvuran hastaların oosit-kümüllüs kompleksinden elde edilen granüloza hücrelerinde, in vitro ortamda liquiritigenin'in (LQ) etkilerinin immünotokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada OF ve EF nedeni ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi tüp bebek IVF ünitesine başvuran hastalar alındı. 5 EF ve 5 OF hastasından alınan granüloza hücreleri kültür ortamında EF, EF- Dimetil sülfoksit (DMSO), EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarına ayrıldı. Hücreler uygulama sonrası lösemi inhibitör faktör reseptör (LIFR) immünotokimyasal boyaması yapılarak Aperio ImageScope analiz programıyla boyanma şiddeti ve hücre morfolojisi bakımından incelendi.

Bulgular: OF ve OF-DMSO gruplarının granüloza hücrelerinde LIFR immünotokimya boyanma şiddeti, EF ve EF-DMSO gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır. EF-LQ ve OF-LQ gruplarının, granüloza hücrelerinde LIFR immünotokimya boyanma şiddeti bakımından diğer gruplarla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. OF ve OF-DMSO gruplarının granüloza hücrelerinde, apoptotik hücre morfolojisini yansıtan bulgular gözlenirken, EF-LQ ve OF-LQ gruplarında ise hiç veya daha az olarak gözlenmiştir.

Sonuç: LQ-gruplarının granüloza hücrelerinde LIFR immünotokimya boyanma şiddeti algoritmaları, özellikle OF ve OF-DMSO gruplarına göre yüksek saptanmış ve apoptotik hücre morfolojisi üzerine olumlu etkileri gözlenmiştir. Bu sonuçlar, LQ'nun IVF ünitelerinde alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Bu nedenle LQ'nun klinikte kullanılabilmesiyle ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: İnfertilite, Kümüllüs-granüloza hücreleri, Lösemi inhibitör faktör reseptör, Liquiritigenin

ABSTRACT

Objectives: Granulosa cells have an important role in oocyte nutrition and maturation, oocyte-sperm interaction events such as capacitation, and acrosome reaction. Therefore, studies with granulosa cells are also important for the healthy development of the oocyte and fertilization. The aim of this study was to investigate the effects of liquiritigenin (LQ) in vitro on granulosa cells that were obtained from the oocyte-cumulus complex of patients who were treated in the in vitro fertilization (IVF) unit due to ovulatory factor (OF, infertile) and male factor (MF, healthy).

Materials and Methods: This study included patients who were treated in the IVF unit of the Istanbul University Faculty of Medicine due to OF and MF. Granulosa cells obtained from 5 MF and 5 OF patients were divided into MF, MF-Dimethyl sulfoxide (DMSO), MF-LQ, OF, OF-DMSO and OF-LQ groups in culture medium. After the application, the cells were stained with the leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) immunocytochemical staining and the staining intensity was examined with the Aperio ImageScope analysis software and cell morphology.

Results: The LIFR immunocytochemistry staining intensity in the granulosa cells of the OF and OF-DMSO groups was significantly decreased when compared to the MF and MF-DMSO groups. The LIFR staining intensity in the granulosa cells of the MF-LQ and OF-LQ groups were determined to be significantly higher than the other groups. In the granulosa cells of OF and OF-DMSO groups, the findings reflected apoptotic cell morphology, but showed no or less apoptotic cell morphology in the MF-LQ and OF-LQ groups.

Conclusions: In granulosa cells of LQ-groups, LIFR immunocytochemistry staining intensity algorithms were obtained as significantly higher than in the especially the OF and OF-DMSO groups, and showed the positive effects on apoptotic cell morphology. These results suggest that LQ may be used as an alternative medium agent in IVF units. Therefore, more comprehensive studies are needed for the clinical use of LQ.

Keywords: Infertility, Cumulus-granulosa cells, Leukemia inhibitory factor receptor, Liquiritigenin

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Emel USTA E-mail: arslanemel@gmail.com

Başvuru/Submitted: 21.06.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 29.07.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 302.06.2022 • **Kabul/ Accepted:** 18.07.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 21.09.2022



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

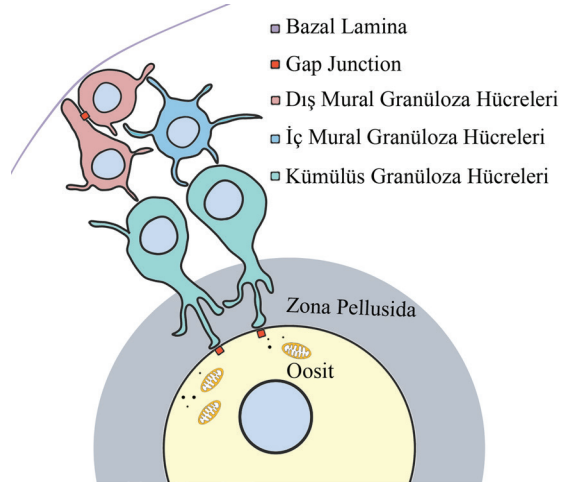
GİRİŞ

İnfertilite modern toplumlarda üreme yaş grubundaki çiftlerde yaygın olarak görülen bir problemdir (1). Dünya Sağlık Örgütü, infertiliteyi 12 ay veya daha fazla düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelik elde edilememesi durumunda ortaya çıkan üreme sistemi hastalığı olarak tanımlamaktadır (2). İnfertilite vakalarının yaklaşık % 40-50'si kadın faktörlerine bağlı olarak meydana gelmektedir (3). Gebeliğin sağlanması veya canlı doğum için kaliteli gamet, embriyo ve implantasyon için uygun maternal çevreye ihtiyaç vardır (4). Bütün bu şartların sağlanması için, farmakolojik ve cerrahi tedaviler (çoğunlukla endoskopi) ile yardımcı üreme tekniklerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak, başarı oranlarının artmasına rağmen gebelik oranları istenilen düzeylere ulaşamamıştır (5). Bu durum oositin içinde bulunduğu intrafoliküler çevrenin, fiziksel ve kimyasal koşullarını ön plana çıkarmaktadır. Oositin etrafını çevreleyen kümülüs hücreleri, oosit maturasyonuna yardım ederken, zararlı çevresel etkilerden de oositi korurlar. Son yıllarda yapılan araştırmalar oosit ve çevresindeki foliküler somatik hücreler arasındaki ilişkiye dikkat çekerek, kümülüs ve granüloza hücrelerinin, oositin reproduktif potansiyeline ve canlılığına katkıda bulunduğunu göstermektedir (6). Antral foliküldeki granüloza hücreleri buldukları bölgeye göre farklı fenotipler gösterir. Dıştan içe doğru mural, antral ve kümülüs granüloza hücreleri oositi çevrelerler ve her biri oosite ve çevredeki teka hücrelerine yakınlıklarına göre farklı özellikler gösterirler. Kümülüs granüloza hücreleri diğer granüloza hücrelerine göre daha düşük oranda LH reseptörü ve aromataz enzimi içerirken, oosit için gerekli olan metabolik desteği sağlarlar (7).

Strese bağlı artan reaktif oksijen radikalleri (ROS) 'nin, infertilite patogenezinde anahtar bir rol oynadığı tanımlanmıştır (8). Hücredeki oksijen tüketimi önemli ölçüde oksidatif fosforilasyonla gerçekleştiği için, ROS üretiminin büyük çoğunluğu normal fizyolojik koşullar altında bu yolla üretilir. Ancak, bu ürünlerin aşırı üretilmesi oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozar. Membran lipid peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu ve DNA hasarına neden olarak oosit, embriyo ve implantasyonu negatif etkiler (9). Bunun yanı sıra hücre fonksiyonlarını da bozarak hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur ve oosit maturasyonu, ovulasyon ve fertilizasyon gibi süreçlerin bozulması sonucunda infertiliteye neden olur (10). Hücre içinde üretilen ROS 'lar oldukça karmaşık ve birbirleriyle ilişkili antioksidan sistemleri tarafından kontrol edilir (11). Ayrıca diyetle alınan antioksidanlar da hücreleri oksidatif stresin neden olabileceği hasarlardan korumaktadır (12).

Hücre kültüründe kullanılan kültür medyumları oosit için çok önemlidir. Bu medyumlar bir yandan hücreler için gerekli olan substratları sağlarken bir yandan da uygun pH ve osmolarite gibi çevresel koşulların oluşmasına katkıda bulunurlar (13). Ancak hücre içi üretilen ROS 'ların yanı sıra kullanılan medyum ve tamponların da spontan olarak ROS içerdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (14-15). Bu durum bazı IVF ünitelerinde gebelik ve implantasyon oranlarının düşük olmasını açıklayabilir. Kültür medyumlarında reaktif oksijen radikallerinin üretimini kontrol eden antioksidan takviyelerin kullanımı oosit hasarını önleyerek IVF ünitelerinde daha iyi sonuçların elde edilmesini sağlayabilir.

Oositin lipid rezervleri ve çok sayıda mitokondrileri ile çok iyi bir organizasyona sahip olması, maturasyonu için gerekli olan yüksek enerji ihtiyacını karşılamasına yardımcı olur (16). Ancak bu organizasyon tek başına yeterli değildir. Oosit maturasyonu sırasında metabolik enerji ihtiyacını karşılamak için çevresindeki kümülüs hücreleri ile iyi düzenlenmiş bir işbirliği içindedir (17). Oosit ve kümülüs hücreleri arasındaki metabolik işbirliği çeşitli uzantılar, gap junctionlar ve parakrin faktörler aracılığıyla sağlanır (Şekil 1). Böylece enerji için gerekli maddelerin, yapısal komponentlerin ve iyonların olgunlaşmakta olan oosite geçişi sağlanır (18).



Şekil 1: Antral folikülde oositi çevreleyen granüloza hücrelerinin sematik bir çizimi. Kümülüs hücrelerinin zona pellusidaya doğru çeşitli uzantılar gönderdiği görülmektedir.

LIF, interlökin 6 ailesinin bir üyesidir (19). Vücutta birçok doku ve hücre tipi üzerinde çeşitli etkiler gösterebilen pleiotropik salgılanan bir sitokindir. Etkisini hücre yüzey reseptörü olan LIFR 'ye bağlanarak gösterir ve folikül gelişimi, embriyo gelişimi, blastokist implantasyon, ortodontik diş hareketi ve kanser gelişimi olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynamaktadır (20). Ayrıca LIF 'in granüloza hücrelerinin farklılaşması üzerine de etkileri olduğu gösterilmiştir. (21). Kümülüs granüloza hücrelerinin oosit ile yakın ilişkisi oositin kalitesi açısından da bilgi verebilir. Bu nedenle, granüloza hücrelerinde LIFR 'nin boyanma paterni ve yoğunluğu, folikül matürasyonu ve disfonksiyonunu daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Glycyrrhiza radix 'ten izole edilen LQ geleneksel Çin tıbbında oldukça yaygın olarak kullanılan bir flavonoiddir. Anti-inflamatuar, antioksidan, anti-alerjik, anti-tümör ve östrojenik olmak üzere birçok aktiviteye sahiptir (22-25). Son yıllarda LQ 'in ROS kaynaklı hücre hasarına karşı, antioksidan etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (26-28). Fakat granüloza hücreleri üzerindeki etkisi ile ilgili bir araştırma henüz yapılmamıştır. LQ 'nun IVF merkezlerinde, başta granüloza hücreleri ve oositin sağlıklı gelişimi ve başarılı bir implantasyon için, alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla, insandan elde edilen granüloza hücreleri üzerinde, LQ 'nun etkilerinin hücre morfolojisiyle ve LIFR immünositokimyasal boyamasıyla değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10/05/2019 tarih ve 09 sayılı toplantısında kabul edilmiştir. Çalışmada 18-35 yaş arası OF ve erkek faktörü EF nedeni ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi tüp bebek ünitesi infertilite kliniğine başvuran hastalar yazılı onamları alınarak dahil edildi. 5 EF ve 5 OF olmak üzere toplam 10 hastadan alınan oositlerden elde edilen kümülüs-granüloza hücreleri incelenmek üzere deneyde kullanıldı.

Ovaryan stimülasyon ve oosit toplanması

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonist ve antagonistleri ile yapılan ovaryan stimülasyonu sonrası 18 mm'ye ulaşan en az iki adet folikül oluştuğunda oosit maturasyonu için recombinant insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulandı. Takip eden 36. saatte sedasyon anestezisi altında yumurta toplama (OPU) işlemi yapıldı. Elde edilen kümülüs-oosit komplekslerine birbirinden ayrılmaları için denüasyon işlemi uygulandı. Elde edilen kümülüs hücreleri % 10 fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), % 1 penisilin ve streptomisin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) eklenmiş DMEM/F12 medyumuna (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) alındı.

Hücre kültürü

Alınan kümülüs-granüloza hücreleri, falcon tüpte 2000 RPM devirde 10 dakika santrifüj edildi. Ardından tüpün üstünde kalan süpernatant uzaklaştırılarak pellete 1 ml medyum eklendi. Pellet pipetaj ile homojenize edildikten sonra 6'lık kültür kuyucuklarına ekilerek primer hücre kültürü meydana getirildi ve 37 °C nemli atmosfere sahip %5 CO2 varlığındaki inkübatör içinde büyütüldü. EF ve OF grubu hastalardan alınan ve kültüre edilen hücreler toplamda 6 gruba ayrıldı. 24 saat sonra EF grubundaki hücrelere medyum eklenirken EF-DMSO grubundaki hücrelere 16 µL DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) ve EF-LQ grubundaki hücrelere 40 µM LQ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) eklendi. 24 saat sonra OF grubundaki hücrelere medyum eklenirken OF-DMSO grubundaki hücrelere 16 µL DMSO ve OF-LQ grubundaki hücrelere 40 µM LQ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) eklendi. Hücreler 48. saatte 0.25 %'lik tripsin enzimi (Sigma-Aldrich) ile kaldırıldı. Hücreler 2000 RPM devirde 10 dakika santrifüj edilmesinin ardından tüpün üstünde kalan süpernatant uzaklaştırıldı. PBS ile yıkandıktan sonra tekrar 2000 RPM devirde 10 dakika santrifüj edildi. Ardından % 0,1'lik tripan mavisi ile eşit miktarda hücre solüsyonu karıştırılarak sayma kamerasında sayıldı ve canlı-ölü hücre oranları belirlendi.

İmmünohistokimyasal boyama

24 kuyucuklu kültür kapları içerisine yerleştirilen yuvarlak lamellerde üretilen hücreler LIFR antikoruna (C:19, sc-659, tavşan poliklonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ve immünohistokimya kiti (ScyTek, UltraTek AGL125) kullanılarak boyandı. Lameller sırasıyla PBS ve % 0,5 triton X-100 solüsyonlarında oda ısısında muamele edildi. PBS ile yıkamadan bloklayıcı solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra lameller primer antikoruna (1/100 dilüsyon) yerleştirilerek bir gece + 4 °C'de bekletildi. Ertesi gün PBS ile yıkama yapılarak, biotinli antipolivalent sekonder antikor solüsyonunda 25 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra, PBS ile yıkama yapılarak streptavidin peroksidad solüsyonunda 25 dakika oda ısısında bekletildi. Lameller PBS

yıkandıktan sonra, AEC kromojeni ile muamele edildikten sonra Mayer'in hematoksileni zıt boyama yapıldı. Daha sonra, lameller su bazlı kapatıcı ile kapatılarak, ışık mikroskopunda (Olympus BX61 mikroskop bağlantılı DP72 Olympus kamera sisteminde) fotoğraflandı ve incelendi.

Aperio ImageScope görüntü analiz programıyla kesitlere renk dekonvolüsyon işlemi uygulandı. Renk dekonvolüsyon işlemi sonrasında elde edilen algoritmalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Her grupta yer alan boyamalardan (n=5) x 20 büyütmede elde edilen 3 ayrı görüntüye renk dekonvolüsyon işlemi uygulandı (29). Renk dekonvolüsyon işlemi sonrasında elde edilen algoritmalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

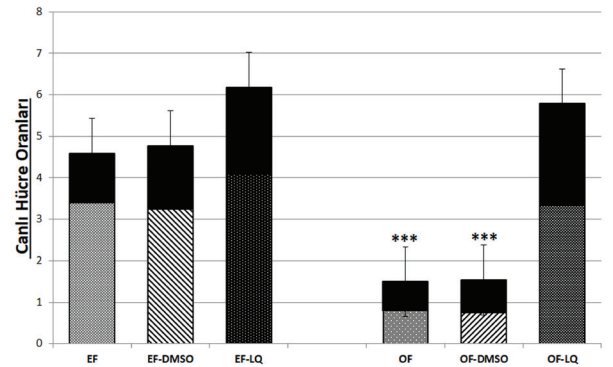
İstatistik

İstatistik analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post-hoc Tukey testleri kullanılarak değerlendirildi. İstatistik analizler sırasında güven aralığı p < 0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

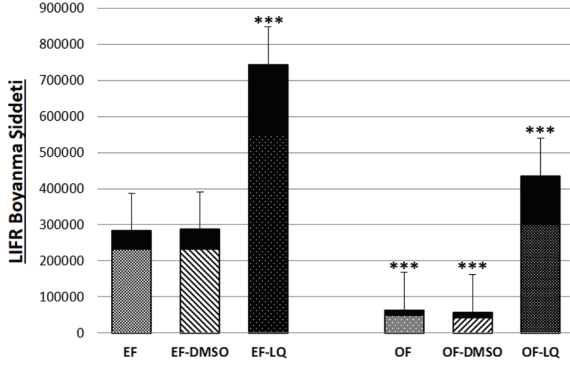
EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının, *tripan mavisi boyamasıyla* canlı hücre sayımları istatistiksel olarak analiz edildi. EF ile EF-DMSO ve EF-LQ grupları arasında canlı hücre sayımları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p= 0,9997, p= 0,7282, Tablo 1). OF ve OF-DMSO grupları ile EF, EF-DMSO ve EF-LQ grupları arasında canlı hücre sayımları arasındaki fark anlamlıydı (p<0.001, Tablo 1). OF-LQ grubu ile OF ve OF-DMSO grupları arasındaki fark anlamlı (p<0.001, Tablo 1), EF, EF-DMSO ve EF-LQ grupları arasındaki fark ise anlamlı bulunmadı (p=1, p=1 ve p= 0,6664, Tablo 1).

Tablo 1: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının canlı hücre sayımlarını gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar *** işareti ile belirtilmiştir (p < 0,001).



Aperio ImageScope görüntü analiz programı ile LIFR antikoruna boyanma şiddetine bakıldığında EF ile EF-DMSO grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p= 1 ve Tablo 2). EF ve EF-DMSO grupları arasında AEC kromojeniyle kırmızı renkte işaretlenen LIFR immünohistokimya boyanmasında bir fark gözlenmedi (Şekil 2A ve 2B). EF ile EF-LQ grubu arasındaki LIFR antikoruna boyanma şiddetine bakıldığında aralarındaki fark anlamlı bulundu (p<0.001, Tablo 2).

Tablo 2: EF, EF-DMSO, EF-LQ, OF, OF-DMSO ve OF-LQ gruplarının, Apero ImageScope görüntü analiz programı kullanılarak, LIFR immünotokimyasal boyanma şiddetini gösteren tablo. EF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren gruplar *** işareti ile belirtilmiştir ($p < 0,001$).



EF-LQ grubunun LIFR immünotokimya boyanma şiddetinin EF grubuna göre daha koyu ve yoğun bir boyanma göstererek arttığı gözlemlendi (Şekil 2C). İmmünotokimyasal olarak OF grubu ile OF-DMSO grubu arasında LIFR antikor boyanma şiddetine bakıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 1$, Tablo 2). OF ve OF-DMSO gruplarının boyanma şiddeti EF grubuna göre daha soluktu (Şekil 2D ve 2E). OF grubu ile OF-LQ grubu arasındaki fark ise anlamlı bulundu ($p < 0,001$, Tablo 2). EF grubu ile OF grubunun LIFR antikor boyanma şiddetine bakıldığında, aralarındaki fark anlamlıdır ($p < 0,001$, Tablo 2), OF-LQ grubu ile aralarındaki fark anlamlı değildir ($p = 0,4047$, Tablo 2). OF-LQ grubunun LIFR immünotokimya boyanması, OF ve OF-DMSO gruplarına göre daha koyu ve yoğun bir boyanma gösterdi (Şekil 2F).

LIFR immünotokimya ve hematoksilen zıt boyamasıyla ışık mikroskopunda, kümülüs granüloza hücrelerinin morfolojik değişiklikleri incelendi. OF ve OF-DMSO gruplarında dejenerasyon morfolojisi gösteren granüloza hücreleri, piknotik nükleusa ve LIFR immünotokimya boyamasıyla daha soluk boyanmış bir sitoplazmaya ve nükleusa sahipti. Sitoplazmasında apoptozisin belirtilerinden biri olan apoptotik cisimler ve çeşitli büyüklük ve miktarda vakuoller içeren granüloza hücreleri saptandı (Şekil 2A ve B).

EF ve EF-DMSO grubuna ait granüloza hücreleri, genelde oval veya yuvarlak biçimli LIFR immünotokimya boyamasıyla pozitif boyanmış bir sitoplazmaya ve nükleusa sahipti. EF ve EF-DMSO gruplarına ait fuziform, triangular veya iğ şekilli granüloza hücrelerinin, sıkı kümeler oluşturduğu gözlemlendi. OF ve OF-DMSO gruplarına göre daha az miktarda apoptotik cisim ve vakuol içerdikleri gözlemlendi (Şekil 2D ve E).

EF-LQ grubu ve OF-LQ granüloza hücrelerinin, diğer gruplarına göre apoptotik cisimcik ve vakuol içeren hücre sayısının daha az, vakuol boyutlarının da daha küçük ve az sayıda olduğu görüldü (Şekil 2C ve F).

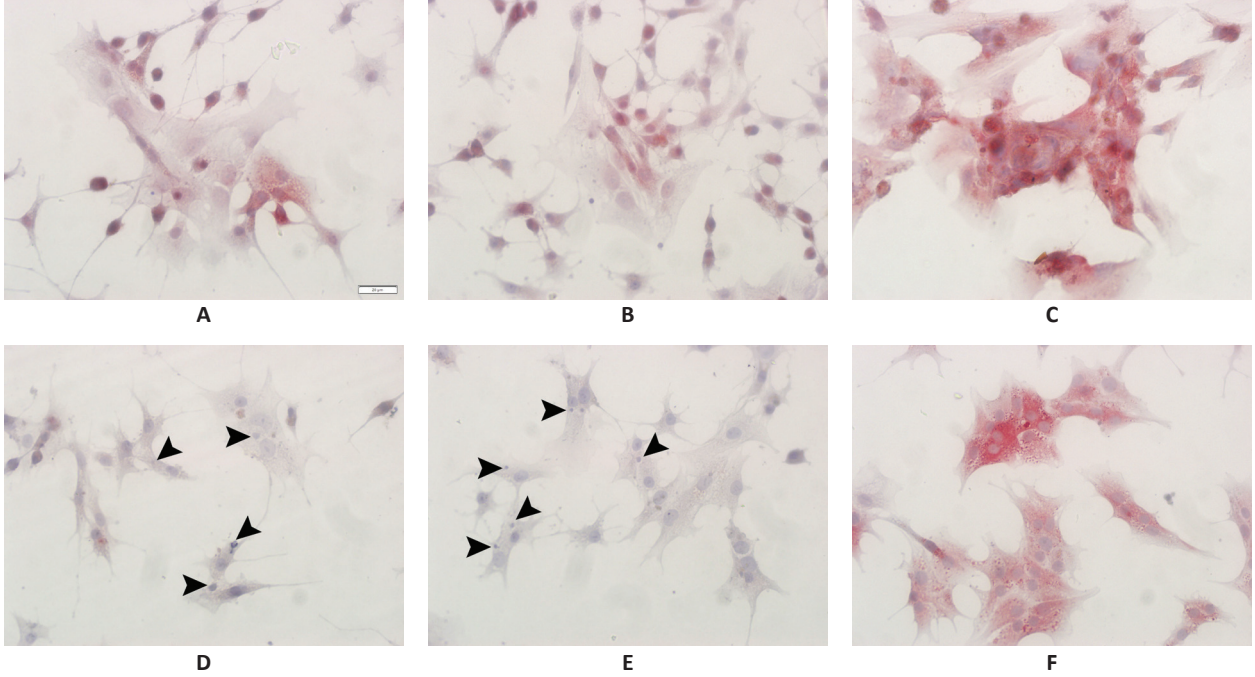
TARTIŞMA

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, artan ROS'un üreme potansiyelini olumsuz yönde etkilediğini ve granüloza hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir (30-31). Granüloza hücre ölümü foliküler oositleri besleyici maddelerden, büyüme ve sağ kalım faktörlerinden ayırır ve östradiol biyosentezini azaltır (32-33). Bütün bunlara bağlı olarak ovaryen bozukluklar ve infertilite ortaya çıkar. Antioksidanların, diğer moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatabildiği veya önleyebildiği ve hücre hasara neden olabilecek serbest radikallerin üretimini azaltma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir (30-34).

Oosit ve kümülüs hücrelerinin metabolik işbirliği oosit gelişiminde ve kalitesinde kritik bir rol oynar. Son on yılda, kümülüs ve oosit kompleksinin metabolizmasının anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Boldura ve ark. domuz oositlerinin kültür olgunlaşma ortamında antioksidan takviyesinin apoptotik ve döllenme sırasında germ hücrelerinin stabilitesini sağlayan genlerin ekspresyonu üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Rosmarinik asit ve askorbik asit ile desteklenmiş ortamda yetiştirilen domuz oosit ve kümülüs hücre kompleksi üzerinde antioksidan takviyesinin faydalı etkiler gösterdiğini bulmuşlardır (35). Saini ve ark. da keçi embriyolarında eksternal folik asit takviyesinin oosit ve kümülüs hücre olgunlaşmasını, blastosist gelişimini ve folat taşıyıcılarının ekspresyonu arttırdığını ve ROS üretimini azalttığını göstermişlerdir (34). Çeşitli çalışmalarda da melatonin'in embriyo üretimini desteklemek için olgunlaşma ortamına verilen oosit üzerindeki etkisini çalışmışlardır. Çalışmalarda melatonin'in in vitro maturasyon ortamını desteklediğini ve kümülüs hücre gen ekspresyonunu etkilediğini ve partenogenetik blastokistlerin gelişimini azalttığını göstermişlerdir (36-37). Qian ve arkadaşları, kümülüs hücre-oosit komplekslerinde, aşırı ROS üretiminin neden olduğu zararlı etkilerden kaçınmak için antioksidan enzim ailesine ait olan peroksiredoksin 4 (Prdx4)'ü eksprese eden bir adenovirüs ile enfeksiyonu sonrası H_2O_2 'nin neden olduğu değişikliklerin önemli ölçüde ortadan kalktığını göstermişlerdir (38).

Çalışmada antioksidan aktivitesi ile ROS kaynaklı apoptozis ve hücre hasarına karşı embriyo, hepatosit, nöron ve osteoblastik hücreler üzerinde sitoprotektif etkileri olduğu gösterilen LQ flavonoidini kullandık (26, 39-41). LQ, anti-hiperlipidemik, anti-enflamatuar, anti-alerjik ve östrojenik etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik özelliklere sahiptir. LQ'in, antioksidan aktivitesi ile ROS kaynaklı hücre hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (42). Bu yüzden çalışmada infertil hastalardan elde edilen granüloza hücrelerinin kültür ortamında LQ flavonoidini kullandık. OF-LQ ve EF-LQ gruplarındaki hastaların granüloza hücrelerinde LQ flavonoidinin kullanılması, hem OF ve OF-DMSO hem de EF ve EF-DMSO gruplarındaki apoptotik morfoloji gösteren hücrelerde azalma gösterdi.

LIF, başarılı bir implantasyon için gerekli olan önemli bir sitokindir ve etki gösterebilmek için LIF-R ile bağlanmaktadır. Abir ve ark. 'ların yaptığı çalışmada, insan foliküllerinde granüloza hücrelerinde LIF ve LIFR ekspresyonlarının folikül gelişiminde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (19). Nilsson ve ark. LIF



Şekil 2: LIFR immünohistokimya boyanma şiddeti bakımından gruplara ait granüloza hücrelerinde ışık mikroskobu fotoğrafları görülmektedir. **A:** EF grubu ve **B:** EF-DMSO grupları arasında LIFR immünohistokimya boyanma şiddeti bakımından bir fark gözlenmedi. **C:** EF-LQ grubunun LIFR immünohistokimya boyanma şiddetinin **A:** EF grubuna göre arttığı gözlenirken, **D:** OF ve **E:** OF-DMSO gruplarının boyanma şiddeti daha soluktu. **F:** OF-LQ grubunun LIFR immünohistokimya boyanması ise **D:** OF ve **E:** OF-DMSO gruplarına göre daha koyu bir boyanma gösterdi. **D:** OF ve **E:** OF-DMSO gruplarında artış gösteren apoptotik cisimcikler okbaşları ile gösterilmiştir. Bar 20 µm. Oklar ile gösterilmiştir.

ve LIFR 'nin sıçan ovaryumunda folikül gelişimi üzerine etki gösterdiğini saptamışlar (43). Çeşitli çalışmalarda in vitroda embriyo üretiminde kümülüs hücrelerinin, parakrin ve/veya otokrin tarzda hareket eden zengin bir LIF-LIFR sistemi kaynağı olduğunu ve sağlıklı blastokist gelişiminde görev aldıkları gösterilmiştir (44-45). Çalışmada EF-LQ ve OF-LQ gruplarının, granüloza hücrelerinde LIFR immünohistokimya boyanma şiddeti diğer gruplarla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır.

Kaliteli oositin kullanılması IVF sonuçlarını olumlu yönde etkilemektedir. Ancak sağlıklı oositlerin seçimi ve başarılı bir implantasyon hala önemli bir sorun oluşturmaktadır. Kümülüs-granüloza hücreleri oosit için gerekli olan besinlerin ve sinyal moleküllerinin üretilmesini sağlarlar (46). Bu sebeple kümülüs-granüloza hücrelerinin oositin ve mikro çevrenin iyileştirilmesi amacıyla kullanılması indirekt olarak IVF sonuçlarına katkı sağlayabilir. Bu çalışmada LQ 'nun ovulatuvar faktörlü infertil hastaların kümülüs-granüloza hücreleri üzerinde hem LIFR sentezini artırması hem de apoptotik hücre morfolojisi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Ön çalışma niteliğinde olan bu çalışmanın sonuçlarına göre, LQ 'nun IVF merkezlerinde başarılı implantasyon sonuçları için alternatif bir medyum ajanı olarak kullanılabileceğinden dolayı, daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul

Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 10.05.2019, No: 2019/655).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- E.U., S.K.; Veri Toplama- E.U., S.K., A.A., S.B.K.; Veri Analizi/Yorumlama- E.U., S.K.; Yazı Taslağı- E.U., S.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.U., S.K.; Son Onay ve Sorumluluk- E.U., S.K.; Malzeme ve Teknik Destek- E.U., S.K., S.D., A.A., S.B.K., F.K.; Süpervizyon S.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma için ÖYP bütçesinden destek alınmıştır (Proje numarası: 393.2019-DR-35/27-01).

Ethics Committee Approval: This study was approved by Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 10.05.2019, No: 2019/655).

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.U., S.K.; Data Acquisition- E.U., S.K., A.A., S.B.K.; Data Analysis/Interpretation- E.U., S.K.; Drafting Manuscript- E.U., S.K.; Critical Revision of Manuscript- E.U., S.K.; Final Approval and Accountability- E.U., S.K.; Material and Technical Support- E.U., S.K., S.D., A.A., S.B.K., F.K.; Supervision- S.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by the OYP (Project number: 393.2019-DR-35/27-0).

KAYNAKLAR

1. Nikolakopoulou K, Turco MY. Investigation of infertility using endometrial organoids. *Reproduction* 2021;161(5):R113-27.
2. Lee JW, Hyun MK, Kim HJ, Kim DI. Acupuncture and herbal medicine for female infertility: An overview of systematic reviews. *Integr Med Res* 2021;10(3):100694.
3. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Jordan V, Hart RJ. Antioxidants for female subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;7(7):CD007807.
4. Sreerangaraja Urs DB, Wu WH, Komrskova K, Postlerova P, Lin YF, Tzeng CR, et al. Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility. *Int J Mol Sci* 2020;21(10):3592.
5. Szamatowicz M. Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations. *Ginekol Pol* 2016;87(12):820-3.
6. Wyndham N, Marin Figueira PG, Patrizio P. A persistent misperception: Assisted reproductive technology can reverse the "aged biological clock". *Fertil Steril* 2012;97(5):1044-7.
7. Strauss III JF, Modi B, McAllister JM. Defects in ovarian steroid hormone biosynthesis. *Cellular Endocrinology in Health and Disease* 2014;285-309.
8. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10(1):49.
9. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update* 2008;14(4):345-57.
10. Wang S, He G, Chen M, Zuo T, Xu W, Liu X. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:4371714.
11. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(10):1634-50.
12. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987;1(6):441-5.
13. Bouraki G, Metallinou C, Simopoulou M, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Comparison of nine media in the culture of human ovarian granulosa lutein cells. *In Vivo* 2012;26(5):823-5.
14. Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radic Biol Med* 2001;30(12):1418-25.
15. Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17(5):652-61.
16. De Andrade Melo-Sterza F, Poehland R. Lipid metabolism in bovine oocytes and early embryos under in vivo, in vitro, and stress conditions. *Int J Mol Sci* 2021;22(7):3421.
17. Lewis N, Hinrichs K, Leese HJ, Mc GAC, Brison DR, Sturme R. Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. *Sci Rep* 2020;10(1):3493.
18. Fontana J, Martínková S, Petr J, Žalmanová T, Trnka J. Metabolic cooperation in the ovarian follicle. *Physiol Res* 2020;69(1):33-48.
19. Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Freimann S, Van den Hurk R, et al. Immunocytochemical detection and RT-PCR expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Mol Hum Reprod* 2004;10(5):313-9.
20. Li Y, Sun L, Zhao D, Ouyang J, Xiang M. Aberrant expression of leukemia inhibitory factor receptor (lifr) and leukemia inhibitory factor (lif) is associated with tubal pregnancy occurrence. *Turk J Med Sci* 2015;45(1):214-20.
21. Cadoret V, Jarrier-Gaillard P, Papillier P, Monniaux D, Guérif F, Dalbies-Tran R. Leukaemia inhibitory factor modulates the differentiation of granulosa cells during sheep in vitro preantral to antral follicle development and improves oocyte meiotic competence. *Mol Hum Reprod* 2021;27(9):gaab051.
22. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of nf-kappab-dependent inos and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol* 2008;154(1):165-73.
23. Shin YW, Bae EA, Lee B, Lee SH, Kim JA, Kim YS, Kim DH, et al. In vitro and in vivo anti-allergic effects of glycyrrhiza glabra and its components. *Planta Med* 2007;73(3):257-61.
24. Park SM, Ki SH, Han NR, Cho IJ, Ku SW, Kim SW, et al. Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through gsk3-beta inhibition. *Biol Pharm Bull* 2015;38(2):184-92.
25. Zhang SP, Zhou YJ, Liu Y, Cai YQ. Effect of liquiritigenin, a flavanone existed from radix glycyrrhizae on pro-apoptotic in smmc-7721 cells. *Food Chem Toxicol* 2009;47(4):693-701.
26. Huang CH, Wang FT, Chan WH. Prevention of ochratoxin a-induced oxidative stress-mediated apoptotic processes and impairment of embryonic development in mouse blastocysts by liquiritigenin. *Environ Toxicol* 2019;34(5):573-84.
27. Jung EH, Lee JH, Kim SC, Kim YW. Ampk activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid x receptor. *Eur J Nutr* 2017;56(2):635-47.
28. Huang CH, Chan WH. Protective effects of liquiritigenin against citrinin-triggered, oxidative-stress-mediated apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2538.
29. Köktürk S, Ceylan S, Etus V, Yasa N, Ceylan S. Morinda citrifolia l. (noni) and memantine attenuate periventricular tissue injury of the fourth ventricle in hydrocephalic rabbits. *Neural Regen Res* 2013;8(9):773-82.
30. Almubarak AM, Kim E, Yu IJ, Jeon Y. Supplementation with niacin during in vitro maturation improves the quality of porcine embryos. *Theriogenology* 2021;169:36-46.
31. Choi H, Lee J, Yoon JD, Hwang SU, Cai L, Kim M, et al. The effect of copper supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation. *Theriogenology* 2021;164:84-92.
32. Tripathi A, Shrivastav TG, Chaube SK. An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (azadirachta indica) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *Int J Appl Basic Med Res* 2013;3(1):27-36.
33. Gallegos E, Ascona M, Monroy J, Castro-Manrreza ME, Aragón-

- Martínez A, Ayala ME. P-chloroamphetamine decreases serotonin and induces apoptosis in granulosa cells and follicular atresia in prepubertal female rats. *Reprod Toxicol* 2022;110:150-60.
34. Saini S, Sharma V, Ansari S, Kumar A, Thakur A, Malik H, Kumar S, et al. Folate supplementation during oocyte maturation positively impacts the folate-methionine metabolism in pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2022;182(4):63-70.
35. Boldura OM, Marc S, Otava G, Hutu I, Balta C, Tulcan C, et al. Utilization of rosmarinic and ascorbic acids for maturation culture media in order to increase sow oocyte quality prior to ivf. *Molecules* 2021;26(23):7215.
36. Cordova A, Miranda MS, King WA, Mastromonaco GF. Effects of EGF and melatonin on gene expression of cumulus cells and further in vitro embryo development in bovines. *Zygote* 2022;1-11. doi: 10.1017/S0967199421000940.
37. Sánchez-Ajofrín I, Martín-Maestro A, Medina-Chávez DA, Laborda-Gomariz JA, Peris-Frau P, Garde JJ, et al. Melatonin rescues the development and quality of oocytes and cumulus cells after prolonged ovary preservation: An ovine in vitro model. *Theriogenology* 2022;186:1-11.
38. Qian Y, Zou X, Liang X, Lu N, Cui Y, Liu J, et al. Peroxiredoxin 4, a new favorable regulator, can protect oocytes against oxidative stress damage during in vitro maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;601:52-8.
39. Zhang M, Xue Y, Zheng B, Li L, Chu X, Zhao Y, et al. Liquiritigenin protects against arsenic trioxide-induced liver injury by inhibiting oxidative stress and enhancing mtor-mediated autophagy. *Biomed Pharmacother* 2021;143:112167.
40. Yuan X, Wang Z, Zhang L, Sui R, Khan S. Exploring the inhibitory effects of liquiritigenin against tau fibrillation and related neurotoxicity as a model of preventive care in alzheimer's disease. *Int J Biol Macromol* 2021;183:1184-90.
41. Choi EM. Liquiritigenin isolated from glycyrrhiza uralensis stimulates osteoblast function in osteoblastic mc3t3-e1 cells. *Int Immunopharmacol* 2012;12(1):139-43.
42. Shi C, Wu H, Xu K, Cai T, Qin K, Wu L, et al. Liquiritigenin-loaded submicron emulsion protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activity. *Int J Nanomedicine* 2020;15:1101-15.
43. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (lif) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002;188(1-2):65-73.
44. Eckert J, Niemann H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (lif) and its receptor subunits glycoprotein 130 and lif-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol Hum Reprod* 1998;4(10):957-65.
45. Eswari S, Sai Kumar G, Sharma GT. Expression of mRNA encoding leukaemia inhibitory factor (lif) and its receptor (lif β) in buffalo preimplantation embryos produced in vitro: Markers of successful embryo implantation. *Zygote* 2013;21(2):203-13.
46. Taghizabet N, Khalili MA, Anbari F, Rahimi AA, Nottola SA, Macchiarelli G, et al. Human cumulus cell sensitivity to vitrification, an ultrastructural study. *Zygote* 2018;26(3):224-31.