

Oosit potansiyelini göstermede folikuler sıvıda biyomarker olarak decorin in klinik kullanımı

Abstrakt bu çalışma decorin in matur folikuler sıvıda konsantrasyonunun ve granuloza hücrelerinde varlığını araştırmaktadır. Aynı zamanda bu çalışma DCN nin yardımcı üreme tekniklerinin sonuçları üzerine yararlı bir biyomarker olup olmadığını da araştırmaktadır. Nedeni bilinmeyen infertilite sebebi ile yardımcı üreme tekniği uygulanmış 88 hastanın 130 oositini içeren bir retrospektif kohort çalışma yapılmış. Folikuler sıvıdaki DCN konsantrasyonu (f-DCN) 39.26 ng/ml dir ve bu değer serumdan yüksektir. ICSI tekniğinde intrasiyoplazmik sperm ile fertilize olmuş oositlerdeki F-DCN düzeyi, fertilize olmamış oositlere göre düşüktür (33.24 ng/ml – 40.18 ng/ml ) 34.5 ng/ml cut-off değer olarak belirlendiğinde, F-DCN düzeyi cut-off değerinin altında olan oositlerin fertilizasyon hızı; F-DCN düzeyi cut-off değerinin üzerinde olan oositlerin fertilizasyon hızıyla kıyaslandığında daha iyi bulunmuştur. DCN granuloza hücrelerinden salgılanmadığı düşünülmektedir çünkü immun boyama ve western blot tekniği ile granuloza hücrelerinde analiz edilmemiştir. F-DCN muhtemelen folikulden toplanan oositin kalitesini gösteren bir biyomarkerdir.

## Giriş

Preovulatuvar folikül sıvısında sitokinler ve hormonlar gibi çok çeşitli biyoaktif maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler folikülün gelişimi ve maturitesi ile ilişkilidir. Üreme ve fertilite tedavilerinde oosit gelişimi ve maturitesi önemli basamaklardır. Tedavi sonuçlarının ilgili biyoaktif maddelerin analizleri ile iyileştirilebileceği düşünülmektedir. Bu biyoaktif maddelere örnek olarak granulosit stimule faktör (G-CSF) ve makrofaj inflamatuvar protein MIP- 3 $\alpha$  verilebilir. Folikuler sıvıdaki G-CSF konsantrasyonunun fertilize oosit sayısı ile körele olduğu bildirilmiştir. Böylece bu ilişkili olduğu oositin kalitesini gösteren yararlı bir biyomarker olabilir. Bir diğer yandan matur oositte immatur oosite kıyasla MIP- 3 $\alpha$  konsantrasyonu daha fazla olduğundan, folikuler sıvıdaki MIP- 3 $\alpha$  konsantrasyonunun oosit maturitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

DCN lösin zengin proteoglikan ailesine ait olan ve kemik, tendon, deri, aorta ve kornea gibi bazı organlarda bulunan diğer bir biyoaktif maddedir. DCN nin ekstraselüler matriksi konrakte ederek ve kolagen tip 1 ile tip 2 fiberleri kombine ederek kolagen doku oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Ek olarak EGFR veya IGF-1R ile kombine olarak hücre proliferasyonunu düzenler. Endotel ve renal hücreler gibi normal hücrelerde DCN EGFR ye bağlanarak EGFR yi inaktive eder ve böylece hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ancak IGF-1R e bağlanarak protein sentezini aktive eder ve PI3-K/protein kinaz B yolu üzerinden apoptozisi kontrol eder. DCN ayrıca onkogenik tirozin kinaz reseptörünü antagonize ederek tumor büyümesini durdurur ve angiogenezi dizginler. Ek olarak DCN fetüs ve anne arasındaki alanda trofoblast göçü, invazyonu ve uterin angiogenez üzerinde rol oynar. Böylece DCN nin kötü arterial yapılanmaya neden olarak preeklampsi gelişiminde rolü olabilir. Ayrıca fare beyni endotel hücrelerinde ektopik olarak DCN nin fazla ekspresyonu vasküler endotel growth faktör A yı upregüle ederek angiogenezi indüklediği gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda DCN nin overde bağ dokusunda, folikuler teka kompartmanında, ovulatuvar foliküllerin folikül sıvısında ve korpus luteum da bulunduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde DCN bulunmamaktadır. Buna rağmen DCN nin tam olarak nerden salgılandığı net değildir.

Bütün bu fonksiyonlarının yanında DCN nin büyüme faktörlerini düzenleyerek folikül büyümesi, ovulasyon, ve korpus luteumun persistansı gibi önemli aşamalarda rol aldığı gösterilmiştir fakat detaylı fonksiyonu bilinmemektedir. DCN ile infertilite tedavileri sonuçları arasındaki ilişki henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada folikuler sıvıdaki DCN konsantrasyonu (F-DCN) ve serumdaki konsantrasyonu (S-DCN) ,DCN nin granuloza hücrelerindeki lokalizasyonu ve bunların yardımcı üreme teknikleri sonuçları arasındaki ilişkiye bakılacaktır. Böylece DCN nin ART için kullanışlı bir biyomarker olup olmadığı araştırılacaktır.

## **Material ve metod**

### **1.hastalar**

Nisan 2010 ve mart 2016 yılları arasında Nagoya City University Hospital da nedeni bilinmeyen infertilite sebebi ile yardımcı üreme tekniği uygulanmış 88 hastayı içeren bir retrospektif kohort çalışmasıdır.

Hastalardan folikuler sıvı ,serum ve granuloza hücreleri toplandı. F-DCN, S-DCN ve folikuler sıvıda IGF-konsantrasyonu araştırıldı. F-DCN, hasta yaşı ,OPU yapılan folikülün etrafındaki klan akımının pulsatilite indeksi ,S-DCN, folikuler sıvıdaki IGF-1 konsantrasyonu,fertilizasyon ve embriyo kalitesi arasındaki ilişkiye bakıldı. Granuloza hücrelerinde DCN nin yerleşimi ve varlığı aydınlatılmaya çalışıldı.

Bu çalışma Nagoya City Hospital araştırma etik komitesinden izin alınarak yapıldı. Her hastadan yazılı onam alındı.

### **2.over stimülasyonu**

GnRH agonisti ile uzun protokol, GnRH agonisti ile kısa protokol, GnRH antagonist protokol ve klomifen sitrat protokol kullanılarak kontrolü ovarian stimülasyon uygulandı. Protokol seçimi hastanın yaşı ve AMH a bakılarak tahmini over rezervine göre yapıldı. Bütün protokollerin detayı burada anlatıldı.

#### **2.1 GnRH agonisti ile uzun protokol**

Bir önceki siklusun mid luteal fazından başlanılarak buseralin asetat içeren nazal sprey kullanılarak hipofiz bezinin down regülasyonu sağlanır. Menstruel siklusun erken fazında serum estradiol seviyesi 30pg/ml in altına düştüğünde im gonadotropin enjeksiyonu yapılır.

## 2.2 GnRH agonisti ile kısa protokol

Menstruel siklusun erken fazında buseralin asetat içeren nazal sprey uygulanır ve iki gün sonrasında im gonadotropin enjeksiyonua başlanır.

## 2.3 GnRH antagonist protokol

Menstruel siklusun 3. Ve 5 günleri arası im gonadotropin enjeksiyonu başlar ve dominant folikül tv usg ölçümü ile 16-18 mm boyutuna ulaşana kadar 0.25 mg subkutan cetrotide enjeksiyonu uygulanır.

## 2.4 CC protokol

Menstruel siklusun 5. Gününde 100-150 mg/gün CC oral olarak başlanır. Dominant folikül 10-12 mm e ulaştığında im gonadotropin enjeksiyonu başlanır.

## 3. OPU, fertilizasyon ve embriyo değerlendirilmesi

Bütün protokollerde dominant folikül tv usg ile ölçümde 20 mm e ulaştığında im 10.000 IU HCG enjeksiyonu ile ovulasyon indüklenir.36 saat sonra tv usg ile foliküllerin etrafındaki kan akımının pulsatilite indeksi hesaplandıktan sonra tv usg eşliğinde OPU uygulanır. İlk folikülden toplanılan oositler ulaşılabilirliğe göre seçilir. IVF uygulanır ancak daha önceki IVF denemsi başarısız ise ICSI uygulanır.Veeck kalsifikasyonuna göre embriyolar 2 gün sonra değerlendirilir. Grade 1 ve 2 embriyolar kaliteli ancak diğerleri kötü embriyolar olarak değerlendirilir.

## 4.örnekler (serum. Folikuler sıvı, GC)

OPU yapılacağı gün serum ve foikuler sıvı örnekleri toplanır. Kan örneği hemen OPU öncesinde alınır ve 5 dk santrifüj edildikten sonra ayrılır ve serum kısmı toplanır.OPU sırasında kan ile kontaminasyonu önlemek için her overden ilk yırtılan folikülden folikuler sıvı aspire edilir ve toplanır. Bu örneklerde 5 dk süre ile santrifüj edildikten sonra folikuler sıvı (süpernatant) ve hücresel komponent(presipitat) olarak ayrılır. Serum ve folikuler sıvı -20 derecede analiz edilene dek saklanır.

Bazı folikuler sıvı örnekleri +4 derecede 30 dakika bekletildiğinde Ficoll-Pague denilen bir tabaka ile kaplanır. Bu tabaka immunohistokimya SDC-PAGE ve western blot analizlerinde kullanılmak üzere GC olarak saklanır.

## 5.enzim bağlı immunosorbent assay

Enzim immunoassay kitleri serum ve folikuler sıvıdaki DCN konsantrasyonunu ve folikuler sıvıdaki IGF-1 konsantrasyonunu ölçmek için kullanılır. Bütün ölçümler iki kez tekrarlanır. Çok az veya çok fazla konsantrasyonlar saptanırsa optimum dilusyon için ölçümler tekrarlanır.

## **6.immuun boyama**

### **6.1 immunositokimya**

İmmunositokimya GC lerde DCN lokalizasyonu tayini için üç GC örneği üzerinde çalışılır. GC örnekleri mildholm ile fiksasyon uygulandıktan sonra MAS kaplı cam lamel üzerine sürülür. PBS ile 5 dk boyunca 3 kez yıkandıktan sonra %0.1 triton X ile tatbik edilir. Metanol içerisinde %0.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkube edildiğinde endojen peroksidaz aktivitesi bloke olur. Ardından GC örnekleri 1 saat süre ile oda sıcaklığında histofine SAB-PO ile bloklanır.sonrasında GC örnekleri bir gece önceden 4 derecede PBS ile dilue edilmiş primer antikolar ile inkube edilir. Anti decorin antikoru kullanılır. GC örnekleri 30 dakika süre ile oda sıcaklığında histofine SAB-PO ile inkube edilir. DAB kullanılarak renk oluşumu sağlanır. Gc örnekleri su ile yıkanır ve nukleuslar 10 dakika süre ile %1 metilgreen ile boyanır.kalıcı spesimenler ethanol ve xylene ile dehidratasyon uygulanarak elde edilir. Ve entellan ile mühürlenir.DCN lokalizasyonu tayini için GC lere hematoksilin ve eosin boyama uygulanır.

### **6.2 immunohistokimya**

İmmunohistokimya normal insan over doku örneklerine uygulanır. Ethanol ve xylene ile bir seri deparafinizasyon ve rehidrasyon işleminden sonra örneklerin 30 dakika süre boyunca %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde inkube edilmes ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke olur.

## **7.SDS-PAGE ve western blot analizi**

Western blot analizi GC içerisinde DCN nin varlığını degerldirmek için antidecorin antikoru kullanılarak, iki klinik GC örneği ve rekombinan DCN (rec DCN) için uygulandı.

Örnekler Laemmlı tamponu kullanılarak dilue edildi ve Laemmlı metoduna göre SDS-PAGE uygulandı. SDS-PAGE kasetleri, güç kaynağı ve elektroforez tamponu kullanılarak elektroforez uygulandı. Trans blot turbo protein trasinferi için kullanıldı. Zarlar tris tamponize mayide bloke edildi.anti decorin antikoru kullanıldı. Primer antikolar primer antikor dilusyon tamponunda dilue edildi.

## **8.istatistiksel analiz**

her bir folikuler sıvı ve serum örnekleri tek başına analiz edildi. Tüm istatistikler R version 3.3.2. kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırma Mann-Whitney U testi veya Fisher's olasılık testi kullanılarak yapıldı. Ölçülen parametrelerim korelasyonu Spearman R test kullanılarak değerlendirildi. P<0.005 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **Sonuçlar**

Bu çalışma nedeni bilinmeyen infertilite sebebi ile yardımcı üreme tekniği uygulanmış 27-50 yaş arası 88 hastadan toplanmış 130 oosit ve bunların folikuler sıvı ve kan örneklerini içermektedir. OPU

uygulandığı sıradaki ortalama yaş 40 (38-43) ve uygulanan total ortalama gonadotropin dozu 1800 IU dir.(1275-3056) 130 oosit için fertilizasyon hızı %82 ve kaliteli embriyo oranı %44 dür. 130 örnekten toplanan F-DCN ve S-DCN ortalamaları 39.26 ng/ml ve 4.88 ng/ml dir.F-DCN ,S-DCN ye kıyasla bir hayli yüksek bulunmuştur. Over stimülasyon protokolleri arasında her F-DCN ve S-DCN arasında fark görülmemiştir. F-DCN ile hasta yaşı,gonadotropin total dozu, folikuler sıvıdaki IGF-1 konsantrasyonu ve folikül etrafındaki kan akımının PI ı arasında korekasyon saptanmamıştır. Ancak F-DCN S-DCN ile negatif zayıf bir korelasyon göstermiştir.

130 oositten 70 tanesinde ICSI uygulanmıştır. IVF grubunun fertilizasyon hızı ICSI grubuna göre bariz olarak yüksektir ,ancak hasta yaşı, folikül etrafındaki kan akımının PI ı ,F-DCN ,S-DCN ,IGF-1 konsantrasyonları ve kaliteli embriyo oranı iki grup arasında önemli bir fark göstermemiştir.

Tüm örnekler içinde , F-DCN ve S-DCN nin döllenmiş ve döllenmemiş tüm oositlerinde dikkate değer bir fark yoktu. Ancak F-DCN nin döllenmiş oositlerin yalnızca ICSI uygulananlar için döllenmemiş oositlerden önemli bir derece düşüktür. ( P = 0.043 )

Eğrinin altında kalan yükselmiş ROC( Receiver-operating characteristic) alanı ile ICSI grubunun F-DCN si başarılı bir döllenmeyi tahmin edebilecek yeteneğe sahipti.

ROC eğrisine göre cut-off level 34.5 ng/ml olarak belirlendiğinde , F-DCN nin cut-off levelinin düşük olduğu foliküllerden alınan oositlerin döllenme oranı , F-DCN yüksek cut-off levelindeki oositlerden daha iyi eğilimdeydi.

F-DCN nin duyarlılık, spesifiklik, pozitif ve negatif belirleyicilik değerleri sırasıyla 0.72, 0,58 ,0,86 ve 0,37.

Embriyo kalitesi ile ilişkili olarak , iyi ve verimsiz embriyoların F-DCN leri veya S-DCN leri arasında belirgin bir fark yoktu. Fakat iyi embriyoların S-DCN si sadece ICSI tarafından dölenen verimsiz embriyoların S-DCN sine göre önemli bir ölçüde yüksekti.

Immunositokimya üç GC örneğine uygulandı. Tüm örneklerde DCN ye karşı antikolar ile boyama gözlenmedi.

DCN nin GCs de lokalizasyonu bulunmadı. Ek olarak sağlıklı insan yumurtalık doku kesitlerine de Immunositokimya uygulandı.

DCN ye karşı antikolarla boyanmada stromal hücreler ve fibroblastların dejenerasyon formu incelendi. Bu kesitte foliküller bulunamadı.

Anti-decorin antikoru kullanılan iki GC örneğinin Western biot analizi band göstermedi . Fakat recDCN moleküler ağırlığı 43 kDa olan bir band gösterdi.

Bununla birlikte , anti-alfa-tubulin ve antikoru ve anti-beta-tubulin antikoru kullanımı moleküler ağırlıkları sırasıyla 52 kDa ve 45 kDa olan single band gösterdi.

## Tartışma

Mevcut çalışma DCN nin olgun folikül içinde var olduğu ve ölçülebildiğini göstermektedir. Ayrıca F-DCN S-DCN den daha yüksekti. ICSI tarafından döllenmiş Oositlerin F-DCN si önemli bir ölçüde döllenmeyen oositlere göre daha düşüktü. Olgun foliküllerin folikuler sıvısında DCN nin kökeni ile ilişkin , DCN nin GC tarafından daha az ihtimalle üretildiği düşünülür çünkü DCN hem Immunositokimya hem de Western blotting ile tespit edilemedi.

Olgun foliküllerin içindeki DCN ve onun folikuler sıvı içindeki konsantrasyonu 39.26 ng/ml. IVF hastalarından toplanan dikkate değer şekilde bu çalışmada gösterilen konsantrasyona göre daha az olan DCN nin konsantrasyonunu 12.29 ng/ml

Bu iki çalışma arasındaki tutarsızlık folikuler sıvı toplama metodlarından ve F-DCN ölçüsü olarak kullanılan enzim-linked immunsorbent assay kit den kaynaklı oluşabilmektedir

Bu çalışmada F-DCN S-DCN den yaklaşık 8 kat daha yüksektir. Sonuçlar DCN nin gerekli olduğunu ve olgun foliküllerde rol oynadığını önermektedir

Oositlerin ICSI tarafından döllenmiş F-DCN si döllenmeyen oositlere göre dikkate değer bir şekilde düşüktür, buna rağmen aralarındaki ilişki F-DCN ve hasta yaşı , gonadotropinin toplam dozu , FF deki IGF-1 konsantrasyonu ve kan akışındaki PI gösterilmemiştir.

ROC eğrisine göre cut-off level 34.5 ng/ml olarak belirlendiğinde , F-DCN nin cut-off levelinin düşük olduğu foliküllerden alınan oositlerin döllenme oranı F-DCN yüksek cut-off levelindeki oositlerden daha iyi eğilimdeydi.

Ek olarak pozitif belirleyicilik değeri ICSI grubunun döllenme oranına göre daha yüksekti. Bu nedenle , F-DCN, ICSI tarafından yapılan başarılı döllenmeyi belirleyici imkanı vardır.

ICSI konusunda ,döllenme sonucunun, oositlerin yetiştirme kalitesine, spermilerin döllenme yeteneğinden daha fazla bağımlı olduğu varsayıldığı için DCN nin oositlerin gelişimini ve olgunluğunu etkilediği ileri sürülmüştür.

Adam et al DCN nin GC fosforile olduğunu bildirmiştir. Bu raporda DCN nin folikuler sıvıdaki etkisinin EGF ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple biz de folikuler sıvıda EGF yi ölçtük fakat EGF konsantrasyonu bu çalışmada kullanılan ELISA kitin alt limitinin altında olduğu için arasında ilişki araştırılmadı.

Buna rağmen IGF-1 ve F-DCN ölçülebildi. Bu nedenle , olgun foliküllerin DCN leri , IGF-1 üzerinden büyüme faktörlerini düzenleme ihtimali düşüktür

Olgun foliküllerin GCs inde DCN bulunamadı . Yanısıra önceki çalışmaların sonuçlarını düşünerek DCN nin preantral ve Antral foliküller içinde olmadığını gösteriyor .

DCN muhtemelen GCs tarafından üretiliyor .

F-DCN nin kökeni gibi bazı hipotezleri tartıştık . İlk olarak DCN stromal hücreler tarafından üretilebilir foliküllere salgılar.

Bu çalışmada stromal over hücresindeki DCN ifadesi Adam tarafından saptanmıştır

Ancak DCN nin varlığını büyük moleküllerde inceleyemedik . Büyük molekülün folikülün bazal laminasını hızlıca geçemediğini gösterdi. Bu yüzden folikül büyümesi sırasında DCN nin kandan folikuler sıvıya aktığı düşünülmektedir. çünkü F-DCN bu çalışmada S-DCN den daha yüksekti, çünkü DCN nin kandan folikuler sıvıya aktif olarak alınması mümkün.

Yani , DCNnin muhtemelen immatur foliküllerinde pozitif fonksiyonları vardır ve oositlerin olgunluğunu ve gelişimini etkileyebilir. DCN nin hücre proliferasyonu ve angiogenez induksiyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Benzer şekilde mature foliküllerin de DCN, oksit olgunluğunu ve folikül büyümesini destekler

Var olan çalışmada , S-DCN diğer faktörlere göre ölçüldü ve analiz edildi. Ancak S-DCN nin GC s tarafından salgılanan diğer biyoaktif maddelerden farklı olarak DCN salgılandığından ve çeşitli organlarda ve kan akışlarında bulunduğu için doğrudan GC s ve oosit düşünülmemektedir.

Bu yüzden iyi embriyoların S-DCN si verimsiz olanlara göre önemli ölçüde yüksektir ya da S-DCN ve f-DCN arasında negatif korelasyon olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma için bazı kısıtlamalar olduğunu biliyoruz. İlk olarak , folikuler sıvı ve serum örnekleri analize kadar donduruldu. Yani donma ve çözülme aşamaları ELISA sonuçlarını da etkilemesi muhtemeldir.

ikincil olarak bu çalışmadaki örnek sayısı kıyasla az ,bu yüzden hamilelik veya doğum oranı ile DCN arasındaki bağlantıyı analiz etmek zor.

Bu sebeple bizim çalışmamız açıklanamayan infertilite sebebi ile ART ile tedavi görmüş hastalarla ve bu hastaların ponksiyone foliküllerinden toplanan folikuler sıvı örnekleri ile kısıtlıydı.

DCN ve tedavi sonuçları arasındaki ilişkiyi analiz etmek için hem de ilerideki araştırmalar için, analiz örneklerini arttırmak gerekli olacaktır.

Sonuc olarak bu çalışmada mature folikülün sıvısı içindeki var olan DCN ile ICSI sonrasında fertilizasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

- [1] Lédée N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, et al. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *J Reprod Immunol* 2011;88(2):118–23.
- [2] Gaafar TM, Hanna MO, Hammady MR, Amr HM, Osman OM, Nasef A, et al. Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome. *Immunol Invest* 2014;43(6):572–84.
- [3] Kawano Y, Fukuda J, Nasu K, Nishida M, Narahara H, Miyakawa I. Production of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  in human follicular fluid and cultured granulosa cells. *Fertil Steril* 2004;82(Suppl. 3):1206–11.
- [4] Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 2008;283(31):21305–9.
- [5] Schönherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin-mediated signal transduction in endothelial cells. Involvement of Akt/protein kinase B in up-regulation of p21(WAF1/CIP1) but not p27(KIP1). *J Biol Chem* 2001;276(44):40687–92.
- [6] Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, et al. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem* 2005;280(37):32468–79.
- [7] Schönherr E, Sunderkötter C, Iozzo RV, Schaefer L. Decorin a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem* 2005;280(16):15767–72.
- [8] Schaefer L, Tsalastra W, Babelova A, Baliova M, Minnerup J, Sorokin L, et al. Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol* 2007;170(1):301–15.
- [9] Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 2002;21(31):4765–77.

- [10] Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J* 2010;277(19):3864–75.
- [11] Järveläinen H, Sainio A, Wight TN. Pivotal role for decorin in angiogenesis. *Matrix Biol* 2015;43:15–26.
- [12] Lala PK, Nandi P. Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: the role of decorin. *Cell Adh Migr* 2016;10(1-2):111–25.
- [13] Santra M, Santra S, Zhang J, Chopp M. Ectopic decorin expression up-regulates VEGF expression in mouse cerebral endothelial cells via activation of the transcription factors Sp1, HIF1alpha, and Stat3. *J Neurochem* 2008;105(2):324–37.
- [14] Adam M, Saller S, Ströbl S, Hennebold JD, Dissen GA, Ojeda SR, et al. Decorin is a part of the ovarian extracellular matrix in primates and may act as a signaling molecule. *Hum Reprod* 2012;27(11):3249–58.
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5.
- [16] Goto S, Ozaki Y, Suzumori N, Yasukochi A, Kawakubo T, Furuno T, et al. Role of cathepsin E in decidual macrophage of patients with recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2014;20(5):454–62.
- [17] Obayashi Y, Ozaki Y, Goto S, Obayashi S, Suzumori N, Ohshima F, et al. Role of indoleamine 2,3-Dioxygenase and tryptophan 2,3-Dioxygenase in patients with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2016;75(1):69–77.
- [18] Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;21(11):2960–8.
- [19] McArthur ME, Irving-Rodgers HF, Byers S, Rodgers RJ. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000;63(3):913–24.

**Table 1**  
Characteristics of the study subjects.

Age	40 (38–43)
Controlled ovarian stimulation protocol, n	
Long	54
Short	35
GnRH antagonist	24
CC	17
Total dose of gonadotropin administered [IU]	1800 (1275–3056)
Pulsatility index	0.80 (0.68–0.94)
Fertilization rate [%]	82 (107/130)
Good embryo rate [%]	44 (61/107)

**Table 2**  
F-DCN and S-DCN classified by controlled ovarian stimulation protocols.

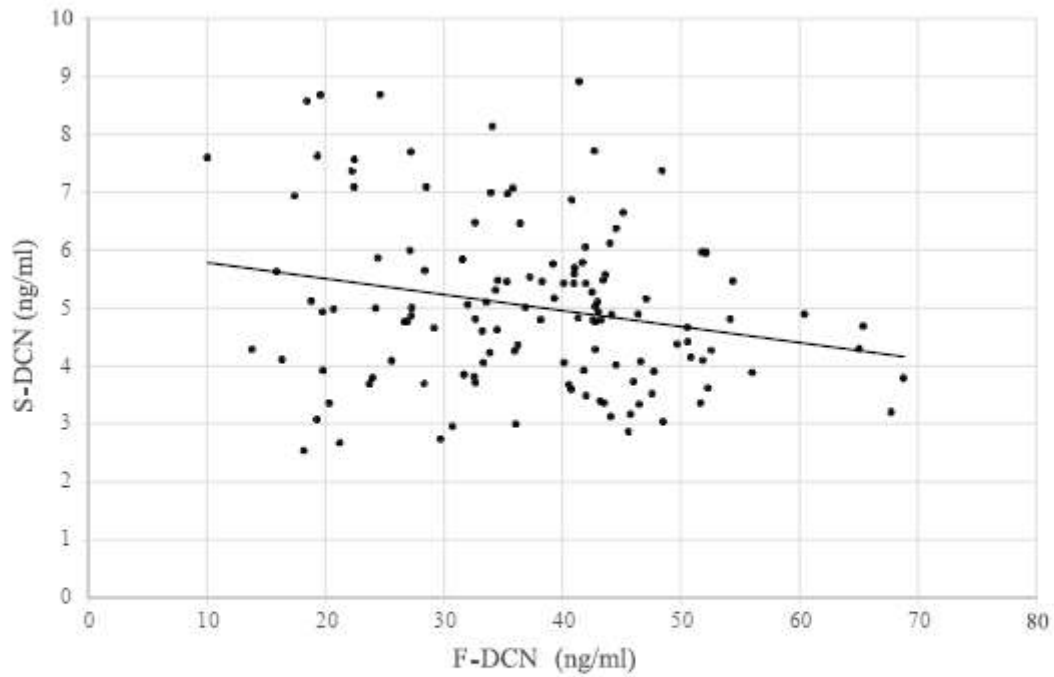
	Total, n = 130	Controlled ovarian stimulation protocol				<i>P</i>
		Long, n = 54	Short, n = 34	GnRH antagonist, n = 24	CC, n = 17	
F-DCN [ng/ml]	39.26 (28.41–44.44)	35.56 (24.06–43.81)	41.34 (31.66–44.55)	41.50 (33.88–47.61)	35.37 (27.23–41.72)	0.129
S-DCN [ng/ml]	4.88 (3.95–5.75)	4.92 (3.97–5.93)	4.90 (4.22–5.48)	4.61 (3.68–5.60)	4.87 (3.93–5.70)	0.831

F-DCN and S-DCN are presented as median (interquartile range). The *P*-values for those parameters were evaluated using the Mann-Whitney *U*-test.

**Table 3**  
Correlations between F-DCN and each parameter.

Correlation between F-DCN and the following:	Spearman <i>R</i>	<i>P</i>
Age	– 0.031	0.731
Total dose of gonadotropin administered	0.108	0.222
S-DCN	– 0.189	0.031
Follicular fluid IGF-1	– 0.097	0.557
PI	– 0.027	0.781

Correlations between F-DCN and other parameters were evaluated using the Spearman *R*-test (n = 130).



**Fig. 1.** Correlation between F-DCN and S-DCN.

The vertical axis indicates S-DCN and the horizontal axis indicates F-DCN. Correlation between S-DCN and F-DCN was evaluated using the Spearman *R*-test. A weak negative correlation was observed between two parameters ( $R = -0.189$ ;  $P = 0.031$ ).

**Table 4**  
Comparison of parameters of the IVF group and ICSI group.

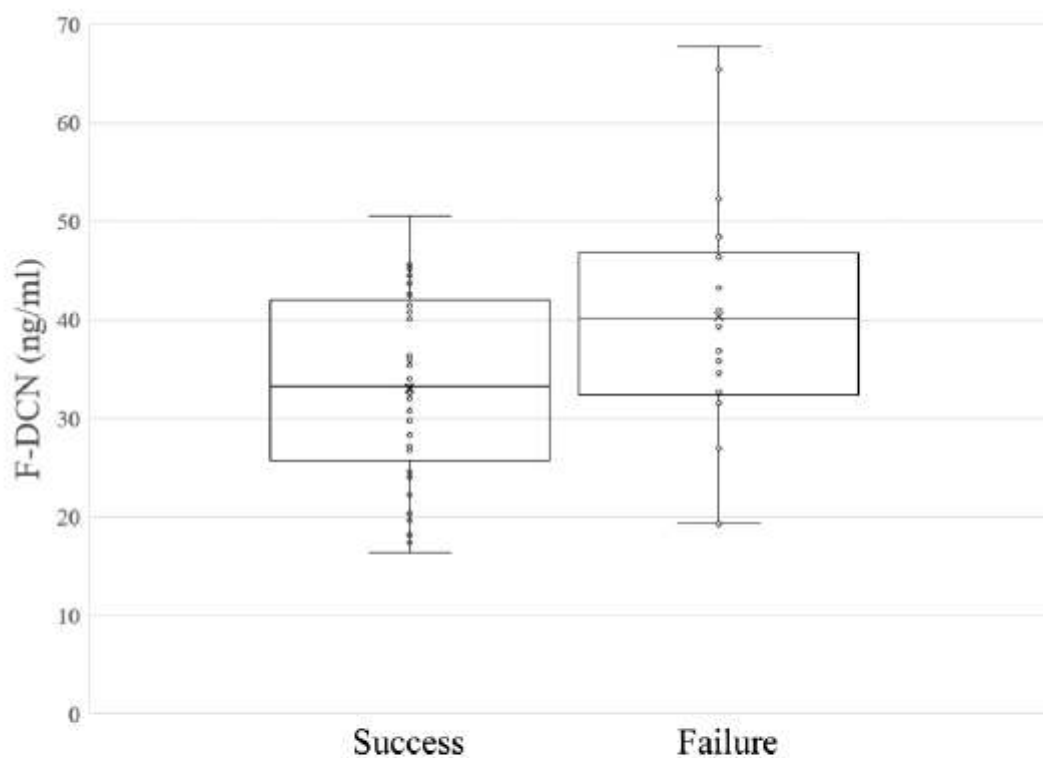
	IVF group, n = 60	ICSI group, n = 70	<i>P</i>
Age	41 (37–43)	40 (38–42)	0.225
Total dose of gonadotropin administered [IU]	1800 (1463–3113)	1837 (1275–3000)	0.689
F-DCN [ng/ml]	41.87 (33.1–47.22)	35.59 (27.24–42.91)	0.068
S-DCN [ng/ml]	4.67 (3.91–5.46)	5.01 (4.07–6.48)	0.062
Follicular fluid IGF-1 [ng/ml]	92.98 (71–101.06)	73.29 (68.57–83.93)	0.151
PI	0.79 (0.66–0.91)	0.8 (0.68–0.94)	0.906
Fertilization rate [%]	92 (55/60)	74 (52/70)	0.011

Values of age, total dose of gonadotropin administered, F-DCN, S-DCN, IGF-1 concentration in FF, and PI of the blood flow around the follicle are presented as median (interquartile range). The *P*-values for those parameters were evaluated using the Mann-Whitney *U*-test. The fertilization rate is presented as the percentage of the total number (fertilized oocytes/all oocytes). The *P*-value was calculated using Fisher's exact probability test.

**Table 5**  
Comparison of the roles of F-DCN and S-DCN in fertilization outcomes and embryo quality.

F-DCN [ng/ml]	Fertilization, n = 130		P	Embryo quality, n = 107		P
	Success	Failure		Good	Poor	
Total	38.30 (27.80–44.36) {107}	41.04 (32.16–44.91) {23}	0.435	40.71 (28.49–44.02) {61}	36.43 (28.33–44.18) {46}	0.811
IVF	41.80 (33.72–47.34) {55}	42.76 (31.68–42.79) {5}	0.873	41.93 (35.78–47.65) {31}	38.70 (30.35–45.95) {25}	0.687
ICSI	33.24 (26.67–41.43) {52}	40.18 (33.11–45.64) {18}	0.043	33.61 (27.21–42.56) {30}	33.32 (26.97–41.98) {21}	0.992
S-DCN [ng/ml]						
Total	4.87 (3.98–5.83) {107}	4.90 (4.29–5.49) {23}	0.949	5.00 (4.08–6.12) {61}	4.77 (3.93–5.47) {46}	0.115
IVF	4.66 (3.92–5.47) {55}	4.77 (3.89–4.94) {5}	0.659	4.38 (3.85–5.55) {31}	4.65 (4.13–5.26) {25}	0.942
ICSI	5.01 (4.05–6.71) {52}	4.96 (4.71–5.65) {18}	0.804	5.63 (4.65–7.30) {30}	4.98 (3.87–5.59) {21}	0.036

F-DCN and S-DCN are presented as median (interquartile range) and {number of samples}. The *P*-values for those parameters were evaluated using the Mann-Whitney *U*-test.



**Fig. 2.** F-DCN in the case of successful and failure fertilization using ICSI. The medians (IQR) of F-DCN of the oocytes fertilized by ICSI were 33.24 (26.67–41.43) ng/ml. On the other hands, that of the oocytes that were not fertilized were 40.18 (33.11–45.64) ng/ml. F-DCN of the oocytes fertilized by ICSI was significantly lower than that of the oocytes that were not fertilized ( $P = 0.043$ ).

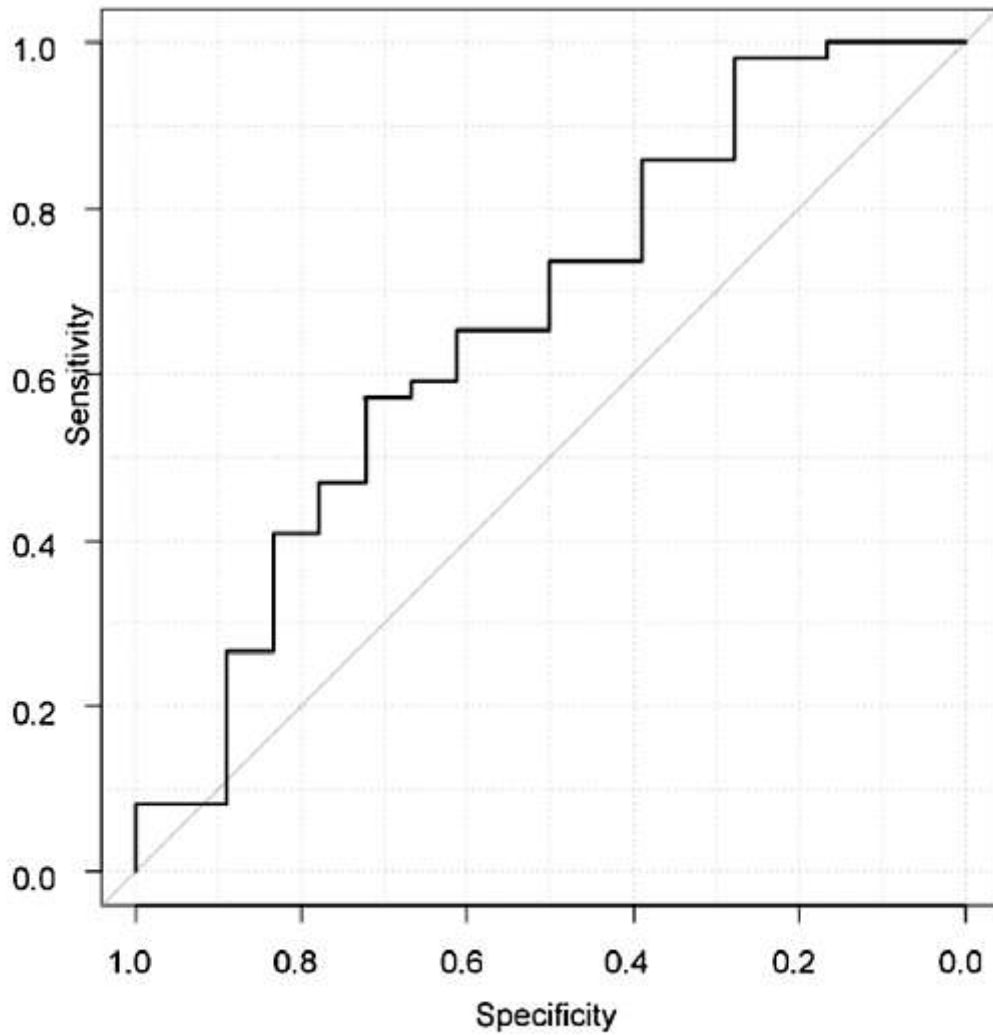
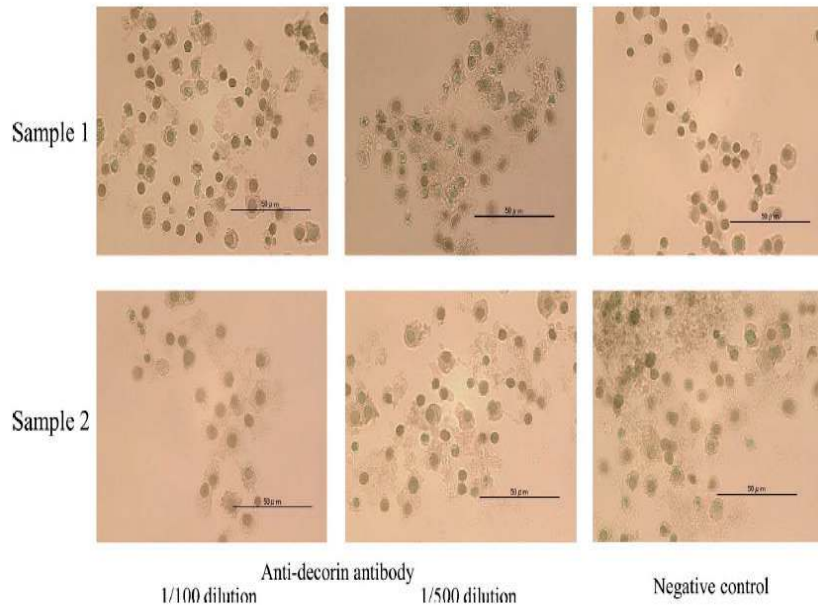
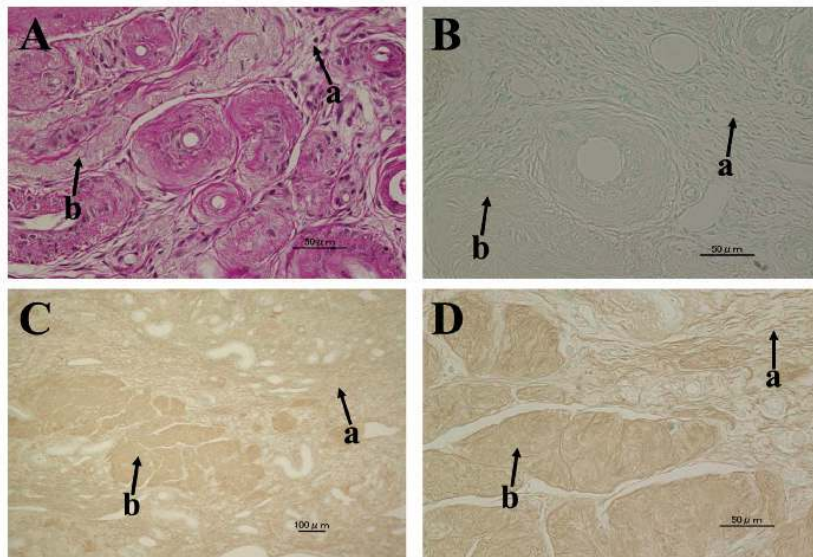


Fig. 3. Receiver-operating characteristic curve for F-DCN for the prediction of fertilization using ICSI.

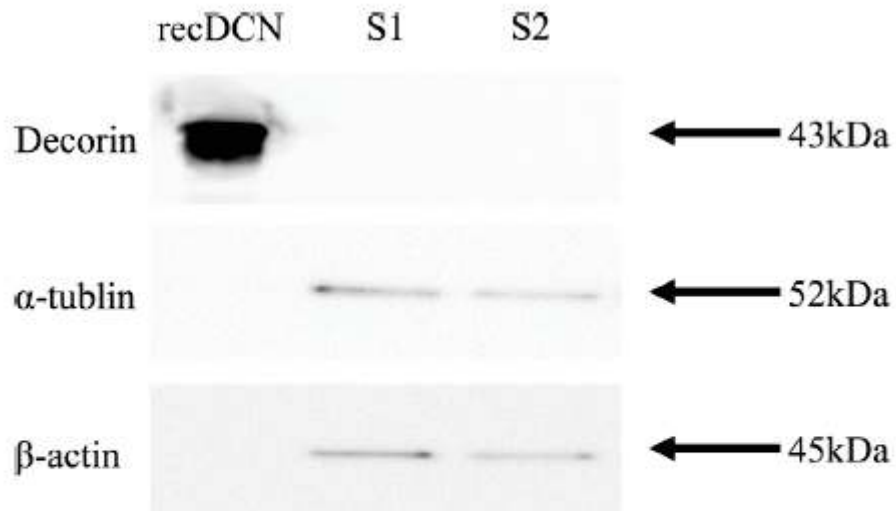
Receiver-operating characteristic (ROC) curve for decorin concentration in follicle fluid for the prediction of fertilization using intracytoplasmic sperm injection. ROC area under the curve was 0.662.



**Fig. 4. Immunocytochemistry of GCs.** Immunocytochemistry was performed for granulosa cells from patients treated with assisted reproduction technology. The pictures of two samples of three were presented. Brown color represents positive staining of the anti-decorin antibody. Immunoreactivity of decorin was not observed in all samples and no remarkable difference in the negative control was observed. Original magnification:  $\times 400$ , Scale bars:  $50 \mu\text{m}$ .



**Fig. 5. Immunohistochemistry of normal human ovarian tissue.** Immunohistochemistry was performed for normal human ovarian tissue sections. The follicles were not found in these sections. Brown color represents positive staining of the anti-decorin antibody. (A) Hematoxylin and eosin staining was performed. (B) Negative controls were created by omitting the primary antibodies. (C, D) Immunoreactivity of decorin was observed in the stromal cells (a) and the degeneration form of the fibroblasts (b). Original magnification:  $\times 400$ , scale bars:  $50 \mu\text{m}$  (A, B, D). Original magnification  $\times 100$ , scale bar:  $100 \mu\text{m}$  (C).



**Fig. 6.** Western blot analysis of GCs and recDCN.

Anti- $\alpha$ -tubulin antibody and anti- $\beta$ -actin antibody are loading controls. The two samples (S1, S2) are granulosa cells from patients treated with assisted reproduction technology. RecDCN is positive control. No band was observed in GC samples using anti-decorin antibody.