

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
**Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS**

**Epiteeli ripsrakud noorte ja vanemate reproduktiiveas naiste endomeetriumis:  
immunohistoloogiline analüüs ja uue analüüsimetoodika arendus**

Magistritöö

30 EAP

Arina Laanemets

Juhendaja: MSc Marina Loid

Kaasjuhendajad: PhD Keiu Kask

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2024

## **INFOLEHT**

### **Epiteeli ripsrakud noorte ja vanemate reproduktiiveas naiste endomeetriumis: immunohistoloogiline analüüs ja uue analüüsimetoodika arendus**

Tänapäeva ühiskonnas on pereplaneerimine lükkunud 30.-40. eluaastatesse. See toob endaga kaasa vanusest tingitud viljatusprobleeme. Vanuselised muutused toimuvad nii hormonaalsel, rakulisel kui ka molekulaarsel tasandil. On leitud, et vanemate naiste endomeetriumi täiskoes on ülesreguleeritud ripsrakkudega seotud geenid, mis võib tuleneda nii ripsrakkude arvu muutusest kui ka ripsrakkude geeniekspressiooni muutustest. Käesolevas töös selgitati välja, et vanematel naistel on endomeetriumis oluliselt rohkem ripsrakke võrreldes noorematega. Seejärel töötati välja meetod ripsrakkude eraldamiseks teistest endomeetriumi rakkudest SiR-tubuliini ja LhS28 abil. Väljatöötatud metoodikat kasutatakse edaspidi nooremate ja vanemate naiste ripsrakkude geeniekspressiooni profiilide võrdlemiseks.

Märksõnad: endomeetrium, FACS, ripsrakud, vananemine, viljatus

CERCS teaduseriala: Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid (B210)

### **Epithelial ciliated cells in the endometrium of young and older women of reproductive age: immunohistological analysis and development of a new methodology of analysis**

In modern society, family planning has been postponed to 30-40s. This leads to age-related infertility problems. Age-related changes are hormonal, cellular as well as molecular. Ciliated cell-related genes have been found to be upregulated in whole endometrial tissue of older women, which may be due to changes in ciliated cell number as well as changes in gene expression of ciliated cells. In this study, it was found that older women have significantly more ciliated cells in the endometrium compared to younger women. A method was then developed to separate ciliated cells from other endometrial cells using SiR-tubulin and LhS28. The developed methodology will be used in the future to compare the gene expression profiles of ciliated cells of younger and older women.

Key words: endometrium, FACS, ciliated cells, aging, infertility

CERCS research project: Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue cultures (B210)

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Naise reproduktiivsüsteem.....	7
1.1.1. Munasarja, munajuha ja emaka morfoloogia .....	7
1.1.2. Endomeetriumi morfoloogia, funktsioon ja retseptiivsus.....	8
1.1.3. Sughormoonid, ovariaal- ja menstruaaltsükkel .....	10
1.1.4 Viljatus .....	14
1.2. Naise reproduktiivsüsteemi vananemine .....	15
1.2.1. Rakuvananemine .....	15
1.2.2. Hormonaalsed muutused .....	16
1.2.3. Muutused endomeetriumis.....	18
1.3. Endomeetriumi ripsrakud.....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	23
2.1. Töö eesmärgid .....	23
2.2. Materjalid ja meetodikad .....	23
2.2.1. Eetika, patsiendid ja proovid .....	23
2.2.2. Immunohistokeemia.....	24
2.2.3. Immunofluorestsents analüüs.....	25
2.2.4. Voolutsütomeetriline analüüs .....	26
2.2.5. Fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine.....	31
2.2.5. RNA sekveneerimine .....	31
2.2.6. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon.....	31
2.2.7. Andmete analüüs.....	32
2.2.8. Kasutatud programmid.....	33
2.3. Tulemused .....	33
2.3.1. Endomeetriumi ripsrakkude analüüs nooremate ja vanemate naiste endomeetriumis .....	33
2.3.2. Endomeetriumi ripsrakkude visualiseerimine immunofluorestsentsi abil .....	35

2.3.3. Endomeetriumi ripsrakkude voolutsütomeetriline analüüs .....	36
2.3.4. Fluorestsents-aktiveeritud endomeetriumi ripsrakkude sorteerimine .....	44
2.3.5. Sorteeritud rakkude RNA sekveneerimine .....	48
2.3.6. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon sorteeritud rakkudest pärit cDNA-ga	52
2.4. Arutelu .....	54
KOKKUVÕTE .....	59
SUMMARY.....	60
TÄNUSÕNAD .....	62
KASUTATUD KIRJANDUS .....	63
LISA 1. Endomeetriumi luminaalepiteeli piiritlemine ja ripsrakkude loendamine skaneeritud koelõigul .....	77
LISA 2. Immunofluorestsentsanalüüsil kasutatud munajuhade kontrollid .....	78
LISA 3. I voolutsütomeetriline analüüs 1 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega .....	79
LISA 4. II ja III voolutsütomeetriline analüüs 0,004-2 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkude.....	80
LISA 5. IV voolutsütomeetriline analüüs formaliiniga fikseeritud ning Ac-Tub-α- ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudele.....	82
LISA 6. V voolutsütomeetriline analüüs tsinkfikseeritud ning Ac-Tub-α- ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega .....	85
LISA 7. VI ja VII voolutsütomeetriline analüüs SiR-tubuliini ja LhS28-ga märgistatud rakkudega .....	87
LIHTLITSENTS .....	89

## KASUTATUD LÜHENDID

Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin

ACK – ammoonium-kloriid-kaalium (ingl. k. *ammoonium-chloride-potassium*)

AMA – kõrgem reproduktiivne vanus (ingl. k. *advanced maternal age*)

BSA – veise seerumi albumiin (ingl. k. *bovine serum albumin*)

CC – ripsrakk (ingl. k. *ciliated cell*)

DAB – 3,3'-diaminobensidiin

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DEPC – dietüül polükarbonaat (ingl. k. *diethyl pyrocarbonate*)

E<sub>1</sub> – östroon

E<sub>2</sub> – östradiool

E<sub>3</sub> – östriool

ECM – rakuväline maatriks (ingl. k. *extracellular matrix*)

EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul (ingl. k. *epithelial cell adhesion molecule*)

FBS – veise loote seerum (ingl. k. *fetal bovine serum*)

FOXJ1 – *Forkhead box J1*

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon

GnRH – gonadotropiine vabastav hormoon (ingl. k. *gonadotropin releasing hormone*)

IFT – viburisisene transport (ingl. k. *intraflagellar transport*)

K40 – lüsiin-40

LE – luminaalepiteel

LH – luteiniseeriv hormoon

P<sub>4</sub> – progesteron

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl. k. *phosphate buffered saline*)

RT – toatemperatuur (ingl. k. *room temperature*)

SASP – vananemisega seotud sekretoorne fenotüüp (ingl. k. *senescence-associated secretory phenotype*)

SiR – silikoonrodamiin

TBS – Tris-puhverdatud soolalahus (ingl. k. *Tris buffered saline*)

WOI – implantatsiooniaken (ingl. k. *window of implantation*)

YMA – madalam reproduktiivne vanus (ingl. k. *young maternal age*)

## SISSEJUHATUS

Naise sisemine reproduktiivsüsteem koosneb munasarjadest, munajuhadest, emakast ja tupest ning on oluline järglaste saamiseks. Ovulatsiooni ajal vabaneb munasarjast sekundaarne ootsüüt, mis liigub munajuhasse ja kohtub seal seemnerakuga – toimub viljastumine. Moodustunud embrüo liigub emakasse ja kinnitub endomeetriumi, mis läbib iga menstruaaltsükliga mitmeid muutusi retseptiivsuse ehk vastuvõtlikkuse saavutamiseks. Kui viljastumist ei toimu, irdub endomeetrium koos verega ja tsükkel algab uuesti.

Tänapäeva ühiskonnas otsustab aina enam paare pereplaneerimist edasi lükata, mistõttu jääb paljude naiste esimene rasedus 30.-40. eluaastatesse. Vaatamata kunstliku viljastamise meetodikatele on implantatsiooni ehk pesastumise ebaõnnestumise protsent vanematel naistel suurem, mis viitab endomeetriumi vananemisele. Hiljutine uuring on näidanud ripsrakkudega seotud geenide ülesekspressiooni endomeetriumis, kuid ei ole teada, kas see on seotud ripsrakkude arvu suurenemisega või ripsraku enda geeniekspressiooni muutustega. Seda oleks võimalik uurida endomeetriumi ripsrakkude eraldamisega muust koest, kuid hetkel puudub selleks hea meetod.

Käesoleva magistritöö teoreetiline osa annab ülevaate naise reproduktiivsüsteemi ehitusest ja funktsioonist, hormonaalsest talitlusest (sh menstruaal- ja ovariaaltsüklist), viljatusest, naise reproduktiivsüsteemi vananemisest ja endomeetriumi ripsrakkudest. Eksperimentaalse osa üheks eesmärgiks oli välja selgitada, kas vanematel viljakatel naistel esineb võrreldes nooremate naistega endomeetriumis rohkem ripsrakke. Teiseks eesmärgiks oli välja töötada meetodika endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks, mida saaks edaspidi kasutada nooremate ja vanemate naiste ripsrakkude geeniekspressiooni profiili võrdlemiseks. Töö viidi läbi Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS-is.

## **1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE**

### **1.1. Naise reproduktiivsüsteem**

#### **1.1.1. Munasarja, munajuha ja emaka morfoloogia**

Naise reproduktiivsüsteem koosneb sisemistest ja välimistest suguorganitest (häbemekink, kõdisti, suured ja väikesed häbememokad ning vestibüül, kuhu jääb kuse- ja tupeava), toodab hormoone ning vastutab viljakuse, menstruatsiooni ja seksuaalse aktiivsuse eest. Sisemised suguelundid on munasarjad, munajuhad, emakas ja tupp ning need on eriti olulised järglaste saamise seisukohast. (Rosner et al., 2022) Munasarjad koosnevad histoloogiliselt mitmest kihist (loetletud seestpoolt väljapoole): säsis, koorest, valkjaskestast ja ühekihilisest kuupepiteelist. Munarakkude arenemine ehk follikulaarne oogenees toimub munasarja koore osas paiknevates ovariaalfolliikulites. Munasarjad on olulised suguhormoonide tootmisel, millest tähtsamad on folliikulaarrakkude poolt toodetud östrogeen ja progesteron. (Gibson & Mahdy, 2023) Munasarjast vabanenud sekundaarne ootsüüt liigub munajuhasse, mis koosneb samuti mitmest osast. Munasarja vahetus läheduses asub narmastega ehk fimbriatega munajuhalehter, millele järgnevad munajuha ampulli ja kitsuse piirkond. Emakaga on ühenduses kõige kitsam, intramuraalne osa. Munajuha lehtri ja ampulli piirkond on vooderdatud limaskestaga, mis on arvukate voltidega ning mida omakorda ümbritseb õhuke silelihaskiht. Emaka poole liikudes muutuvad munajuha voldid väiksemaks ja silelihaskiht muutub paksemaks. (Winuthayanon & Li, 2018) Munajuha limaskesta epiteel koosneb kahest rakutüübist (Crow et al., 1994). Ripsmetega epiteelirakkude ehk ripsrakkude ülesanne on liigutada munarakku/embrüot ja munajuha vedelikku emaka suunas, sekretoorsed rakud aga toodavad sekreeti munajuha niisutamiseks ning varustavad munarakku/embrüot vajalike toitainetega (Lyons et al., 2002).

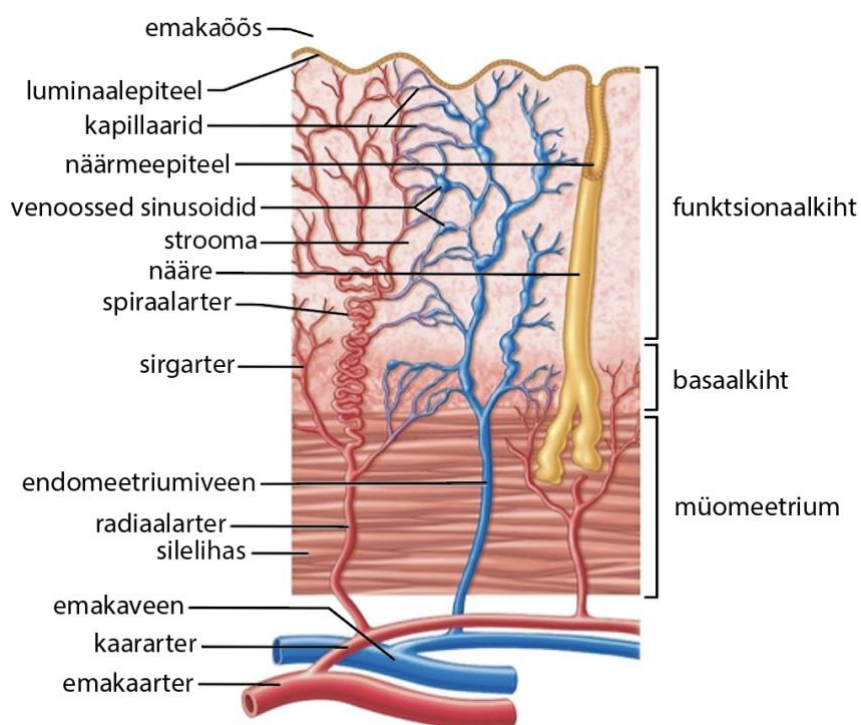
Suguküpse indiviidi ovulatsiooni ajal vabaneb munasarja küpsest folliikulist sekundaarne ootsüüt, mis paisatakse follikulaarvedelikuga munajuhasse (Holesh et al., 2024; Yoshimura & Wallach, 1987). Seksuaalvahekorra ajal viiakse ejakulatsiooni teel tuppe seemnevedelik koos seemnerakkude ehk spermidega, mis seejärel liiguvad läbi emakakaela (ovulatsiooniegselt avatud ja sisaldab spermidele ligipääsu võimaldavat limasekreeti) edasi emakasse (vahendatud nii viburi liikumise kui emaka kontraktsioonide poolt), kuni jõuavad munajuhasse (Kumar & Singh, 2021). Munajuha kitsuse piirkonnas toimub spermide lõplik küpsemine ehk kaptsitatsioon, peale mida liiguvad hüperaktiveeritud spermid munajuha ampulli piirkonda,

kus leiab aset viljastumine (Austin, 1952). Munajuhas leiab aset embrüo lõigustumise protsess, mille käigus moodustub blastotsüst, mis liigutatakse emakasse, kus blastotsüst koorub teda ümbritsevast helevöötimest ehk *zona pellucida*'st ja implanteerub ehk pesastub emaka endomeetriummisse. Emakas on lihaseline õõneselund, millel eristatakse anatoomiliselt emakapõhja, -keha ja -kaelapiirkonda. Emakakeha jaguneb histoloogiliselt omakorda limaskestaks ehk endomeetriumiks ja lihaskestaks ehk müomeetriumiks ning väljastpoolt vooderdab seda emaka serooskest – perimeetrium ehk emakakelme. (Ameer et al., 2022)

### **1.1.2. Endomeetriumi morfoloogia, funktsioon ja retseptiivsus**

Emaka limaskest ehk endomeetrium on emakaõõnt vooderdav kiht, mis eraldub igakuiselt menstruatsiooni ajal (Joonis 1). See jaguneb funktsionaal- ja basaalkihiks, millest esimeses on seitset tüüpi rakke: strooma fibroblastid, sekretoorsed epiteelirakud, ripsrakud, endoteelirakud, makrofaagid ja lümfotsüüdid. (Henriet et al., 2012; W. Wang et al., 2020) Funktsionaalkihi pealmine, emakaõõne poole jääv kiht on ühekihiline silinderepiteel, mis sopistub sissepoole, moodustades näärmeepiteeliga kaetud näärmeid. Basaalkihi ehk -membraani ja epiteelikihi vahele jääb strooma, mis on varustatud veresoontega. (Henriet et al., 2012; Pathare et al., 2023) Menstruaaltsükli käigus muutub erinevate hormoonide, peamiselt östrogeeni ja progesterooni toimel endomeetriumi paksus ja rakuline koostis (Gellersen & Brosens, 2014; More & Masterton, 1976). Tsükli alguses on epiteelirakud valdavalt ripsmeteta ja stroomarakud fibroblastilaadsed. Tsükli progresseerudes suureneb ripsrakkude osakaal (Masterton et al., 1975) ja stroomarakud läbivad detsidualisatsiooni ehk protsessi, mille eesmärgiks on valmistada endomeetrium ette raseduseks. Detsidualisatsiooni iseloomustab stroomarakkude morfoloogia ja funktsiooni muutus, immuunrakkude värbamine ja muutused veresoontega. (Gellersen & Brosens, 2014) Immuunrakkude ülesandeks on sekreteerida tsütokiine, kemokiine ja kasvufaktoreid, mis on vajalikud endomeetriumi retseptiivsuse ehk vastuvõtlikkuse saavutamiseks (Henriet et al., 2012; Pathare et al., 2023). Basaalmembraani juurde jääv strooma ei ole erinevalt funktsionaalkihist menstruaaltsükli eri faasides muutuv ning selles paiknevad endomeetriumi tüvirakud (eristatakse epiteeli ja strooma eellasrakke), mis on vajalikud funktsionaalkihi uuendamiseks. (Abuwala & Tal, 2021; Chan et al., 2004; Hong, 2023) Üheks huvitavaks nähtuseks on pinopoodide, mõne mikromeetrise laiusuga ja mikrovillidest pikemate raku väljakasvude, teke endomeetriumi epiteelirakkude apikaalsel pinnal. Nende funktsioon on teadmata, kuid on

leidud, et need esinevad väga lühikest aega (kuni kaks päeva) implantatsiooniaknas ja on muutuva morfoloogiaga. Lisaks on märgatud, et pinopoodid on progesteroonist sõltuvad ning esinevad piirkonnas, kus toimub embrüo eeldatav pesastumine. (Kim & Kim, 2017; Quinn & Casper, 2009)



**Joonis 1. Endomeetriumi ehitus.** Endomeetrium jaguneb funktsionaal- ja basaalkihiks. Funktsionaalkihis on luminaalepiteel ja näärmed ning strooma, mida varustavad veresooned. Funktsionaalkiht eraldub erinevalt basaalkihist igas menstruaaltsükli. Basaalkihis on samuti stroomat, lisaks leidub seal endomeetriumi tüvirakke, mis on vajalikud funktsionaalkihi vahetumiseks. Basaalkihi alla jääb emaka silelihaskiht ehk müomeetrium ning seda vooderdab emakakelme ehk perimeetrium (ei ole joonisel näha). Endomeetriumi varustavateks veresoonteks on emakaarter ja -veen. Joonis on kohandatud (Marieb & Hoehn, 2010).

Embrüo kinnitumine endomeetriumi toimub sekretoorses faasis, täpsemalt implantatsiooniaknas (*window of implantation* ehk WOI). Implantatsiooniaknaks nimetatakse ideaalse, 28-päevase menstruaaltsükli umbes nelja päeva pikkust perioodi, mis algab 6.-7. päeval pärast luteiniseeriva hormooni (LH) kõrgeimat taset. Selles ajavahemikus on endomeetrium retseptiivne ehk valmis vastu võtma embrüot. (Pathare et al., 2023) Retseptiivsuseks nimetatakse endomeetriumi valmisolekut vastu võtma blastotsüsti, mil blastotsüsti trofektoderm saab kinnituda endomeetriumi epiteelirakkudele. Eristatakse pre-retseptiivset, retseptiivset ja post-retseptiivset endomeetriumi. (Sun & Yeh, 2022) Hindamiseks, millises menstruaaltsükli etapis endomeetrium parasjagu on, kasutati pikka aega peamiselt endomeetriumi histoloogilist hindamist Noyes'i meetodil (Noyes et al., 1950). Nüüdseks on näidatud, et isegi tervete, viljakate naiste puhul on endomeetriumi histoloogiline

hindamine ebatäpne (Coutifaris et al., 2004; Murray et al., 2004), mistõttu on hakatud uurima retseptiivsusega seotud biomarkereid. Inimese endomeetriumi transkriptoomiuuringud on näidanud sadu geene, mis on retseptiivsuse tekkes üles- või allareguleeritud. Nende hulgas on geenid, mis osalevad hormoonide, kasvufaktorite, tsütokiinide, adhesioonimolekulide jpt valkude sünteesil. (Altmäe et al., 2017)

Edukaks implantatsiooniks on vajalik retseptiivne endomeetrium; normaalne, funktsionaalne helevöötmetest ehk *zona pellucida*'st koorunud blastotsüst ning ema ja embrüo kudede omavaheline suhtlus. Inimese embrüo implantatsioonil eristatakse kolme etappi: apositsioon, adhesioon ja invasioon. Apositsiooni ajal toimub embrüo esmane kontakt endomeetriumi rakkudega. Adhesiooni ajal toimub embrüo päritolu trofoblasti rakkude kinnitumine emaka endomeetriumi epiteelirakkudele, mida vahendavad ligand-retseptor interaktsioonid. Invasiooni ajal „tungib“ embrüo tänu trofoblasti rakkudele läbi epiteelikihi detsiiduasasse ehk irdkesta, kus jätkub edasine embrüogenees. (Muter et al., 2023; H. Wang & Dey, 2006)

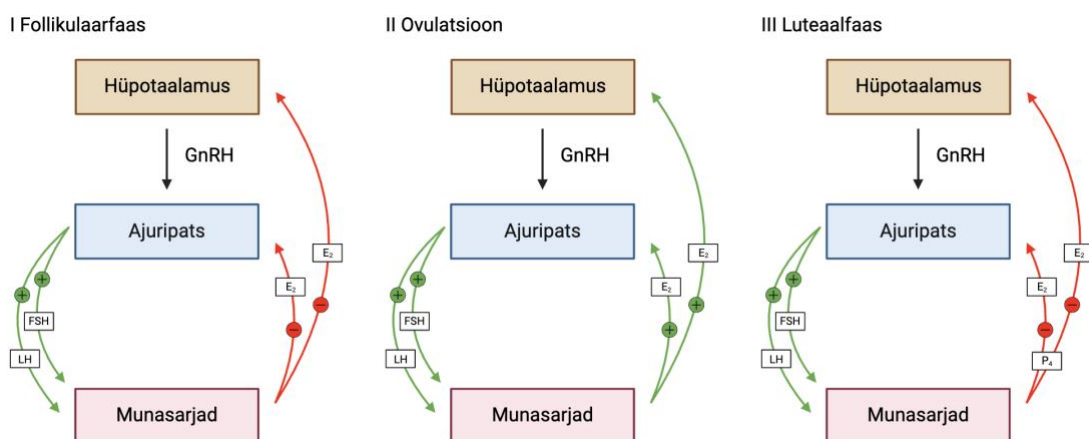
### **1.1.3. Suguhormoonid, ovariaal- ja menstruaaltsükkel**

Reproduktiivsüsteemi normaalne areng ja funktsioon sõltub suguhormoonidest. Suguhormoonid kuuluvad steroidhormoonide hulka ja on seega rasvlahustuvad kolesterooli derivaadid. Need on endokriinnäärmete poolt sekreteeritud molekulid, mille ülesandeks on reguleerida spetsiifilisi protsesse sihtmärkkudedes läbi vastavate hormoonretseptorite. Inimese peamiseks suguhormoonideks on östrogeenid, progesteroonid ja androgeenid ning nendele vastavateks retseptoriteks on östrogeeni, progesterooni ja androgeeni retseptorid. Hormoonretseptorid toimivad rakkudes transkriptsioonifaktoritena, aktiveerides või inhibeerides sihtmärkgeenide avaldumist. (Henriet et al., 2012; Manocha et al., 2018)

Normaalset menstruaaltsüklit reguleerivad peamiselt östrogeen ja progesteroon. Östrogeene, mille hulka kuuluvad östroon ( $E_1$ ), östradiool ( $E_2$ ) ja östriool ( $E_3$ ), toodetakse naistel neerupealistes, munasarja granuloosarakkudes ja ajus. Progesterooni ( $P_4$ ) toodetakse munasarjades, neerupealistes, ajus ja raseduse ajal ka platsentas. (Pathare et al., 2023) Ühtlasi on  $P_4$  kõigi teiste suguhormoonide sünteesis vahemolekul. Selle peamiseks funktsiooniks on emaka endomeetriumi ettevalmistamine implantatsiooniks ning peale embrüo kinnitumist ka hilisema raseduse säilitamine. (Allen & Corner, 1929)

Androgeenide hulka kuuluvad testosteroon ja androsteendioon, mida toodetakse neerupealistes ja munasarja teekarakkudes. Androsteendioon funktsioneerib peamiselt testosterooni,  $E_1$  ja  $E_2$  eellasmolekulina – androsteendioon konverteeritakse granuloosarakkude poolt östrogeenideks (Longcope et al., 1969) ja testosteroon muudetakse funktsionaalseks dihidrotestosterooniks (Andersson et al., 1989) või  $E_2$ -ks (Griffin, 1979). Testosterooni sünteesitakse ka ovulatsiooni järgselt follikulaarrakkudest moodustunud kollaskehas. Androgeenid on vajalikud varajases etapis folliikulite arenguks ja östrogeeni tootmiseks. (Bianchi et al., 2021)

Suguhormoone tootvatel munasarjadel esineb ovariaaltsükkel, kus eristatakse follikulaarset (1.-13. päev), ovulatoorset (14. päev) ja luteaalfaasi (15.-28. päev). Suguhormoonide vabanemist reguleerib hüpotaalamuse-hüpofüüsi-munasarja telg (Joonis 2). Hüpotaalamus toodab gonadotropiini vabastavat hormooni (GnRH), mis stimuleerib ajuripatsis ehk hüpofüüsis folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja LH tootmist. Need omakorda stimuleerivad munasarjades läbi vastavate retseptorite suguhormoonide tootmist. Kõrge suguhormoonide tase jõuab vereringe kaudu tagasi ajuni ja vastavalt ovariaaltsükli faasile stimuleerib või inhibeerib hüpotaalamuses GnRH tootmist läbi positiivse või negatiivse tagasiside mehhanismi. (Manocha et al., 2018; Welt et al., 2003)

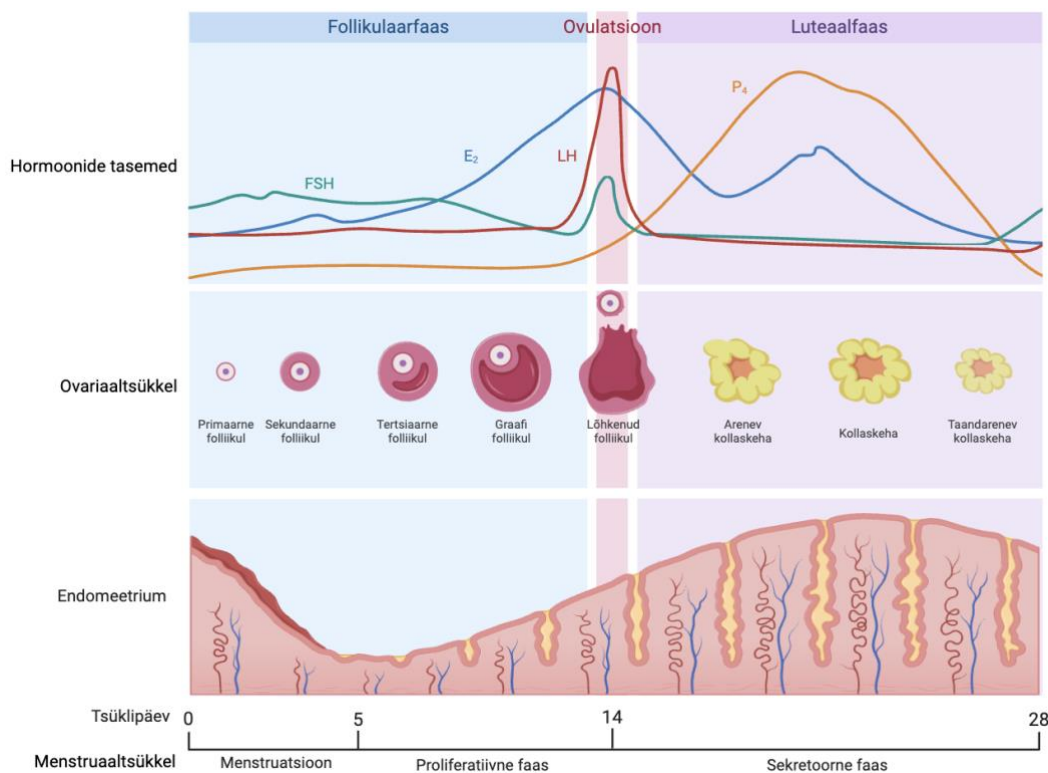


**Joonis 2. Hüpotaalamus-ajuripats-munasarja telg.** Hüpotaalamuse toodetud GnRH stimuleerib ajuripatsis ehk hüpofüüsis FSH ja LH tootmist, mis läbi vastavate retseptorite stimuleerivad omakorda munasarjades östrogeeni, progesterooni ja inhibiini tootmist. Follikulaarfaasis inhibeerib  $E_2$  negatiivse mehhanismi kaudu GnRH ja gonadotropiinide tootmist. Ovulatoorses faasis, kui  $E_2$  kontsentratsioon ületab teatud piiri, stimuleerib see läbi positiivse tagasiside mehhanismi GnRH ja gonadotropiinide tootmist, mis vallandab ovulatsiooni. Luteaalfaasis inhibeerivad  $E_2$  ja  $P_4$  taaskord läbi negatiivse tagasiside mehhanismi GnRH ja gonadotropiinide tootmist. Lühendid:  $E_2$  – östradiool, FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon, GnRH – gonadotropiini vabastav hormoon, LH – luteiniseeriv hormoon,  $P_4$  – progesteron. Joonis on kohandatud BioRender tarkvara abil (<https://courses.lumenlearning.com/>).

Ürgsed idurakud diferentseeruvad arenevas gonaadis esmalt oogoonideks, mis mitootiliste jagunemiste käigus muutuvad primaarseteks ootsüütideks ning sisenevad meioos I profaasi, kus jäävad indiviidi suguküpsuse saabumiseni diploteeni aresti. (Pepling, 2006) Selleks ajaks on primaarne ootsüüt ümbritsetud ühekihilise lameepiteeliga (pre-granuloosarakud), mis moodustab primordiaalse folliikuli. Puberteedi saabudes hakkavad osad primordiaalsed folliikulid vastusena hormonaalsele talitlusele kasvama ja lameepiteelist saab kõigepealt ühekihiline kuupepiteel ning moodustub primaarne folliikul. (Gougeon & Chainy, 1987) Ühekihilise kuupepiteeli rakud (nüüd juba granuloosarakud) läbivad mitootilisi jagunemisi ja moodustub mitmekihiline kuupepiteel, mille alla jääb glükovalkudest koosnev helevööde ehk *zona pellucida* ning moodustub sekundaarne ehk pre-antraalne folliikul. (Gougeon & Chainy, 1987; Prasad et al., 2000) Granuloosarakud jagunevad FSH toimel edasi (Yamoto et al., 1992) ja folliikuli ümber tekib teekarakkude kiht, mis organiseerub sisemiseks (sekretoorsed rakud) ja välimiseks kihiks (kihn) (Magoffin & Weitsman, 1994). Selles etapis moodustuvad ka follikulaarvedelikuga põiekesed, mis hiljem liituvad suuremaks antrumiks. Sellist folliikulit nimetatakse tertsiaarseks ehk antraalseks folliikuliks. (Angelucci et al., 2006) Antrumi osa suurenedes liigub arenev munarakk folliikuli ühte äärde ning tekib pre-ovulatoorne ehk Graafi folliikul (Holesh et al., 2024). Granuloosarakkude poolt toodetakse  $E_2$  ja selle tõusev kontsentratsioon (Moon et al., 1978) vallandab LH järsu tõusu ajuripatsist, mis stimuleerib primaarset ootsüüti lõpetama I meioosi, mille käigus tekib sekundaarne ootsüüt (siseneb meioos II, kuid jääb kuni viljastumiseni metafaasi aresti; alles viljastumisel viiakse meioos II lõpuni, mille käigus tekib küps munarakk) ja väike polaarkeha. LH ja proteaaside toimel lõhutakse Graafi folliikulisse avaus, mille kaudu pääseb sekundaarne ootsüüt koos follikulaarvedelikuga välja ning selle püüavad kinni munajuha narmad. (Thiyagarajan et al., 2024) Allesjäänud folliikulist moodustub kollaskeha, mis hakkab tootma  $P_4$  ja vähemal määral ka  $E_2$  (Allen & Corner, 1929). Kui viljastumist ei toimu, siis kollaskeha kärhub (tekib valkjaskeha),  $P_4$  tase langeb ja vallandub menstruatsioon (Thiyagarajan et al., 2024).

Paralleelselt ovariaaltsükliga toimub menstruaaltsükkel, mille kestuseks loetakse keskmiselt 28 päeva ning see jaguneb neljaks faasiks (Joonis 3): menstruaalfaas ehk menstruatsioon (1.-5. päev), proliferatiivne faas (6.-13. päev), ovulatoorne faas ehk ovulatsioon (14. päev) ja sekretoorne faas (15.-28. päev) (Thiyagarajan et al., 2024). Menstruaalfaasis on nii  $E_2$  kui ka  $P_4$  tasemed madalad, mis indutseerib endomeetriumi funktsionaalkihi lagunemise (nekroosi) ja irdumise koos verega. Proliferatiivses faasis stimuleerib tõusev  $E_2$  tase endomeetriumi

funktsionaalkihi arengut. (Pathare et al., 2023) Varajas-proliferatiivses faasis on endomeetriumi strooma kompaktne ning näärmed väikesed ja ümmargused, hilis-proliferatiivses faasis hakkavad näärmed suurenema ja muutuvad piklikuks ning endomeetrium muutub „kohevamaks“. Ovulatsioonijärgne  $P_4$  taseme järsk tõus käivitab emaka sekretoorse faasi, mil näärmed hakkavad tootma sekreeti, mis on vajalik endomeetriumi retseptiivsuse saavutamiseks. (Cooke et al., 2013) Kui viljastumist ei toimu, siis kollaskeha taandareneb ning lõpetatakse  $P_4$  süntees. Madal  $P_4$  tase käivitab endomeetriumi funktsionaalkihi lagunemise ning seeläbi menstruatsiooni ja tsükkel algab uuesti. Menstruaaltsükleid võib läbida naine oma elus ligikaudu 450 korda. (Thiyagarajan et al., 2024)



**Joonis 3. Menstruaal- ja ovariaaltsükkel.** Tsükli alguses on  $E_2$  tase madal, mis stimuleerib ajuripatsis FSH tootmist.  $E_2$  taseme tõus inhibeerib ajuripatsis FSH ja LH tootmist läbi negatiivse tagasiside mehhanismi, kuid ületades teatud kontsentratsiooni, hoopis vallandab ovulatsiooni ajal LH järsu tõusu läbi positiivse tagasiside mehhanismi. Tsükli teises pooles on domineerivaks hormooniks  $P_4$  ja vähemal määral  $E_2$ , mis hoiavad läbi negatiivse tagasiside mehhanismi FSH ja LH tasemeid madalal. Kui viljastumist ei toimu, toimub tsükli lõpus hormoonide järsk langus ja algab uus tsükkel. Menstruaaltsükkel jaguneb neljaks: menstruatsioon, proliferatiivne faas, ovulatsioon ja sekretoorne faas. Menstruatsiooni ajal indutseerivad madalad suguhormoonide tasemed endomeetriumi irdumise. Proliferatiivses faasis kasvab endomeetriumi funktsionaalkiht tõusva  $E_2$  toimele. Ovulatsiooni järel toodab sekretoorses faasis arenev kollaskeha palju  $P_4$ , mis on vajalik endomeetriumi morfoloogiliseks ja funktsionaalseks ettevalmistuseks raseduse jaoks. Kui viljastumist ei toimu, vallandub menstruatsioon. Ovariaaltsükli follikulaarfaasis alustavad küpsemist mitu folliikulit, kuid ainult üks, domineeriv folliikul, küpseb Graafi folliikuliks, millest vabaneb ovulatsiooni ajal sekundaarne ootsüüt. Luteaalfaasis areneb lõhkenud folliikulist kollaskeha. Kui viljastumist ei toimu, siis kollaskeha taandareneb ja tsükkel kordub. Lühendid:  $E_2$  – östradiol, FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon, LH – luteiniseeriv hormoon,  $P_4$  – progesteron. Joonise tegemiseks on kasutatud Rosalba Lopez’i šablooni BioRender-i tarkvaras.

#### 1.1.4 Viljatus

Viljatus on ülemaailmne terviseprobleem ja see mõjutab elu jooksul 17,5% täiskasvanud elanikkonnast (World Health Organization, 2023a). Viljatuks loetakse heteroseksuaalset paari, kes soovib saada lapsi, ei kasuta rasestumisvastaseid vahendeid ja elab regulaarset suguelu, kuid naispartner ei ole ühe aasta jooksul rasestunud. Viljatuse puhul on 35% juhtudest põhjus naisepoolne, 35% juhtudest mehepoolne ja 10-30% mõlemapoolne. (World Health Organization, 2023b) Naisepoolse viljatuse põhjuseks võivad olla häired reproduktiiv- ja endokriinsüsteemis, nt munajuhade mittetoimimisest tingitud ehk tubaarne viljatus (Hayflick & Moorhead, 1961), polütsüstiliste munasarjade sündroom (Dennett & Simon, 2015), endomeetriumi limaskestast esinemine väljaspool emakat ehk endometriosis (Bonavina & Taylor, 2022), endomeetriumi hüperplaasia ehk koevohamine (Li et al., 2017), emaka limaskestast polüübid (Carson & Kallen, 2021), Ashermani sündroom (Di Guardo et al., 2020) jne, aga ka elustiilist tulenevad valikud nagu suitsetamine, alkoholi tarbimine, üle- ja alakaalulisus, suguhaigused jpm (Hart, 2016; Van Heertum & Rossi, 2017). Olulist rolli mängib naiste viljatuse languses ka reproduktiivsüsteemi vananemine (Hart, 2016). Vananemisega seotud viljatuse suurimaks teguriks on munarakkude koguse ja kvaliteedi langus. Kvaliteedilanguse näitajateks on väiksem tõenäosus rasestuda, polüspermia (munaraku viljastamine mitme seemneraku poolt), digüünia (topeltkromosoomistikuga munarakk, mille viljastamisel tekkiv sügoot on triploidne) ja teised kromosomaalsed anomaaliad (nt Down'i sündroom), vigane rakujagunemine, häired kääviniidistikus, *zona pellucida* jäigastumine (Franasiak et al., 2014; Miao et al., 2009; Moghadam et al., 2022). Lisaks toimuvad vananemisega rasestumist ebasoosivad muutused suguhormoonide tootmises ja muutused endomeetriumis (peatükk 1.2.).

Kui viljatuse põhjus on teadmata, on teatud juhtudel võimalik rasedus siiski saavutada kunstliku viljastamise meetodikate abil. Tänapäeval saab edukalt välja valida kvaliteetsed embrüod või võib kasutada doonormunarakke, mis tihti aitavad oodatud rasedust saavutada (Melnick & Rosenwaks, 2018; Sacchi et al., 2019; Sanders et al., 2021). Vaatamata kvaliteetsete embrüote siirdamisele või doonormunarakkude kasutamisele õnnestub rasestumine eelkõige noorematel naistel ning vanemate naiste viljastumise protsent on madalam (Gupta et al., 2012; Sanders et al., 2021; Soares et al., 2005; Toner et al., 2002). Põhjuseid, miks vanemad naised väiksema tõenäosusega rasestuvad, alles uuritakse, kuid

olulisteks teguriteks on nii hormonaalsed, rakulised kui ka molekulaarsed muutused (peatükk 1.2.). Ka noorematel naistel ei pruugi viljastumine alati õnnestuda, sest implantatsiooni ebaõnnestumine võib olla seotud hoopis endomeetriumi retseptiivsuse häiretega, mille üheks näiteks on asünkroonne ehk nihkunud WOI (Sebastian-Leon et al., 2018). Nihkunud WOI-d on tänapäeval võimalik kindlaks teha testiga, mis analüüsib endomeetriumi retseptiivsuse markereid (Ruiz-Alonso et al., 2013), kuid alati ei lahenda ka see probleemi, mistõttu on oluline endomeetriumi retseptiivsust edasi uurida (Rubin et al., 2023).

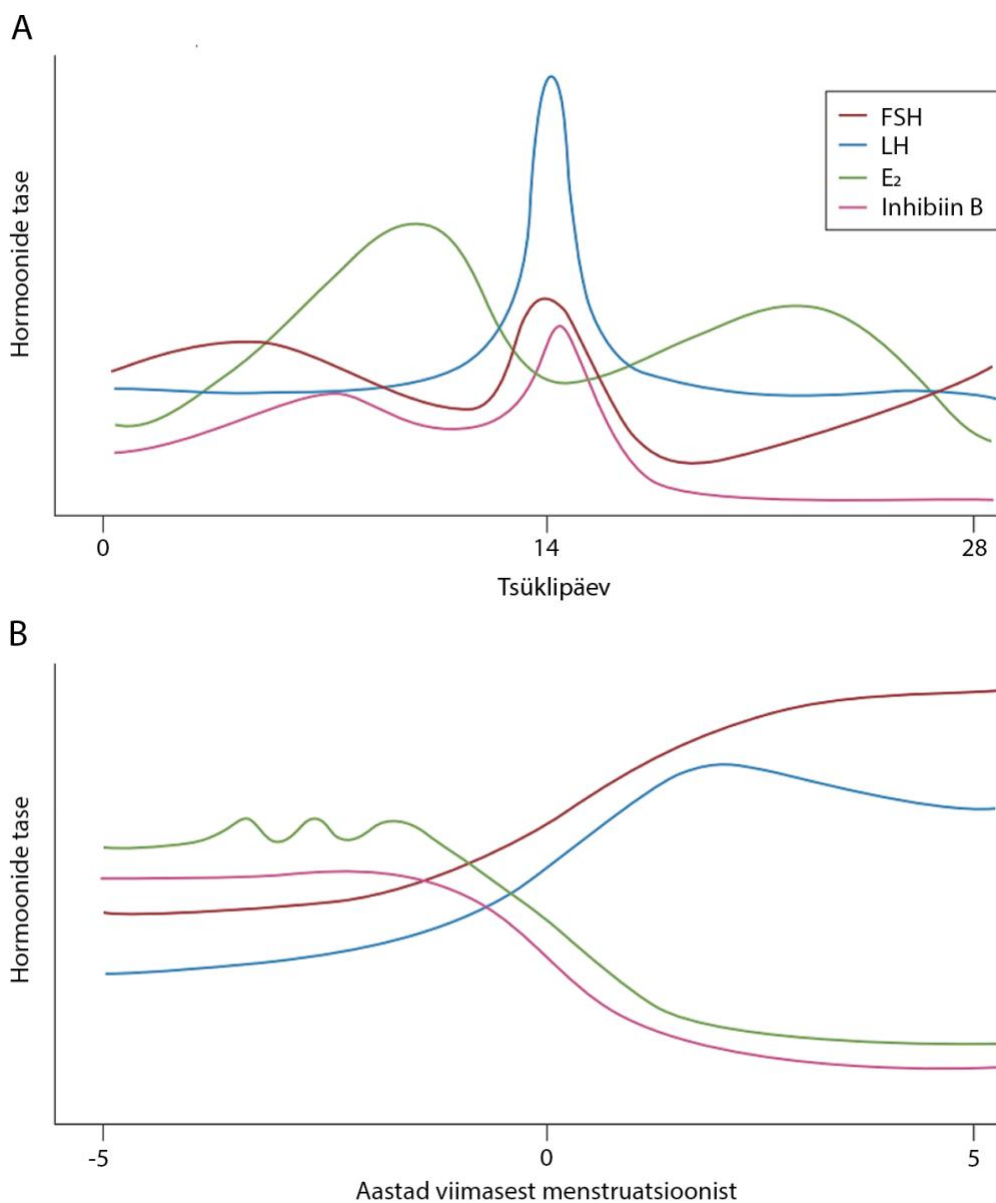
## **1.2. Naise reproduktiivsüsteemi vananemine**

### **1.2.1. Rakuvanemine**

Rakuvanemine (ingl. k. *cellular senescence*) on protsess, mille korral rakk lõpetab jagunemise, jäädes pöördumatult mitoosiaresti (Hayflick & Moorhead, 1961). Vananemist põhjustavad mitmed faktorid kumulatiivselt, nagu telomeeride lühenemine, DNA kahjustused, epigeneetilised muutused, onkogeenide aktivatsioon, oksüdatiivne stress, mitokondrite väärtahtlus (Di Micco et al., 2021). Vananemine mõjutab rakusiseselt mitmete organellide, sealhulgas ribosoomide, proteosoomide, mitokondrite ja lüsoosoomide funktsiooni, aga ka rakumembraani, rakutuuma morfoloogiat ja epigeneetikat. Siiski ei toimu vananemisega seotud muutused ainult rakusiseselt, vaid mõjutatud on ka rakuväline maatriks (ingl. k. *extracellular matrix* ehk ECM) ja naaberrakud. Vastusena DNA kahjustustele hakkavad vananenud rakud sekreteerima tsütokiine, kemokiine, proteaase ja kasvufaktoreid. Seda nähtust nimetatakse vananemisega seotud sekretoorseks fenotüübiks (ingl. k. *senescence-associated secretory phenotype* ehk SASP). (Borodkina et al., 2018) Rakuvanemine ei ole sama, mis organismi enda vananemine. SASP esineb terve elu vältel, sest see annab immuunsüsteemile märku, et vananenud rakud tuleb eemaldada ja asendada uutega. (Chemerinski et al., 2024) Organismi enda vananemisega kaasneb ka immuunsüsteemi nõrgenemine, mistõttu selliseid rakke ei eemaldata piisavalt ning need kuhjuvad, põhjustades koekahjustusi ja armistumist, häireid rakkudevahelistes signaalides (sh membraanireseptorite vähenemise kaudu) ja ECM-i väärtahtlust. (Borodkina et al., 2018)

### 1.2.2. Hormonaalsed muutused

Menstruaaltsükli jooksul, vastavalt tsükli faasidele, tõusevad ja langevad suguhormoonide tasemed nii noortel kui ka vanematel paljunemisvõimelistel naistel, kuid vanemaks saades hakkavad hormoonide tasemed ja menstruaaltsükli faaside pikkused muutuma (Joonis 4). Naise reproduktiivsüsteemi vananemise üheks osaks on munasarjades olevate folliikulite reservi kahanemine, mis hõlmab arenevate munarakkude arvu ja kvaliteedi langust (Park et al., 2021) Normaalse reservi korral alustab iga menstruaaltsükli ajal küpsemist mitu primordiaalset folliikulit, arenedes läbi follikulogeneesi antraalseteks folliikuliteks. Küpsevate folliikulite granuloosarakud toodavad peptiidhormooni inhibiin B, mis hoiab FSH taset läbi negatiivse tagasiside. (Welt & Schneyer, 2001) Naise vananedes ja folliikulite reservi kahanemisel langeb korraga küpsema hakkavate folliikulite arv, mis omakorda viib inhibiin B tootmise languseni (Danforth et al., 1998; Tinkanen et al., 2001). Seetõttu on täheldatud vanematel naistel menstruaaltsükli algusfaasis varajast FSH taseme tõusu, mis omakorda võib tõsta E<sub>2</sub> taset (Burger et al., 2002; Fitzgerald et al., 1994; Reyes et al., 1977). Sellest on tingitud lühem menstruaaltsükkel, sest FSH taseme varajane tõus lühendab follikulaarset faasi, mis tähendab ka kiiremat ovulatsiooni (Broom et al., 1981; Reame et al., 1996; Sherman & Korenman, 1975). Munasarjades toodetakse ka inhibiin A-d, kuid selle inhibeeriv mõju on võrreldes inhibiin B-ga väiksem. Inhibiin A-d toodetakse domineerivas folliikulis ja kollaskehas, mistõttu langeb selle tase alles ovulatsioonide lõppemisel. (Burger et al., 1998)



**Joonis 4. Hormoonide tasemete muutused normaalse menstruaaltsükli ja menopausi ajal. (A)** FSH, LH, E<sub>2</sub> ja inhibiin B tasemete muutused normaalse 28-päevase menstruaaltsükli ajal. FSH ja LH vabanevad hüpofüüsist, FSH stimuleerib munasarja folliikulites E<sub>2</sub> ja inhibiin B tootmist. E<sub>2</sub> ja inhibiin B omakorda reguleerivad negatiivse tagasiside kaudu FSH ja LH tootmist. **(B)** FSH, LH, E<sub>2</sub> ja inhibiin B tasemete muutused enne ja pärast menopausi. Enne menopausi, kui ovariaalne reserv on kahanenud, kuid mitte ammendunud, väheneb inhibiin B tootmine. See viib kõrgele FSH (ja LH) tootmiseni, mis omakorda hoiab või tõstab E<sub>2</sub> taset. Pärast menopausi, kui ovariaalne reserv on ammendunud, langeb E<sub>2</sub> ja inhibiin B tootmine ning ovulatsioon ega menstruaaltsükkel enam ei toimu. Munasarjade vähenenud tundlikkus FSH ja LH suhtes ning E<sub>2</sub> ja inhibiin B negatiivse tagasiside kadumine hüpofüüsile põhjustab kõrgele FSH ja LH tasemele. Lühendid: FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon, E<sub>2</sub> – östradiol, LH – luteiniseeriv hormoon. Joonis on kohandatud (Davis et al., 2015).

Lisaks munasarjadele toimuvad vanusest sõltuvad muutused ka hüpofüüsis endas (Davis et al., 2015; Wise, 1999). Kuigi E<sub>2</sub> tase võib olla isegi tõusnud, väheneb aja jooksul hüpofüüsi tundlikkus E<sub>2</sub> suhtes ja LH taseme järsud tõusud muutuvad korrapäraseks. Munasarjade reservi ammendumisel (menopausi saabumisel) langeb ovariaalse E<sub>2</sub> ja nii inhibiin A kui ka B tase ning menstruaaltsükkel ja ovulatsioon lakkavad. Kuna munasarjad ei reageeri enam gonadotropiinidele (FSH ja LH) ja ka hüpotaalamuse tundlikkus E<sub>2</sub> ja inhibiinide suhtes on

alanenud, on negatiivne tagasiside pärsitud ja seetõttu on postmenopausile omased kõrged GnRH, FSH ja LH tasemed. (Burger et al., 1998; Davis et al., 2015) Menopausi läbinud naistel on peamiseks östrogeeniks rasvkoest pärit  $E_1$ , mida toodetakse androsteendioonist (Grodin et al., 1973; Hetemäki et al., 2017). See-eest progesterooni tase on pärast menopausi väga madal, sest selle peamiseks allikaks on kollaskeha (Davis et al., 2015). Peale gonadotropiinide, östrogeeni, progesterooni ja inhibiinide on ovariaalse reservi kahanemisest mõjutatud ka anti-Müller hormoon (AMH), mida toodavad samuti granuloosarakud. AMH tase langeb naise vananedes pidevalt, mistõttu kasutatakse seda tihti munasarja reservi hindamiseks. (de Kat et al., 2016)

### **1.2.3. Muutused endomeetriumis**

Pikka aega arvati, et endomeetrium, olles suguhormoonidega reguleeritud iseuuev kude, ei vanane (Abdalla et al., 1997; Navot et al., 1994; Noci et al., 1995), kuid hilisemad uuringud on näidanud, et isegi doonormunaraku kasutamisel või embrüo sünnieelsel testimisel on implantatsiooni ebaõnnestumise risk vanuse kasvades suurem (Sanders et al., 2021; Soares et al., 2005; Toner et al., 2002), mis viitab, et põhjus võib peituda endomeetriumis. Naise vanuse kasvades toimuvad endomeetriumis muutused nii histoloogilisel, rakulisel kui ka molekulaarsel tasandil. Endomeetriumi paksus, mis on oluline implantatsiooni ajal ning on mõjutatud  $E_2$  ja  $P_4$  poolt, muutub tsükli käigus nii noortel kui ka vanematel naistel, olles kõige õhem pärast menstruatsiooni ja kõige paksem sekretoorse faasi keskpaigas. 1994. aastal teostatud uuringus leiti, et naistel vanuses 32-26 ja 37-45 eluaastat on maksimaalne endomeetriumi paksus sekretoorses faasis vastavalt 15,3 ja 15,9 mm, samas naistel vanuses 21-25 ja 26-31 oli see vastavalt 12,1 ja 13,4 mm. (Fitzgerald et al., 1994)

Muutuseid on leitud ka seoses endomeetriumi stroomarakkude ja detsidualisatsiooniga. Detsidualisatsioon on protsess, mis hõlmab morfoloogilisi ja funktsionaalseid muutusi endomeetriumi stroomas, et valmistada embrüo pesastumiseks ehk implantatsiooniks. Muuhulgas läbivad stroomarakud mesenhümaal-epiteliaalse ülemineku, reorganiseeritakse ECM, värvatakse immuunrakke ja toimub endomeetriumi varustamine veresoontega (Okada et al., 2018). Edukaks detsidualisatsiooniks on vajalik tasakaalu nihutamine pro-inflammatoorsuse suunas. Selleks on vaja nii normaalseid kui ka SASP tootvaid detsiiduarakke. (Lucas et al., 2020) Viimased sekreteerivad interleukiin-15, mis on oluline NK-rakkude

jõudmiseks endomeetriumis (Kitaya et al., 2000). NK-rakud on vajalikud detsiidua veresoontega varustamiseks ja platsenta arenguks (Jabrane-Ferrat, 2019). Lisaks on nende ülesandeks eemaldada SASP tootvad detsiiduarakud detsidualisatsiooni lõpus, nihutades tasakaalu anti-inflammatoorsuse suunas, et embrüo saaks implanteeruda (Brighton et al., 2017). Organismi vananedes on täheldatud, et seoses immuunsüsteemi ja seega NK-rakkude funktsiooni nõrgenemisega ei eemaldata vananenud rakke, mistõttu ei nihku tasakaal anti-inflammatoorsuse poole, põhjustades lõpuks implantatsiooni ebaõnnestumise (Brauning et al., 2022; Deryabin et al., 2020). Lisaks on hiirtes ja rottides täheldatud üleüldist vähenenud tundlikkust stiimulitele, mis on vajalikud detsidualisatsiooniks, põhjustades selle hilinemist ja/või häirumist (Ohta, 1987; Woods et al., 2017).

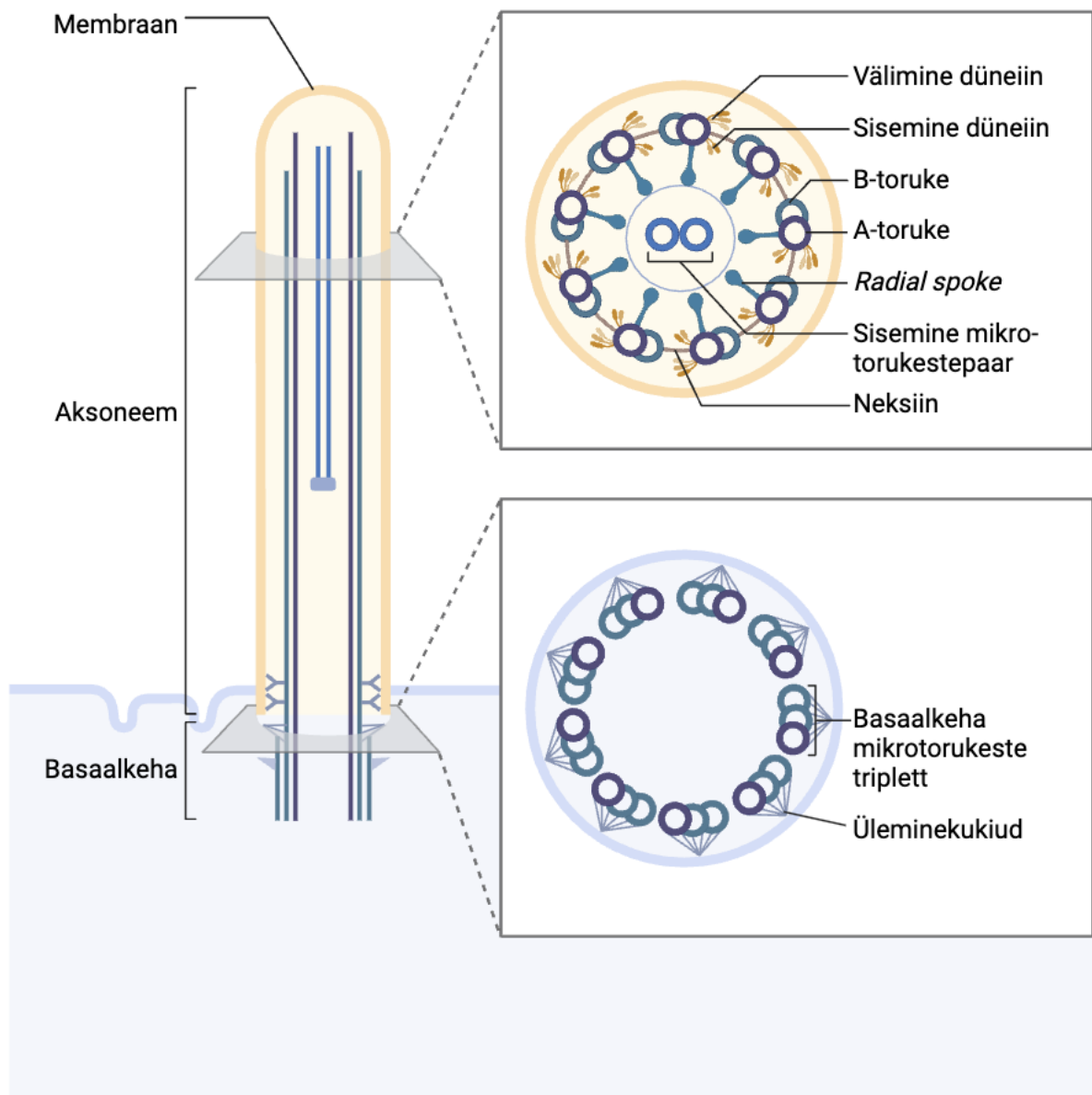
Peale endomeetriumi paksenemise ja strooma tasakaalu nihkumise inflammatoorsuse suunas on täheldatud ka epiteelirakkudel mikrovillide arvu, kuju ja jaotumise muutust (Mulholland & Jones, 1993). Muutused ei toimu ainult rakkudes, vaid ka ECM-is, kus E<sub>2</sub> taseme tõusust kuhjub kollageen (Mulholland & Jones, 1993), mis soodustab samuti põletikulist keskkonda (Wu et al., 2023). Mitmed muutused leiavad aset hoopis molekulaarsel tasandil geenide üles- või allaregulatsiooniga. Muuhulgas on leitud vanematel naistel ripsmete liikuvuse ja tsiliogeneesiga (ripsmete teke) seotud geenide ülesregulatsioon (Devesa-Peiro et al., 2022), kuid ei ole teada, kas see tuleneb ripsrakkude suuremast arvust või on geeniekspressiooni profiili erinevusest ühe raku piires. Samuti on leitud tõendeid endomeetriumi epigeneetilise vananemisest, kusjuures naise kronoloogiline vanus (määratud elatud aastatega) ja endomeetriumi bioloogiline vanus (määratud epigeneetilise mustri) on positiivses korrelatsioonis (Olesen et al., 2018). Siiski ei tähenda epigeneetilised muutused ainult vananemist, sest näiteks DNA metülatsoonimustri muutus toimub igas menstruaaltsükli ja on vajalik retseptiivsuse saavutamiseks (Kukushkina et al., 2017).

### **1.3. Endomeetriumi ripsrakud**

Ripse on membraaniga ümbritsetud raku pinnalt väljaulatuv struktuur, mille võib üldiselt jagada kaheks osaks: aksoneemiks ja basaalkühaks. Aksoneem on mikrotorukestest koosnev sümmeetriline struktuur ripsme keskosas. Aksoneem kinnitub basaalkühale, mis oma olemuselt on valkudega modifitseeritud tsentriool. (Satir & Christensen, 2007) Enamikel eukarüootsetel rakkudel on üksainus ripse, mida nimetatakse primaarseteks ehk

mitteliikuvateks ehk sensorseteks ripsmeteks, ning need on olulised olfaktorsete, visuaalsete ja mehaaniliste sensoritena (Singla & Reiter, 2006) ja mitmetes signaaliradades (Whewey et al., 2018). Lisaks primaarsetele ripsmetele esineb mõnedel rakutüüpidel korraka palju ripsmeid, mille funktsiooniks on liigutada nt lima, munarakku või liikvorit (pea- ja seljaajuvedelik) ning neid nimetatakse sekundaarseteks ehk liikuvateks ripsmeteks. Selliseid liikuvate ripsmetega rakke nimetatakse ripsrakkudeks ja neid leidub hingamisteedes, munajuhades, viimajuhakestes, endomeetriumis ja endomeetriumis. (Satir & Christensen, 2007)

Liikuva ripsme aksoneem koosneb üheksast mikrotorukese heterodimeerist – A- ja B-toruke, mis omakorda koosnevad  $\alpha$ - ja  $\beta$ -tubuliinist (Joonis 5). A- ja B-torukest eristab üksteisest nende diameeter. Liikuvates ripsmetes on heterodimeerid paigutatud ümber mikrotorukese dubleti, mistõttu nimetatakse liikuvate ripsmete aksoneemi ka 9+2 aksoneemiks. Iga heterodimeeriga on seondunud motoorvalk düneiin, mis paneb ripsme liikuma. Ripsmelööke kontrollivad heterodimeere omavahel ühendavad valgud neksiinid ja  $\alpha$ -tubuliiniga seotud „rattakodaraid meenutavad“ struktuurid (ingl. k. *radial spokes*). Primaarsete ripsmete aksoneem koosneb samuti üheksast mikrotorukese paarist, kuid keskelt on mikrotorukese puudu, mistõttu nimetatakse primaarsete ripsmete aksoneemi ka 9+0 aksoneemiks. Samuti on puudu düneiin ja „rattakodaraid meenutavad“ struktuurid, mistõttu ei ole primaarne ripsme liikuv. (Mizuno et al., 2012; Satir & Christensen, 2007)



**Joonis 5. Liikuva ripsme struktuur.** Ripse jaguneb aksoneemiks (väljaulatuv osa) ja basaalkhaks, mis ankurdatakse ripsme raku külge. Basaalkeha on tsentriool, koosnedes üheksast mikro-torukeste tripletist, mis on membraani külge kinnitatud üleminekukiududega. Aksoneemi moodustab üheksa mikro-torukeste heterodimeeri, mille keskel on mikro-torukeste dublett. Heterodimeerid koosnevad A- ja B-torukestest, mis omakorda koosnevad  $\alpha$ - ja  $\beta$ -tubuliinist. A- ja B-torukest eristab omavahel diameeter, kusjuures A-toruke on laiem. Heterodimeere ühendavad neksiinid. Iga A-toruke küljes on sisemine ja välimine düneiin, mis on oluline ripsme liikumiseks, ja „rattakodarat meenutav“ struktuur (ingl. k. *radial spoke*). Selline ripsme ehitus tagab ripsmelöögi tagant ette. Joonise tegemiseks on kasutatud Sally Kim'i šabloonit BioRender-i tarkvaras.

Primaarse ripsme tsiliogenees toimub enamasti rakutsükli  $G_1$ - või  $G_0$ -faasis ning ripse lagundatakse mitoosi ajaks, liikuvate ripsmetega rakud on epiteeli eellasrakkudest lõplikult diferentseerunud ega ole võimelised jagunema (Ishikawa & Marshall, 2011; Tasca et al., 2021). Ripsmete moodustumiseks ehk tsiliogeneesiks on vajalik kahesuunaline transpordisüsteem – viburisisene transport (ingl. k. *intraflagellar transport* ehk IFT), ripsme tippu ja sealt tagasi (Kozminski et al., 1993). Vajalikke valgumolekule transporditakse IFT kompleksidena, mida liigutavad mootorvalgud kinesiin (anterograadne transport ehk tippu suunas) (Cole et al., 1998)

ja tsütoplasmaatiline düneiin (retrograadne transport ehk tipust eemale) (Pazour et al., 1998). Liikuvate ripsmete tsiliogeneesis on oluline transkriptsioonifaktor *Forkhead box J1* (FOXJ1), mis reguleerib ripsmete ehitamise ja ankurdamisega seotud geenide ekspressiooni (Didon et al., 2013). *FOXJ1* väljalülitamisel ei moodustu ripsrakke (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998), mistõttu saab seda kasutada ripsrakkude markerina (Haider et al., 2019a). Ripsme stabiilsuse ja funktsiooni tagamiseks on eriti oluline aksoneemi  $\alpha$ -tubuliini lüsiin-40 (K40) atsetüleerimine (Shida et al., 2010; Wloga et al., 2017), olles seega samuti oluline ripsrakkude tuvastamise marker (Bonser et al., 2021; Yan et al., 2024). Kuna kõik ripsmed on raku külge ankurdatud basaalkahaga, on ka selle märgistamisega (nt LhS28-nimelise antikehaga) võimalik ripsrakke tuvastada (Comer et al., 1999; Horree et al., 2007).

Naistel leidub ripsrakke ka endomeetriumis, kuid erinevalt munajuhast on endomeetriumi epiteelis ripsrakke võrreldes sekretoorsete rakkudega vähem. Ripsrakkude osakaal nii luminaal- kui ka näärmeepiteelis muutub menstruaaltsükli jooksul, suurenedes kogu proliferatiivse faasi jooksul, saavutades ovulatoorses faasis 20% kõigist endomeetriumi epiteelirakkudest ning vähenedes pärast ovulatsiooni (Fleming et al., 1968; Haider et al., 2019b; Horree et al., 2007; Masterton et al., 1975; More & Masterton, 1976). Samuti on näidatud, et ripsrakkude teke on seotud östrogeeniga, kusjuures kõrgemat östrogeenitaset seostatakse rohkemate ripsrakkude esinemisega (Haider et al., 2019b; More & Masterton, 1976). Östrogeeni positiivne mõju ripsrakkude kasvule selgitab ka asjaolu, et post-menopausis naistel on ripsrakke kas väga vähe või puuduvad need täielikult (More & Masterton, 1976). See-eest progesteroonil on ripsrakkude tekkele negatiivne mõju (Andrews, 1951), mida kinnitab asjaolu, et sekretoorses faasis on neid kõige vähem (Masterton et al., 1975; More & Masterton, 1976).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Kuigi naiste 20. eluaastaid peetakse kõige viljakamateks, on tänapäeva modernses ühiskonnas pereplaneerimine lükkunud 30.-40. eluaastatesse, mistõttu vajatakse aina enam kunstliku viljastamise abi. Ehkki kaasaegsed tehnoloogiad võimaldavad välja valida kõige kvaliteetsemad munarakud või embrüod ning teostada hormoonasendusravi, tuleb arvestada, et suur osa viljatusprobleemidest on seotud endomeetriumi. Muutusi endomeetriumis on hakatud aina enam uurima molekulaarsel, rakulisel ja hormonaalsel tasemel nii terves organismis kui ka erinevate haiguste ja häirete puhul, kuid siiani on küllaltki vähe teada muutuste kohta, mis toimuvad naise ja tema endomeetriumi vananemisel. Devesa-Peiro *et al.* (2022) näitasid hiljuti, et vanematel naistel on endomeetriumis ülesreguleeritud ripsrakkude signaaliradade geenid, kuid ei ole teada, kas see on tingitud suurenenud ripsrakkude arvust või esinevad muutused ripsrakkude geeniekspressioonis. Tänapäevaks on olemas meetodid ripsrakkude uurimiseks mitmetes kudedes (nt hingamisteedes, munajuhades), kuid puudub tõhus meetod endomeetriumi ripsrakkude uurimiseks. Sellest tulenevalt on seatud antud magistr töö eesmärkideks:

1. Välja selgitada naise vanuse mõju endomeetriumi ripsrakkude arvukusele.
2. Arendada meetod endomeetriumi ripsrakkude geeniekspressiooni analüüsimiseks.

### 2.2. Materjalid ja meetodid

#### 2.2.1. Eetika, patsiendid ja proovid

Antud magistr töö raames läbiviidud teadustöö on kooskõlas kõigi vastavate eetiliste regulatsioonidega ja on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringu eetika komitee poolt (eetikaluba nr 340-12). Antud magistr töö raames kasutati immunohistokeemilise analüüsi jaoks eelnevalt kogutud biopsiaid anonüümsetelt viljatusprobleemidega naistelt, kellele oli emaka retseptiivsuse kinnitamiseks teostatud beREADY test 68 endomeetriumi retseptiivsuse markeriga (Meltsov *et al.*, 2023). Endomeetriumi biopsiad võeti Pipelle kateetriga (Laboratoire CCD, Prantsusmaa) progesterooni manustamise viiendal päeval (P+5), mis vastab implantatsiooniaknale, ja säilitati RNA*later* lahuses (Ambion, USA). Patsiendid jagati kahte gruppi: madalama reproduktiivse vanusega (*young maternal age* ehk YMA) grupp 20-27-aastaste (n=11, Tabel 1) ja kõrgema reproduktiivse vanusega (*advanced maternal age*

ehk AMA) grupp 47-50-aastaste naistega (n=11, Tabel 1). Kehamassiindeksid (KMI) ei erinenud gruppide vahel.

**Tabel 1. Immunohistokeemiliseks analüüsiks kasutatud patsientide andmed.**

Patsient	Grupp	Vanus (aastates)	KMI
YMA1	Noorem	26	30,3
YMA2	Noorem	25	23,53
YMA3	Noorem	23	23,23
YMA4	Noorem	20	23,11
YMA5	Noorem	24	27,64
YMA6	Noorem	26	28,36
YMA7	Noorem	26	24,38
YMA8	Noorem	24	24,62
YMA9	Noorem	27	20,3
YMA10	Noorem	27	26,2
YMA11	Noorem	23	17
AMA1	Vanem	49	23,71
AMA2	Vanem	49	23
AMA3	Vanem	47	22,32
AMA4	Vanem	47	19,38
AMA5	Vanem	47	28,34
AMA6	Vanem	48	23,88
AMA7	Vanem	50	18,9
AMA8	Vanem	47	20,08
AMA9	Vanem	50	19,33
AMA10	Vanem	47	24,69
AMA11	Vanem	48	27,24

Lühendid: AMA – kõrgem reproduktiivne vanus (ingl. k. *advanced maternal age*), KMI – kehamassiindeks, YMA – madalam reproduktiivne vanus (ingl. k. *young maternal age*)

Voolutsütomeetrilisel analüüsil ja fluorestsents-aktiveeritud sorteerimisel (FACS) kasutati nelja vabatahtliku naise endomeetriumi biopsiaid. Biopsiad võeti loomuliku tsükli (ei kasutatud hormoonasendusravi) LH kõrgtasemest loendades 1.-2. (LH+1-2) ja 7. päeval (LH+7). Biopsiad võeti Pipelle kateetriga ja külmutati aeglaselt krüolahuses (7,5% dimetüül sulfoksiid ehk DMSO, Sigma-Aldrich, Saksamaa; 20% FBS, Gibco, USA; *Antibiotic-Antimycotic* vahekorras 1:100, Gibco; DMEM/F-12, Gibco).

### 2.2.2. Immunohistokeemia

Endomeetriumi ripsrakkude visualiseerimiseks ja loendamiseks kasutati atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliini (Ac-Tub- $\alpha$ ) märgistamist immunohistokeemilise (IHC) meetodiga. Selleks kasutati eelnevalt kogutud endomeetriumi biopsiaid, mis sisestati parafiini. Esmalt dehüdreeriti

biopsiad kasvavas alkoholireas 50%, 60%, 70%, 80% 12 h tsüklitega ning 90%, 96% ja 100% 24 h tsüklitega. Sellele järgnes töötlus ksüleeniga 2x1,5 h lõpliku veetustamise saavutamiseks. Parafiniseerimise jaoks inkubeeriti biopsiaid 2x1,5 h puhtas parafiinis. Eelnevalt soojendatud roostevabast terasest sisestamisvormi lisati sisestusjaamas (Microm AP280) 60 °C parafiini, mille järel asetati biopsia sisestamisvormi, kaeti informatsiooniga märgistatud parafiinikasseti kaanega enne parafiini hangumist ning tõsteti 4 °C külmaplaadile jahtuma. Pärast jahtumist eemaldati sisestatud biopsia sisestamisvormist ja säilitati toatemperatuuril. Järgnevalt lõigati endomeetriumi mikrotoomiga (Thermo Scientific Microm HM355S) 4 µm paksused koelõigud, asetati need mikroskoobiklaasidele (Thermo Scientific Polysine Slides) ja lasti kuivada ning kinnituda 37 °C juures 24 h. Parafiinlõigud säilitati edasisteks katseteks 4 °C juures.

Parafiini eemaldamiseks lõikudelt asetati klaasid 15 minutiks ksüleeni. Seejärel asetati klaasid 3 minutiks 96% etanooli ning siis 3 minutiks 90% etanooli. Edasi vähendati etanooli kontsentratsiooni 50%-ni, hoides klaase igas lahuses 2 minutit ja viimasena asetati klaasid ddH<sub>2</sub>O (MQ; Millipore, Saksamaa) 2-5 minutiks. Antigeeni taastamiseks valmistati 10 mM Na-tsitraadi lahus (pH 6,0) ning inkubeeriti klaase 98 °C juures 20 minutit mikrolaineahjus madalal võimsusel. Seejärel lasti lahusel koos klaasidega 20 minutit toatemperatuuril jahtuda. Järgnevalt pesti klaase 2x5 minutit 1x Tris-puhverdatud soolalahusega (TBS; Fisher Bioreagents, USA) ning teostati 3,3'-diaminobensidiiniga (DAB) värvimine vastavalt *Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase) (Incl. DAB Chromogen) Kit'i* (Master Diagnostica, Hispaania) tootja protokollile. Kasutatud primaarsed antikehad on välja toodud Tabelis 3. Tuumade märgistamiseks kasutati hematoksüliini (Chem-Lab, Belgia), mida lahjendati ddH<sub>2</sub>O-ga vahekorras 1:4. Negatiivse kontrollina kasutati koelõike, kuhu ei lisatud primaarset antikeha. Klaasid koepreparaatidega skaneeriti Leica SCN400 skanneriga (Leica Biosystems, Saksamaa), kasutades 40x objektiivi.

### **2.2.3. Immunofluorestsentsanalüüs**

Immunofluorestsentsanalüüsi (IF) jaoks kasutati juhuslikult valitud patsientide proove Tabelist 1. Ac-Tub-α ja FOXJ1 ning ripsrakkude basaalkude ja FOXJ1 kolokaliseerimiseks märgistati need fluorofooriga konjugeeritud antikehadega. Selleks toimiti kuni antigeeni taastamise etapini (kaasa arvatud eelnevalt (peatükk 2.2.2.) kirjeldatud viisil. Koelõikudele lisati

permeabiliseerimislahus (0,1% Triton X-100 lahustatuna 1x PBS-is) ja inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit. Lõike pesti 2x5 minutit 1x TBS-iga. Seejärel kaeti koelõigud blokeerimislahusega (5% kitseseerum, Gibco, ja 1% BSA, Sigma-Aldrich, lahustatuna 1x PBS-is) ja inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit. Lõike pesti 2x5 minutit 1x TBS-iga. Lõigud kaeti primaarse antikeha lahusega (Tabel 3) ja inkubeeriti üleöö 4 °C juures. Järgmisel päeval pesti lõike 2x5 minutit 1x TBS-iga ja inkubeeriti üks tund pimedas sekundaarsete antikehade lahuses (1% BSA/PBS), mis sisaldas Alexa Fluor 488-ga konjugeeritud kitse päritolu hiirevastast sekundaarset antikeha lahjendusega 1:1000 (Abcam) ja Alexa Fluor 594-ga konjugeeritud kitse päritolu küülikuvastast sekundaarset antikeha (Abcam) lahjendusega 1:1000. Seejärel pesti neid 2x5 minutit 1x TBS-iga ja 1x5 minutit 1x PBS-iga. Tuumade visualiseerimiseks märgistati need DAPI-ga (4',6-diamidino-2-fenüülindool; Sigma-Aldrich; Tabel 3), lahjendusega 1:1000 1x PBS-is, mida hoiti klaasidel 3 minutit. Seejärel pesti 1x PBS-ga 2x5 minutit ja 1x5 minutit ddH<sub>2</sub>O-ga. Fluorestsentsi säilitamiseks sulundati preparaadid Fluoromount-G (Invitrogen, USA) sulunduspalsamiga ja kaeti katteklasisga, mille servade kinnitamiseks kasutati läbipaistvat küünelakki.

#### **2.2.4. Voolutsütomeetriline analüüs**

**Rakususpensiooni valmistamine:** Voolutsütomeetriliseks analüüsiks kasutati vedellämmastikus säilitatud tervete noorte naiste endomeetriumi biopsiaid, mida soojendati 37 °C juures sulamiseni. Koematerjali pesti 5 ml Advanced DMEM (A-DMEM; Gibco) söötmega, lasti põhja sadeneda, eemaldati supernatant ja korrati pesu. Pärast supernatandi eemaldamist koematerjal tükeldati skalpellidega ning lisati 1,25 ml kollagenaasi (20 µg/µl, Sigma-Aldrich), 1 ml dispaasi (10 µg/µl; Gibco), 1 ml DNAas I (20 µg/µl; ITW Reagents, Saksamaa) ja A-DMEM sööd 5 ml mahu täitumiseni. Proovi inkubeeriti loksutil 37 °C juures 30 minutit. Seejärel filtreeriti supernatant läbi 40 µm nailonist rakusõela (Fisherbrand, USA) ja sõela pesti ensüümide inhibeerimiseks kaks korda A-DMEM söötmega. Sõelale jäänud materjal lisati tagasi allesjäänud koematerjalile ning lisati 625 µl kollagenaasi, 1 ml dispaasi, 1 ml DNAas I ja A-DMEM sööd 5 ml mahu täitumiseni. Proovi inkubeeriti loksutil 37 °C juures 30 minutit, suspendeerides iga 5 minuti järel. Pärast inkubatsiooni filtreeriti materjal läbi 40 µm rakusõela eelnevalt saadud rakufraktsiooniga samasse tuubi ja sõela pesti A-DMEM söötmega. Rakususpensiooni tsentrifugiti 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant. Seejärel lisati 500 µl veise loote seerumit (FBS, Gibco) ja 12 ml ACK lüüsi puhvrit (Gibco) erütrotsüütide

eemaldamiseks ning tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g). Supernatant eemaldati, sade resuspendeeriti 500 µl 5% FBS/PBS lahuses ja tõsteti ümber Protein LoBind (Eppendorf) tuubi. Tuubi tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ja eemaldati supernatant. Sade resuspendeeriti 1 ml külmas 5% FBS/PBS lahuses ja filtreeriti läbi 50 µm filtri (CellTrics). Tuubi tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ja eemaldati supernatant. Rakusiseste markerite, nagu transkriptsioonifaktorite analüüsimiseks voolutsütomeetriaga kasutati rakkude fikseerimiseks formaliinipõhist või tsinkfiksaatorit. Rakkude sorteerimiseks rakusiseste markerite abil kasutati tsinkfiksaatorit, mis võimaldab säilitada RNA-d (Lykidis et al., 2007). Rakkude analüüsimiseks ja sorteerimiseks pinnamarkerite abil (nt EpCAM) kasutati rakkude märgistamist ilma fikseerimata. Erandina ei fikseeritud rakke endomeetriumi ripsrakkude basaalkelhade märgistamiseks.

**Fikseerimine formaliiniga:** Voolutsütomeetria analüüsi jaoks fikseeriti endomeetriumi rakud formaliiniga, lisades 1 ml 1x *Foxp3/Transcription Factor Fix/Perm Concentrate* (kontsentraat lahjendatud 1x *Foxp3/Transcription Factor Fix/Perm Diluent* lahusega vahekorras 1:4; Proteintech, Saksamaa) töölahust ja inkubeeriti pimedas 60 minutit. Tuube tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant. Rakke pesti 1 ml 1x *Flow Cytometry Perm Buffer* (lahjendatud ddH<sub>2</sub>O-ga vahekorras 1:10; Proteintech, Saksamaa) töölahusega tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant.

**Fikseerimine tsinkfiksaatoriga:** RNA analüüsiks sorteeritud rakkude fikseerimiseks lisati rakkudele vastavalt sademe kogusele 1-10 ml külma 1x *Zinc Fixative (Formalin Free)* (lahjendatud ddH<sub>2</sub>O-ga vahekorras 1:10; BD Biosciences, USA) lahust ja 30-300 µl 5% FBS/PBS lahust ning inkubeeriti jääl 2 tundi. Seejärel tuube tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant. Rakke pesti 1 ml 5% FBS/PBS lahusega, tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant. Rakkude permeabiliseerimiseks lisati neile 1-10 ml 1x *Flow Cytometry Perm Buffer* töölahust ja inkubeeriti pimedas 60 minutit. Pärast inkubatsiooni tsentrifuugiti tuube 5 minutit (RT, 300 g) ning eemaldati supernatant. Seejärel rakud märgistati ilma eelneva pesuta.

**Fikseerimata rakkude märgistamine SiR-tubuliini ja EpCAM-vastase antikeha või LhS28-ga:** Endomeetriumi ripsrakkude märgistamiseks rakke fikseerimata kasutati SiR-tubuliini ja epiteeliraku adhesioonimolekuli (*epithelial cell adhesion molecule* ehk EpCAM) vastast

antikeha. Ka ripsrakkude basaalkhade määrgistamiseks antikehaga LhS28 jäeti rakud fikseerimata. Suspenderitud rakkudele lisati SiR-tubuliini (Spirochrome) ja verapamiili (Spirochrome) (Tabel 3). SiR-tubuliin on rakumembraani läbiv  $\alpha$ -tubuliini määrgistav sond, mis koosneb fluorogeensest silikoonrodamiinist (SiR) ja doksetakseelist. Verapamiili eesmärgiks on inhibeerida rakupumbad, mis võivad vastasel juhul SiR-tubuliini rakust välja pumbata ja põhjustada nõrka signaali. Rakke inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit, tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ja eemaldati supernatant. Seejärel pesti rakke 500  $\mu$ l 5% FBS/PBS lahusega, tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ja eemaldati supernatant. EpCAM-ide määrgistamiseks lisati rakkudele EpCAM-vastast antikeha (Abcam, Suurbritannia), basaalkhade määrgistamiseks LhS28 (Santa Cruz Biotechnology, USA) (Tabel 3). Rakke inkubeeriti 4 °C juures 30 minutit, tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g) ja eemaldati supernatant. Kui ei järgnenud fikseerimist, resuspendeeriti sade 100-500  $\mu$ l 1x PBS-is, inkubeeriti jääl 15 minutit, filtreeriti läbi 50  $\mu$ m filtri ja hoiti jääl kuni analüüsini.

**Fikseeritud rakkude määrgistamine Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastaste antikehadega:** Ac-Tub- $\alpha$  ja transkriptsioonifaktori FOXJ1 määrgistamiseks fikseeritud rakkudes kasutati Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastast antikeha. Formaliini või tsinkfiksaatoriga fikseeritud rakkudele lisati 500  $\mu$ l primaarsete antikehade lahust (Tabel 3) ja inkubeeriti pimedas üks tund. Seejärel tuube tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g), eemaldati supernatant, pesti 1 ml 1x *Flow Cytometry Perm Buffer* lahusega (lahjendatud ddH<sub>2</sub>O-ga vahekorras 1:10) ja korrati tsentrifuugimist. Pärast supernatandi eemaldamist inkubeeriti rakke üks tund pimedas sekundaarsete antikehade lahuses (1x *Flow Cytometry Perm Buffer*), mis sisaldas Alexa Fluor 488-ga konjugeeritud kitse päritolu hiire- või küülikuvastast sekundaarset antikeha lahjendusega 1:500 (Abcam) ja Alexa Fluor 647-ga konjugeeritud kitse päritolu hiirevastast sekundaarset antikeha (Abcam) lahjendusega 1:500. Seejärel tuube tsentrifuugiti 5 minutit (RT, 300 g), eemaldati supernatant, pesti 1 ml 1x *Flow Cytometry Perm Buffer* lahusega, korrati tsentrifuugimist ja eemaldati supernatant. Rakud resuspendeeriti 100-500  $\mu$ l 1x *Flow Cytometry Perm Buffer* lahuses, filtreeriti läbi 50  $\mu$ m filtri ja hoiti jääl kuni analüüsini.

**Tabel 2. Ülevaade läbiviidud voolutsütomeetristest analüüsides.**

Analüüsi jrk nr	Viide	Kasutatud sond või antikeha	Lisainformatsioon
I	Joonis 9 Lisa 3	1 $\mu$ M SiR-tub EpCAM	Lisatud verapamiil
II	Joonis 10 Lisa 4	0,2 $\mu$ M SiR-tub 2 $\mu$ M SiR-tub EpCAM	Ühele proovile lisatud verapamiil, et võrrelda verapamiilita proovidega
III	Joonis 10 Lisa 4	0,01 $\mu$ M SiR-tub 0,004 $\mu$ M SiR-tub	Verapamiil ja EpCAM välja jäetud
IV	Lisa 5	Anti-Ac-Tub- $\alpha$ Anti-FOXJ1	Fikseeritud formaliiniga; kasutatud konjugeeritud ja konjugeerimata Ac-Tub- $\alpha$ - vastast antikeha ning mono- ja polükloonaalset FOXJ1-vastast antikeha
V	Joonis 11 Lisa 6	Anti-Ac-Tub- $\alpha$ Anti-FOXJ1	Fikseeritud tsingiühenditega; kasutatud konjugeeritud ja konjugeerimata Ac-Tub- $\alpha$ -vastast antikeha ning mono- ja polükloonaalset FOXJ1-vastast antikeha
VI	Joonis 12 Lisa 7	SiR-tub LhS28	Eraldi SiR-tubuliini ja LhS28-ga märgistatud rakud
VII	Joonis 12 Lisa 7	SiR-tub LhS28	Nii SiR-tubuliini kui ka LhS28-ga märgistatud rakud

Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, SiR – silikoonrodamiin, SiR-tub – SiR-tubuliin.

**Tabel 3. Rakkude märgistamiseks kasutatud primaarsed antikehad, sondid ja muud molekulid.**

Antikeha/Sond/ Värv/Molekul	Loom	Kontsentratsioon/ Lahjendus	Lahusti	Tootja	Sihtmärkrakud tootja kohaselt
<b>IHC paneel</b>					
Anti-Ac-Tub- $\alpha$	Hiir	1:5000	1% BSA/PBS	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakud
<b>IF paneel</b>					
Anti-Ac-Tub- $\alpha$	Hiir	1:5000	1% BSA/PBS	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakud
Anti-FOXJ1	Küülik	1:150	1% BSA/PBS	Atlas Antibodies	Ripsrakud
LhS28	Hiir	1:250	1% BSA/PBS	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakkude basaalkesed
<b>Voolutsütomeetria analüütiline paneel</b>					
Ac-Tub- $\alpha$	Hiir	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakud
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Hiir	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakud
Anti-FOXJ1	Küülik	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Atlas Antibodies	Ripsrakud
Anti-FOXJ1	Hiir	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Invitrogen	Ripsrakud
LhS28	Hiir	1:200	5% FBS/PBS	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakkude basaalkesed
SiR-tubuliin	—	0,004-2 $\mu$ M	A-DMEM	Spirochrome	Ripsrakud
Anti-EpCAM	Hiir	20 $\mu$ l/test	5% FBS/PBS	Abcam	Epiteelirakud
Verapamiil	—	10 $\mu$ M	A-DMEM	Spirochrome	Raku väljavoolupumbad
<b>Sorteerimise paneel</b>					
Anti-Ac-Tub- $\alpha$	Hiir	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakud
Anti-FOXJ1	Küülik	1:200	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i>	Atlas Antibodies	Ripsrakud
LhS28	Hiir	1:200	5% FBS/PBS	Santa Cruz Biotechnology	Ripsrakkude basaalkesed
SiR-tubuliin	—	1 $\mu$ M	A-DMEM	Spirochrome	Ripsrakud
DAPI	—	0,5 $\mu$ g/ml	<i>Flow Cytometry Perm Buffer</i> või 5% FBS/PBS	Sigma-Aldrich	Surnud rakud

Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, A-DMEM – *Advanced* DMEM (sööde), AF – Alexa Fluor, BSA – veise seerumi albumiin, DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool, EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul, FBS – veise loote seerum, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, IF – immunofluorestsents(i), IHC – immunohistokeemia, PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus, SiR – silikoonrodamiin.

### 2.2.5. Fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine

Rakkude sorteerimiseks valmistati peatükis 2.2.4. kirjeldatud viisil raku suspensioon. Esimese sorteerimise jaoks fikseeriti Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastaste antikehadega märgistatud rakud eelnevalt tsinkfiksaatoriga. SiR-tubuliiniga märgistatud rakke ei fikseeritud ja kasutati positiivse kontrollina, kusjuures sorteeriti ainult elusaid (DAPI-negatiivseid) rakke. Selleks lisati rakkudele enne sorteerimist 0,5  $\mu$ l/ml DAPI-t ja inkubeeriti 3-5 minutit. Teistkordsel sorteerimisel märgistati fikseerimata rakud SiR-tubuliini ja LhS28-ga (Tabel 3) ja sorteeriti vaid elusaid rakke. Voolutsütomeetriline analüüs ja rakkude sorteerimise viidi läbi masinaga FACS Aria I (BD Biosciences). Kõikides katsetes kasutati FACSFlow lahust (BD Biosciences). Alexa Fluor 488 värvi ergastati 488 nm laseriga ja signaal tuvastati 530/30 optilise filtriga. Alexa Fluor 647 ergastati 633 nm laseriga ja signaal tuvastati 660/20 optilise filtriga. DAPI-t ergastati 406 nm laseriga ja signaal tuvastati 450/40 filtriga. Rakud sorteeriti *Smart-Seq mRNA LP User Manual* (Takara Bio, USA) protokollis väljatoodud *CDS Sorting Solution* lahusesse.

### 2.2.5. RNA sekveneerimine

Sorteeritud rakkude mRNA sekveneerimiseks valmistati raamatukogu *SMART-Seq LP User Manual* (Takara Bio, USA) protokollil alusel. Selleks sünteesiti kogu mRNA-st cDNA ahelad, mida seejärel amplifitseeriti. Amplifitseeritud cDNA puhastati magnetkerakestega (Mag-Bind; Omega Bio-tek, USA) ning sellest valmistati cDNA raamatukogu, mida samuti amplifitseeriti ja puhastati. Raamatukogu sekveneeriti NextSeq 1000 (Illumina, USA) sekvenaatoriga.

### 2.2.6. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Sekveneerimistulemuste kinnitamiseks teostati kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kahele geenile: *TUBA1A* (kodeerib  $\alpha$ -tubuliini isovormi 1a) ja *FOXJ1* (kodeerib tsiliogeneesi olulist transkriptsioonifaktorit). 20  $\mu$ l lõppmahuga reaktsioonisegu sisaldas 1x *HOTFIREPol EvaGreen qPCR SuperMix* (Solis BioDyne) segu, 125 nM pärisuunalist (ingl. k. *forward* ehk FWD), 125 nM vastassuunalist (ingl. k. *reverse* ehk REV) praimerit (TAG Copenhagen, Taani; Tabel 4), 3  $\mu$ l cDNA-d ja ddH<sub>2</sub>O-d mahu täitumiseni. qPCR viidi läbi masinaga CFX Opus 96 (BioRad Laboratories, USA). DNA polümeraasi aktiveerimine toimus 95 °C juures 12 minutit. DNA denatureerimine toimus 95 °C juures 15 sekundit. Praimerite

seondumine viidi läbi 60 °C juures 20 sekundit. DNA ekstensioon toimus 72 °C juures 20 sekundit. Amplifitseerimise lõppedes mõõdeti produktide sulamistemperatuur.

**Tabel 4. qPCR-il kasutatud praimerid.**

Geen	Praimeri suund	Praimeri järjestus (5'-3')	Produkti oodatav sulamistemperatuur (°C)
<i>TUBA1A</i>	FWD	AACTATGCCCGAGGGCACT	85-87
	REV	AGAAGCCCTGGAGACCCG	
<i>FOXJ1</i>	FWD	CGAGGCACTTTGATGAAGC	75-78
	REV	ACAAGTGGATCACGGCAACTT	

Lühendid: FWD – pärisuunaline (ingl. k. *forward*), qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon, REV – vastassuunaline (ingl. k. *reverse*).

### 2.2.7. Andmete analüüs

IHC analüüsist saadud skaneeritud koelõikude LE tükid piiritleti käsitsi roheline joonega, et programm (peatükk 2.2.8.) saaks välja arvutada pindala (Lisa 1, Joonis L1). Ripsrakud loendati „count“ funktsiooniga, vajutades iga ripsraku peale, et ilmuks ristike koos järjekorranumbriga. Arvutamaks ripsrakkude arvu  $\mu\text{m}^2$  LE kohta jagati ripsrakkude summa LE pindala summaga. IHC katsest saadud andmete statistiliseks analüüsiks kasutati Student'i paaritut t-testi. Statistiliselt oluliseks arvestati p-väärtused, mis jäid alla 0,05 ( $p < 0,05$ ). Voolutsütomeetriliste andmete analüüsiks kasutati tarkvara FACSDiva (versioon 6.3.1., BD Biosciences). Sekveneerimistulemuste FASTQ formaati saamiseks kasutati tarkvara DRAGEN (Illumina). Järgnevalt kasutati sekveneerimistulemuste töötlemiseks programmeerimiskeele R-i tarkvara ja selle pakette. Sekveneerimistulemustele teostati kvaliteedikontroll FastQC-ga, seejärel neid eeltöödeldi Fastp-ga (eemaldati adapterid, filtreeriti ja kärbiti lugemeid) ja joondati STAR-i abil referentsgenoomiga (GRCh38, Ensembl). Joondatud lugemid sorteeriti välja Samtools paketiga. Lugemid loendati FeatureCounts tarkvaraga ja tulemus normaliseeriti kahel moel: arvutades edgeR paketi abil välja iga geeni transkriptide arvu miljoni transkripti kohta (ingl. k. *transcripts per million* ehk TPM) ja kasutades DESeq2 paketti. Kõik geenid, mille TPM > 2, loeti ekspresseerunuks, TPM < 2 jäeti analüüsist välja. Sekveneerimistulemuste analüüs teostati dr. Vijayachitra Modhukur'i kaasabil.

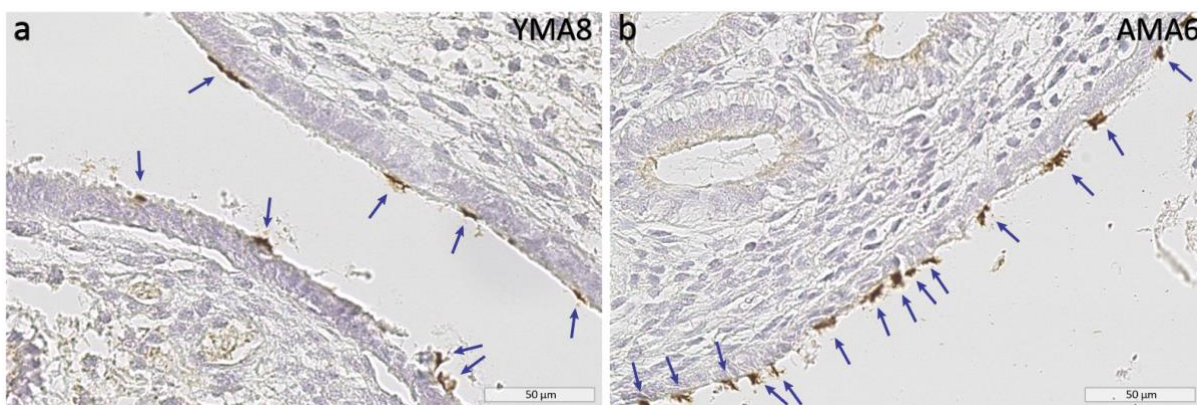
## 2.2.8. Kasutatud programmid

IHC meetodil visualiseeritud ripsrakkude loendamiseks ja luminaalepiteeli pindala mõõtmiseks kasutati programmi Aperio ImageScope (versioon 12.4.6, Leica Biosystems, Saksamaa; Lisa 1, Joonis L1). IF meetodil märgistatud koelõigud pildistati programmiga Cell<sup>^</sup>B (versioon 3.4, Olympus). Jooniste tegemisel kasutati programme Adobe Photoshop (Adobe), Adobe Illustrator (Adobe), Prism 10 (Dotmatics), BioRender (<https://www.biorender.com/>), veebitööriista Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) lehel ja/või veebitööriista gProfiler (Kolberg et al., 2023).

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Endomeetriumi ripsrakkude analüüs nooremate ja vanemate naiste endomeetriumis

Endomeetriumi ripsrakkude tuvastamiseks nooremate naiste (YMA, n=11; Tabel 1) ja vanemate naiste (AMA, n=11; Tabel 1) koelõikudel märgiti need immunohistoloogilise meetodiga, kasutades Ac-Tub- $\alpha$ -vastaseid antikehi ning DAB värvusreaktsiooni (Joonis 6). Koelõikude preparaadid skaneeriti ja ripsrakud loendati programmiga Aperio ImageScope.



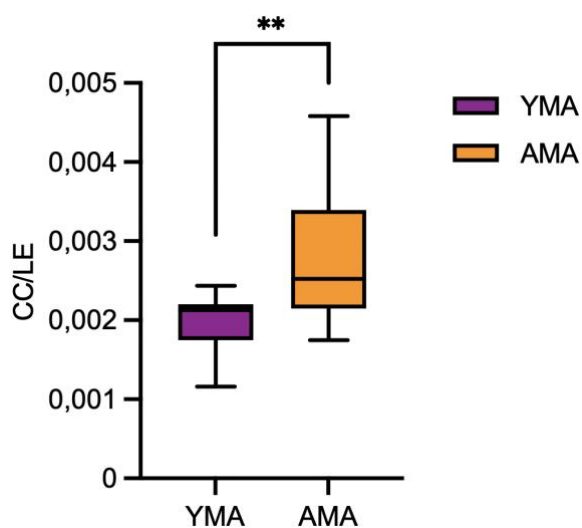
**Joonis 6. Endomeetriumi ripsrakkude immunohistokeemiline analüüs nooremate ja vanemate naiste luminaalepiteelis.** Ripsrakkude tuvastamiseks on kasutatud Ac-Tub- $\alpha$ -vastast antikeha, mis on märgistatud DAB kromogeeniga (pruun). Kokku analüüsiti 11 YMA ja 11 AMA endomeetriumi biopsiat. Joonisel on välja toodud kummastki grupist üks esinduslik proov: **a** nooremast grupist (YMA8) ja **b** vanemast grupist (AMA6). Siniste nooltega on tähistatud ripsrakkude ripsmed (pruun). Mõõtskaala: 50  $\mu$ m. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin; AMA – kõrgem reproduktiivne vanus (ingl. k. *advanced maternal age*), YMA – madalam reproduktiivne vanus (ingl. k. *young maternal age*).

Immunohistoloogilise analüüsi tulemusena selgus, et noortel naistel (tähistatud YMA1-YMA11) oli ripsrakkude tihedus ühe  $\mu\text{m}^2$  endomeetriumi luminaalepiteeli (LE) kohta (keskmiselt  $0,00197 \pm 0,00012$  ripsrakku/ $\mu\text{m}^2$ ) statistiliselt oluliselt ( $p < 0,01$ ) väiksem kui vanematel naistel (tähistatud AMA1-AMA11), kellel oli see  $0,00279 \pm 0,00025$  ripsrakku/ $\mu\text{m}^2$  (Tabel 5, Joonis 7). Seega oli vanematel naistel ühel  $\mu\text{m}^2$  luminaalepiteeli kohta keskmiselt  $0,00082$  (41,6%) ripsrakku rohkem ( $p = 0,007201$ ). Vanematel naistel jäi ripsrakkude arv vahemikku  $0,00175$ - $0,00458$ , noortel naistel vahemikku  $0,00116$ - $0,00244$  (Joonis 7).

**Tabel 5. Keskmise ripsrakkude arv  $\mu\text{m}^2$  endomeetriumi luminaalepiteeli kohta noorematel ja vanematel naistel.**

YMA		AMA	
Patsient	CC/LE	Patsient	CC/LE
YMA1	0,00190	AMA1	0,00346
YMA2	0,00175	AMA2	0,00315
YMA3	0,00244	AMA3	0,00175
YMA4	0,00219	AMA4	0,00228
YMA5	0,00116	AMA5	0,00250
YMA6	0,00238	AMA6	0,00215
YMA7	0,00214	AMA7	0,00339
YMA8	0,00136	AMA8	0,00200
YMA9	0,00220	AMA9	0,00458
YMA10	0,00199	AMA10	0,00252
YMA11	0,00213	AMA11	0,00291
<b>keskmine</b>	<b>0,00197</b>	<b>keskmine</b>	<b>0,00279</b>
<b>SEM</b>	<b>0,00012</b>	<b>SEM</b>	<b>0,00025</b>

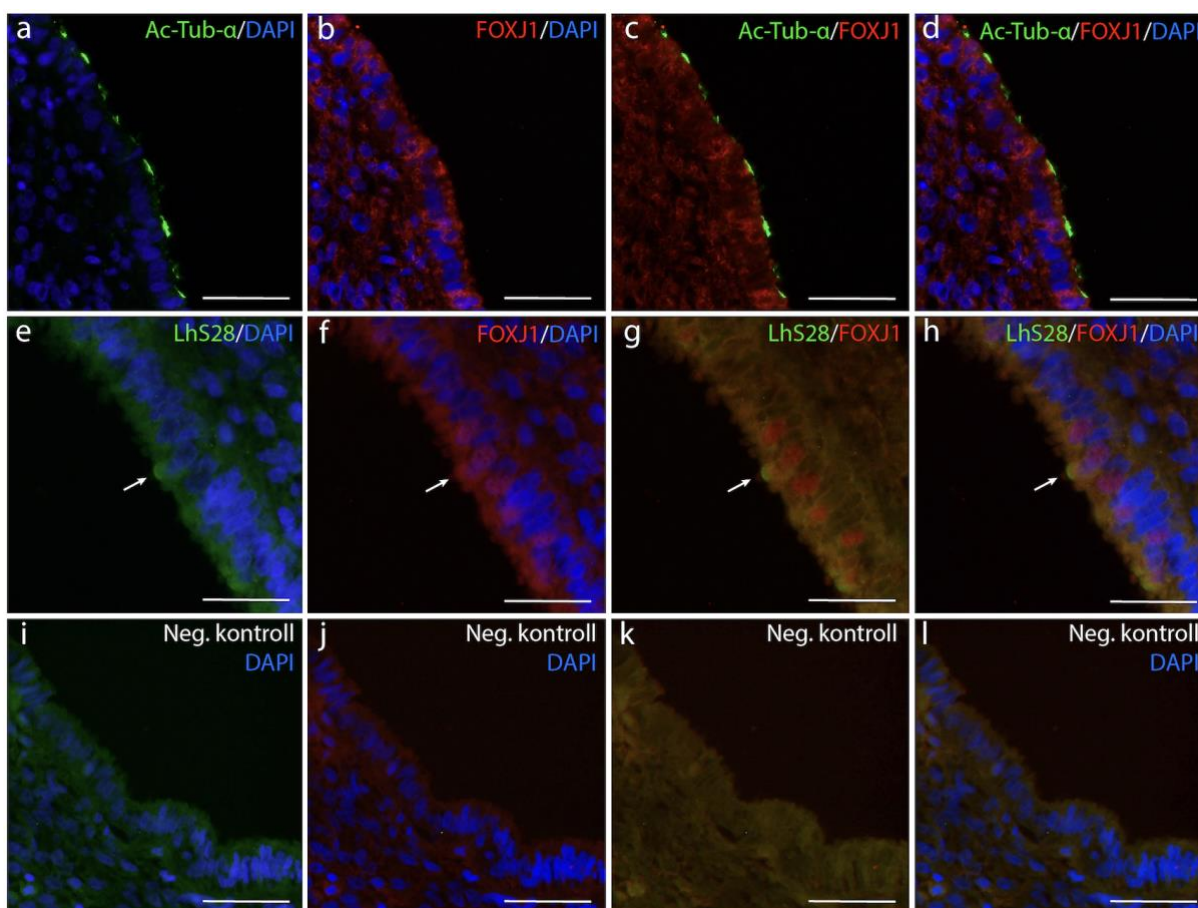
**Lühendid:** AMA – kõrgem reproduktiivne vanus (ingl. k. *advanced maternal age*), CC – ripsrakk (ingl. k. *ciliated cell*), LE – luminaalepiteel, YMA – madalam reproduktiivne vanus (ingl. k. *young maternal age*).



**Joonis 7. Keskmise ripsrakkude arv  $\mu\text{m}^2$  endomeetriumi luminaalepiteeli kohta noorematel ja vanematel naistel.** Teostatud paaritu t-test ( $p = 0,007185$ ,  $**p < 0,01$ ; YMA  $n = 11$ , AMA  $n = 11$ ). Veapiirid tähistavad  $\pm$ SEM. Lühendid: AMA – kõrgem reproduktiivne vanus (ingl. k. *advanced maternal age*), CC – ripsrakk (ingl. k. *ciliated cell*), LE – luminaalepiteel, YMA – madalam reproduktiivne vanus (ingl. k. *young maternal age*).

### 2.3.2. Endomeetriumi ripsrakkude visualiseerimine immunofluorestsentsi abil

Hindamaks valitud markerite sobivust endomeetriumi ripsrakkude analüüsimiseks fluorestsentsignaali kaudu (peatükk 2.3.3.) kasutati immunofluorestsentsanalüüsi koelõikudel. Ripsrakkude tuvastamiseks kasutati Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastast (ripsrakkude markerid) antikeha, ripsrakkude basaalkehade vastast antikeha LhS28 ja tuumade visualiseerimiseks DAPI-t (Tabel 3, Joonis 8). Antikehade testimiseks kasutati positiivse kontrollina munajuha koeproovi (Lisa 2, Joonis L2) (Comer et al., 1999; Coy et al., 2016; Horree et al., 2007; Levanon, 2010; Ulrich et al., 2022). Negatiivse kontrollina kasutati lähenemist, kus nii kui ka endomeetriumi koelõikudele ei lisatud primaarseid antikehi, ülejäänud toimingud teostati vastavalt protokollile.

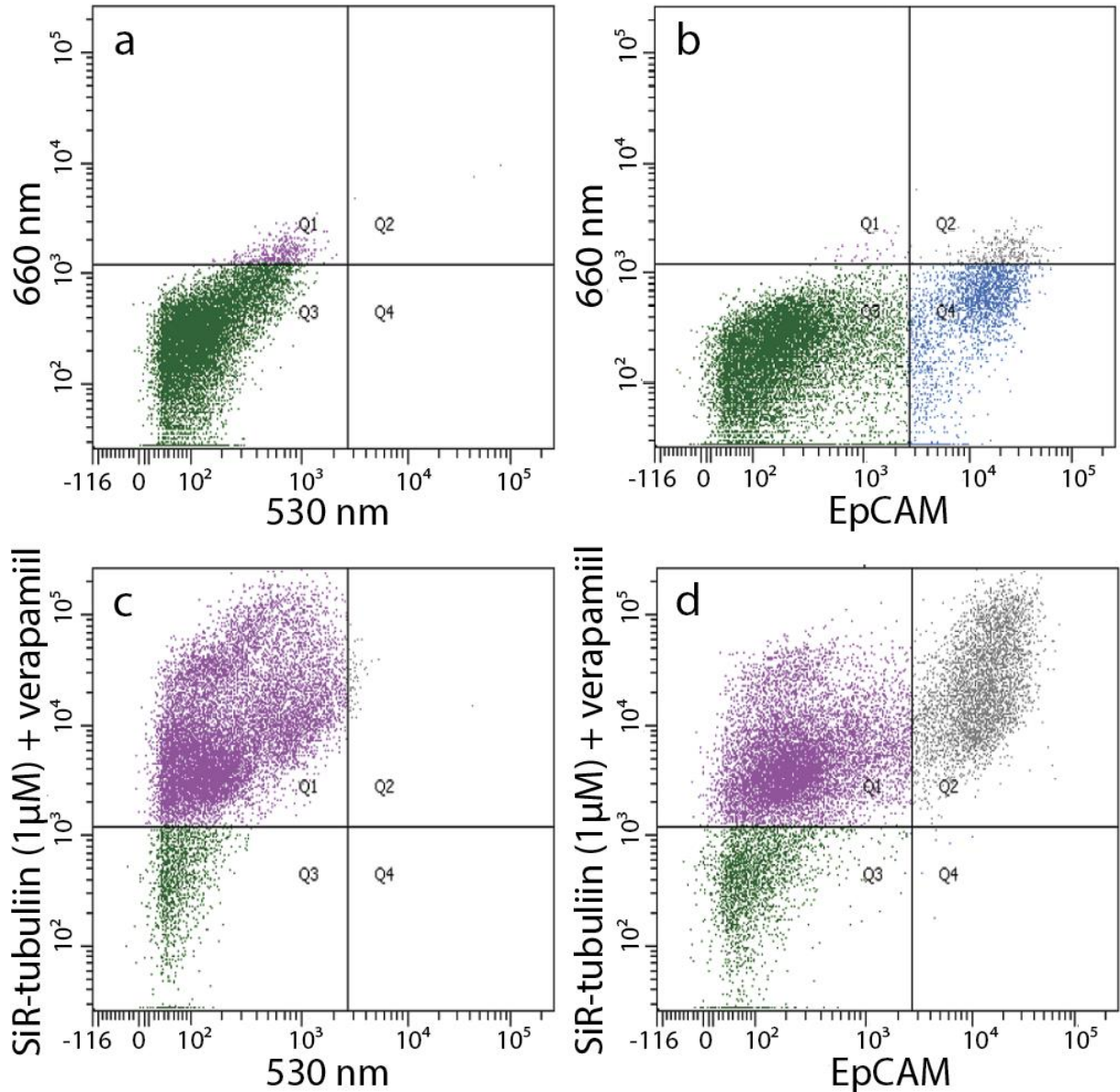


**Joonis 8. Endomeetriumi ripsrakkude visualiseerimine immunofluorestsentsiga.** Ripsrakkude tuvastamiseks endomeetriumi koelõikudel on kasutatud Ac-Tub- $\alpha$ - (roheline) (a, c, d) ja FOXJ1-vastaseid (punane) (b-d, f-h) antikehi ning ripsmete basaalkeha spetsiifilisi LhS28 antikehi (roheline) (e, g, h). Tuumade visualiseerimiseks on kasutatud DAPI-t (sinine). (e-h) Valge noolega on tähistatud üksik ripsrakk. Negatiivsele (Neg.) kontrollile (i-l) ei lisatud primaarseid antikeha. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, FOXJ1 – *Forkhead box J1*. Mõõtskaala: 50  $\mu$ m (a-d ja i-l) ja 30  $\mu$ m (e-h).

Katse tulemusena selgus, et kõik kolm markerit on sobilikud ripsrakkude märgistamiseks. Ac-Tub- $\alpha$  signaal oli tuvastatav rakkude apikaalsel poolel n-ö „mütsikesena“, mis viitas, et Ac-Tub- $\alpha$ -vastane antikeha märgistas ripsrakkude ripsmeid ja LhS28 märgistas ripsrakkude ripsmete basaalkihi (Joonis 8a-d, Joonis 8e-h). Transkriptsioonifaktori FOXJ1 signaal oli detekteeritav, nagu eeldada võis eelkõige rakutuumas (Joonis 8b-d, Joonis 8f-h). Kõiki kolme markerit kasutati järgnevalt voolutsütomeetrilisel analüüsil (peatükk 2.3.3.), et leida sobiv markerite kombinatsioon ripsrakkude eraldamiseks teistest endomeetriumi rakkudest.

### **2.3.3. Endomeetriumi ripsrakkude voolutsütomeetriline analüüs**

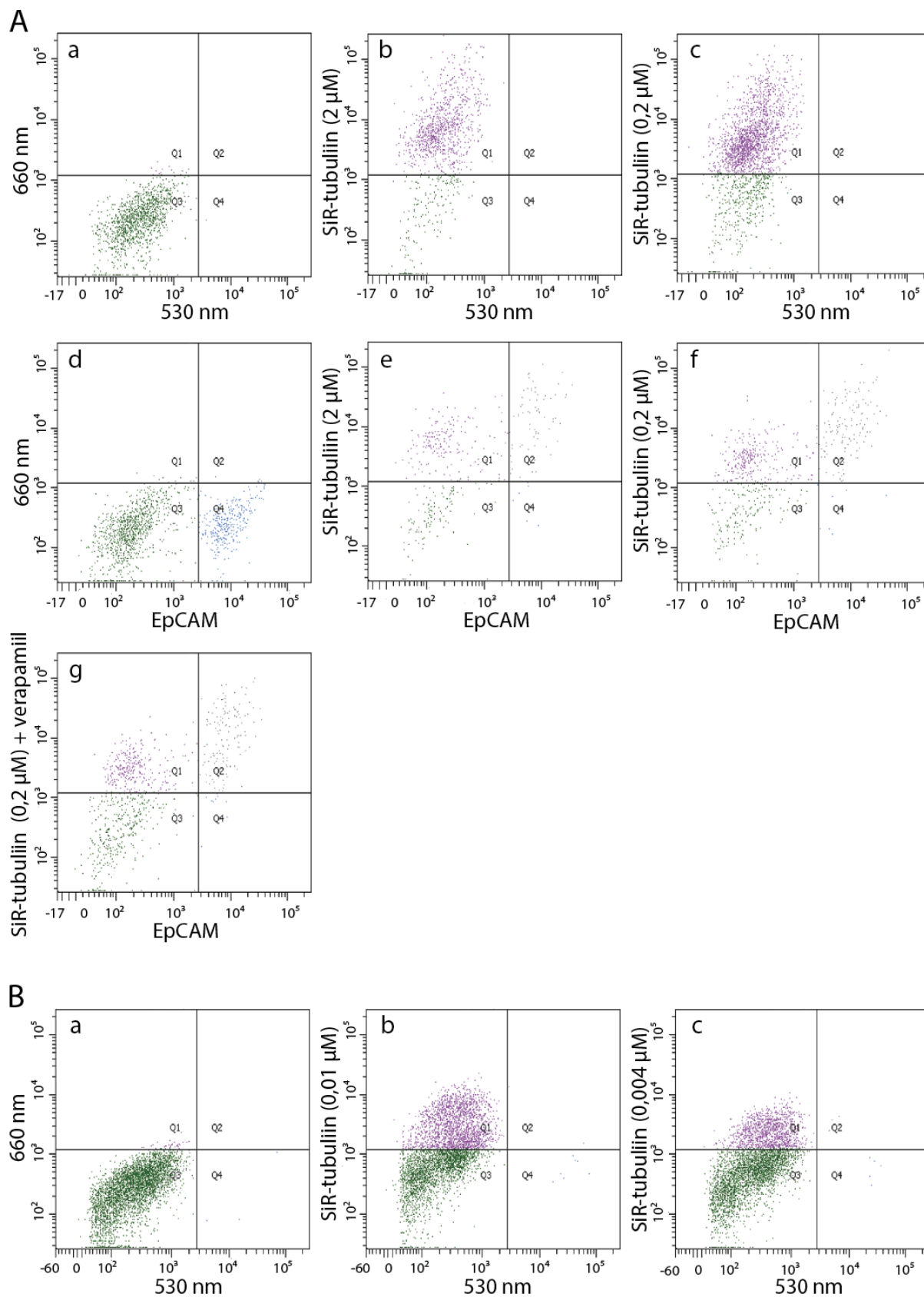
Voolutsütomeetrilise analüüsi eesmärgiks oli välja arendada meetod endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimise (FACS) meetodiga teistest endomeetriumi rakkudest. Esmalt kasutati voolutsütomeetrilisel analüüsil (Joonis 9) ripsrakkude eraldamiseks SiR-tubuliini (1  $\mu$ M) ja EpCAM-vastast antikeha. SiR-tubuliini (fluorogeenne sond) sihtmärgiks on ripsraku aksoneemi mikrotorukesed ja EpCAM-vastane antikeha märgistab adhesioonimolekule epiteelirakkudel. Lisaks kasutati verapamiili (10  $\mu$ M), mis inhibeerib raku väljavoolupumpasid, takistades SiR-tubuliini pumpamist rakust välja (Lukinavičius et al., 2014).



**Joonis 9. Voolutsütomeetriline analüüs 1  $\mu$ M SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga lainepikkustel 660 ja 530 nm.** Skaala tähistab fluorestsentsignaali intensiivsust. Joonisel on kujutatud voolutsütomeetriline analüüs **a** negatiivsete, märgistamata rakkudega, **b** EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **c** SiR-tubuliiniga (lisatud verapamiil) märgistatud rakkudega, **d** SiR-tubuliini (lisatud verapamiil) ja EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega. Lühendid: EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul (joonisel mõeldud EpCAM-vastast antikeha), Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), SiR – silikoonrodamiin.

Analüüsi käigus selgus, et 1  $\mu$ M SiR-tubuliin ei ole spetsiifiline endomeetriumi ripsrakkude suhtes. Samuti oli oodatust rohkem SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakke ehk ka see märgistus on ripsrakkude suhtes mittespetsiifiline (Joonis 9). Lisaks ei olnud SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakkude hulgas peaaegu ühtegi SiR-tubuliin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> raku, kuigi endomeetriumis on lisaks ripsrakkudele ka teisi epiteelirakke, mis näitab samuti, et SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakkude seas ei ole ainult ripsrakud (Joonis 9). Lisas 3, Tabelis L3 on arvuliselt välja toodud analüüsi käigus saadud rakufraktsioonid.

II (Joonis 10A) ja III (Joonis 10B) analüüsi eesmärgiks oli SiR-tubuliini spetsiifilisuse tõstmine ripsrakkude suhtes, tõstes selle kontsentratsiooni 2  $\mu\text{M}$ -ni või langetades 0,2  $\mu\text{M}$  kuni 0,004  $\mu\text{M}$ -ni. Lisaks uuriti II analüüsi käigus, kas verapamiil tõhustab SiR-tubuliiniga märgistumist. Epiteeli adhesioonimolekulide märgistamiseks kasutati II analüüsis EpCAM-vastast antikeha.

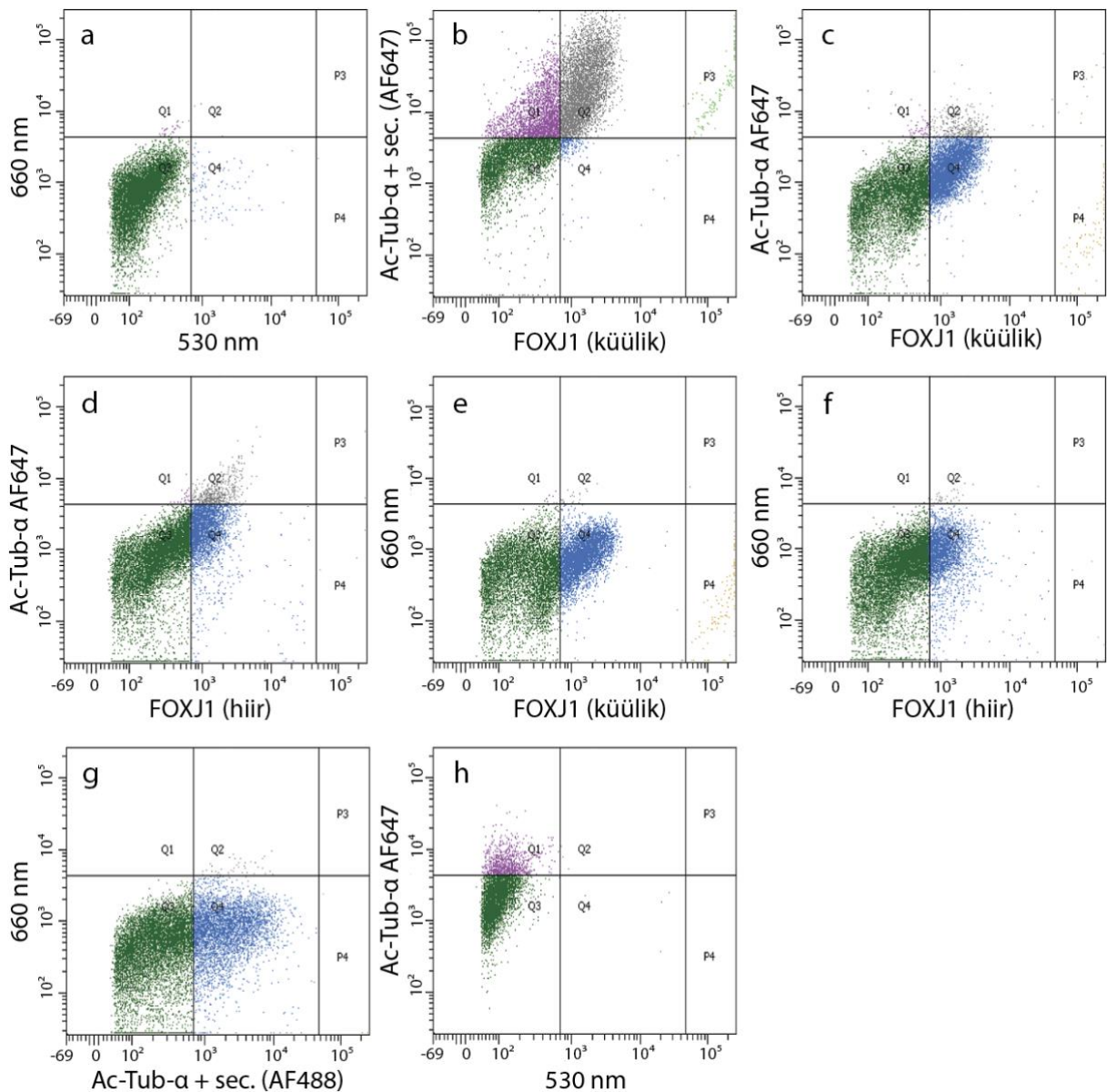


Joonis 10. Voolutsütomeetriline analüüs 0,004-2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga lainepikkustel 660 ja 530 nm. Skaala tähistab rakkude värvumise intensiivsust. Joonisel on kujutatud voolutsütomeetriline analüüs (A) a negatiivsete, märgistamata rakkudega, b 2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliiniga märgistatud

rakkudega, **c** 0,2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega, **d** EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **e** 2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliini ja EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **f** 0,2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliini ja EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **g** 0,2  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliini (lisatud verapamiil) ja EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **(B) a** negatiivsete, märgistamata rakkudega, **b** 0,01  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega, **c** 0,004  $\mu\text{M}$  SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega. Lühendid: EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul, Q – kvadrant (ingl. k. quadrant), SiR – silikoonrodamiin.

Kummagi analüüsiga ei suudetud SiR-tubuliini spetsiifilisust endomeetriumi ripsrakkude suhtes tõsta. Kontsentratsiooni suurendades jäi üldpilt sarnaseks I analüüsis saaduga, kontsentratsiooni langetamisel aga tõmbus „rakupilv“ väiksemaks ehk SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> rakke jäi vähemaks (Joonis 10). Siiski ei tekkinud kummalgi juhul konkreetset, eraldiseisvat „pilve“. Sarnaselt I analüüsiga esinesid ainult SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakud, aga ei olnud SiR-tubuliin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakke. Võrreldes verapamiiliga töödeldud (Joonis 10Ag) ja töötlemata (Joonis 10Af) rakke, ei täheldatud nende märgistamise tõhususes erinevust. Seetõttu loobuti edaspidi verapamiili kasutamisest, et vähendada inkubatsiooniaegu. Lisas 4, Tabelis L4 on välja toodud II ja III analüüsis saadud rakufraktsioonid.

IV (Lisa 5) ja V (Joonis 11) analüüsi jaoks kasutati Ac-Tub- $\alpha$ -vastast (märgistab mikrotorukeste atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliini K40) ja FOXJ1-vastast (tsiliogeneesis oluline transkriptsioonifaktor) antikeha. V analüüsil kombineeriti ka SiR-tubuliini ja FOXJ1-vastast antikeha. Nii Ac-Tub- $\alpha$ -vastasest kui ka FOXJ1-vastasest antikehast kasutati kahte varianti. Ac-Tub- $\alpha$  vastane primaarne antikeha oli kas ise konjugeeritud fluorofooriga või lisati sellele fluorofooriga konjugeeritud sekundaarne antikeha. FOXJ1-vastane primaarne antikeha oli monoklonaalne (pärit hiirest) või polüklooraalne (pärit küülikust). Fikseerimiseks kasutati samuti kahte meetodit: formaliiniga (Lisa 5, Joonis L5) või tsingiühenditega fikseerimine (Joonis 11).

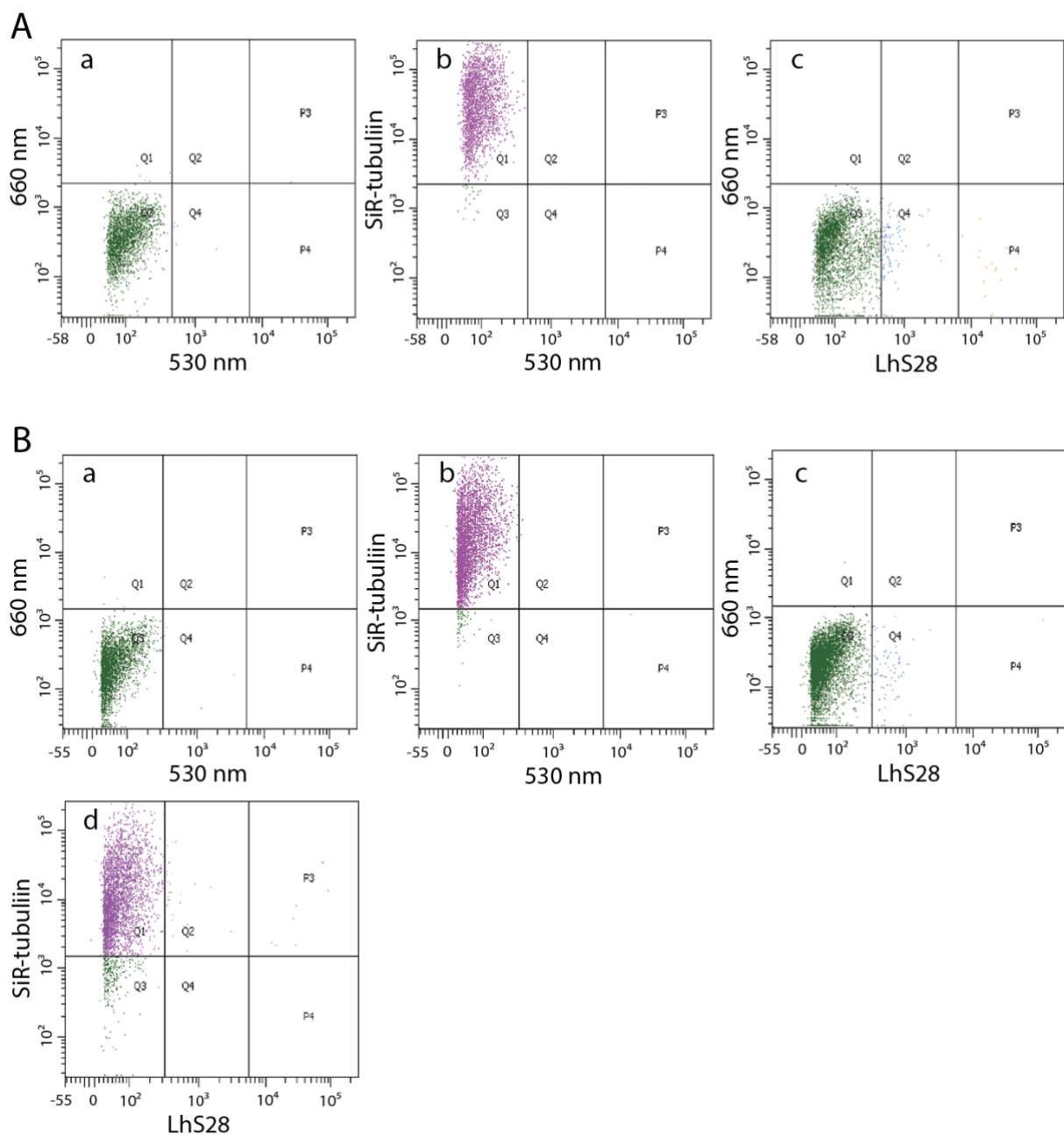


**Joonis 11. Voolumeetriline analüüs Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga tsinkfikseeritud rakkudel lainepikkustel 660 ja 530 nm.** Skaala tähistab rakkude värvumise intensiivsust. Joonisel on kujutatud voolumeetriline analüüs **a** negatiivsete, märgistamata rakkudega, **b** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeerimata antikehaga ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **c** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikeha ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **d** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikeha ja monokloonaalse, hiirest pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **e** polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega **f** monokloonaalse, hiirest pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **g** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeerimata antikehaga märgistatud rakkudega, **h** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikehaga märgistatud rakkudega. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, P – osa (ingl. k. *parent*), Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), sec – sekundaarne (antikeha; ingl. k. *secondary*), SiR – silikoonrodamiin.

Analüüside käigus selgus, et mõlemad fikseerimismeetodid annavad sarnase tulemuse. Formaliinis fikseeritud rakkude puhul kasutati nii SiR-tubuliini kui ka Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastast antikeha, kuid tulemusi võrreldes täheldati, et tõhusaim kombinatsioon oli Ac-Tub- $\alpha$ -vastane ja polükloonaalne, küülikust pärit FOXJ1-vastane antikeha, sest nendega

saadi enim tugevalt märgistunud Ac-Tub- $\alpha^+$ FOXJ1<sup>+</sup> rakke (Lisa 3, värv P3). Seetõttu SiR-tubuliini järgnevates fikseeritud rakkudega katsetes ei kasutatud. FOXJ1-vastaste primaarsete antikehade võrdlusel hinnati paremini toimivaks polükloonaalne, küülikus toodetud antikeha, sest kuigi selle kontsentratsioon oli kaks korda madalam, siis selle antikeha kasutamisel oli detekteeritav tugevam FOXJ1 signaal nii Ac-Tub- $\alpha^+$ FOXJ1<sup>+</sup> kui ka Ac-Tub- $\alpha^-$ FOXJ1<sup>+</sup> rakkudes (Joonis 11, vastavalt väravad P3 ja P4). Monoklonaalse, hiires toodetud FOXJ1-vastase antikeha puhul tekkis nii Ac-Tub- $\alpha^+$ FOXJ1<sup>+</sup> kui ka Ac-Tub- $\alpha^-$ FOXJ1<sup>+</sup> rakke <10. Võrreldes konjugeeritud ja konjugeerimata Ac-Tub- $\alpha$ -vastast antikeha selgus, et konjugeerimata antikehaga esines rohkem tugevalt märgistunud Ac-Tub- $\alpha^+$ FOXJ1<sup>+</sup> rakke (Joonis 11, värv P3) ja ka Ac-Tub- $\alpha^+$ FOXJ1<sup>-</sup> rakke (Joonis 11, värv P3). IV ja V analüüsist saadud rakufraktsioonid on välja toodud vastavalt Lisas 5, Joonisel L5 ja Tabelis L5 ning Lisas 6, Tabelis L6.

VI ja VII analüüsi (Joonis 12) eesmärgiks oli märgistada elusaid, fikseerimata endomeetriumi ripsrakke, milleks kasutati kõigepealt basaalkhade vastast antikeha LhS28 (Joonis 12A), seejärel aga LhS28 koos SiR-tubuliiniga (Joonis 12B). Kuna järgnes rakkude sorteerimine, lisati analüüsi tarbeks rakkudele DAPI, et hinnata elusate rakkude hulka.



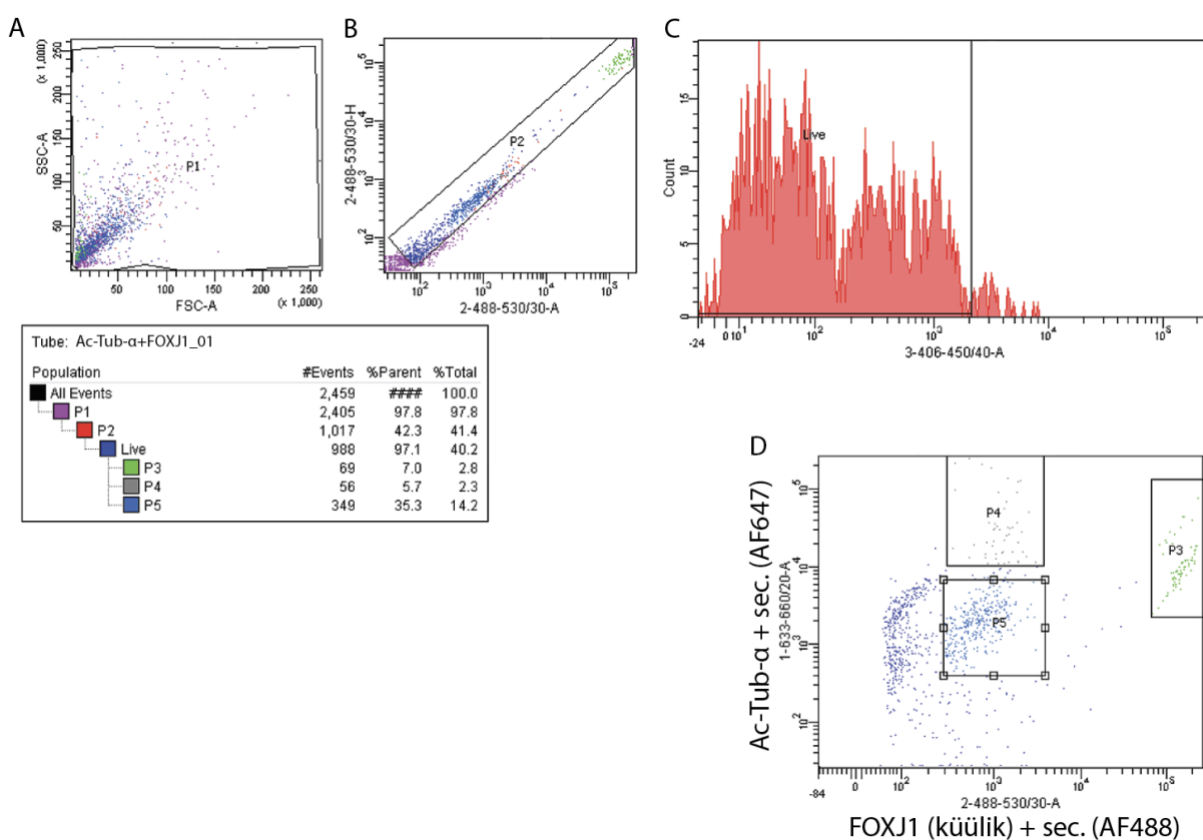
**Joonis 12. Voolutsütomeetriline analüüs SiR-tubuliini ja LhS28-ga lainepikkustel 660 ja 530 nm.** Skaala tähistab rakkude värvumise intensiivsust. Joonisel on kujutatud voolutsütomeetriline analüüs **(A)** a negatiivsete, märgistamata rakkudega, **b** SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega. **c** LhS28-ga märgistatud rakkudega, **(B)** a negatiivsete, märgistamata rakkudega. **b** SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega, **c** LhS28-ga märgistatud rakkudega, **d** SiR-tubuliini ja LhS28-ga märgistatud rakkudega. Lühendid: Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), SiR – silikoonrodamiin.

Analüüsil selgus, et LhS28 on võimeline märgistama elusaid ripsrakke, kusjuures esines ka oluliselt kõrgema fluorestsentsiga LhS28<sup>+</sup> rakke (Joonis 12Ac, väravad Q4 ja P4). SiR-tubuliiniga märgistatud rakud oli sarnaselt eelnevate tulemustega enamuses, kuid saadi ka SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakke, sealhulgas eriti tugevalt märgistatud SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakke (Joonis 12Bd, väravad Q2 ja P3). Kummalgi analüüsil saadud rakufraktsioonid on välja toodud Lisas 7, Tabelis L7.

### 2.3.4. Fluorestsents-aktiveeritud endomeetriumi ripsrakkude sorteerimine

Voolutsütomeetrilisel analüüsil saadud tulemuste põhjal otsustati, missuguseid sonde/antikehi ning kas ja missugust fikseerimismeetodit rakkude fluorestsents-aktiveeritud sorteerimiseks (FACS) kasutada. Selleks valmistati rakud ette samamoodi, nagu seda tehti analüüsi tarbeks: valmistati rakuksuspensioon, vajadusel rakud fikseeriti ja permeabiliseeriti ning siis märgistati. Kõikides analüüsid kasutatud molekulid on välja toodud Tabelis 3 sorteerimise paneeli all. Sorteerimine teostati emissiooni lainepikkustel 660 ja 530 nm. Kokku sorteeriti kaks korda. Kõigi sorteeritud rakkude RNA sekveeriti (peatükk 2.3.5.).

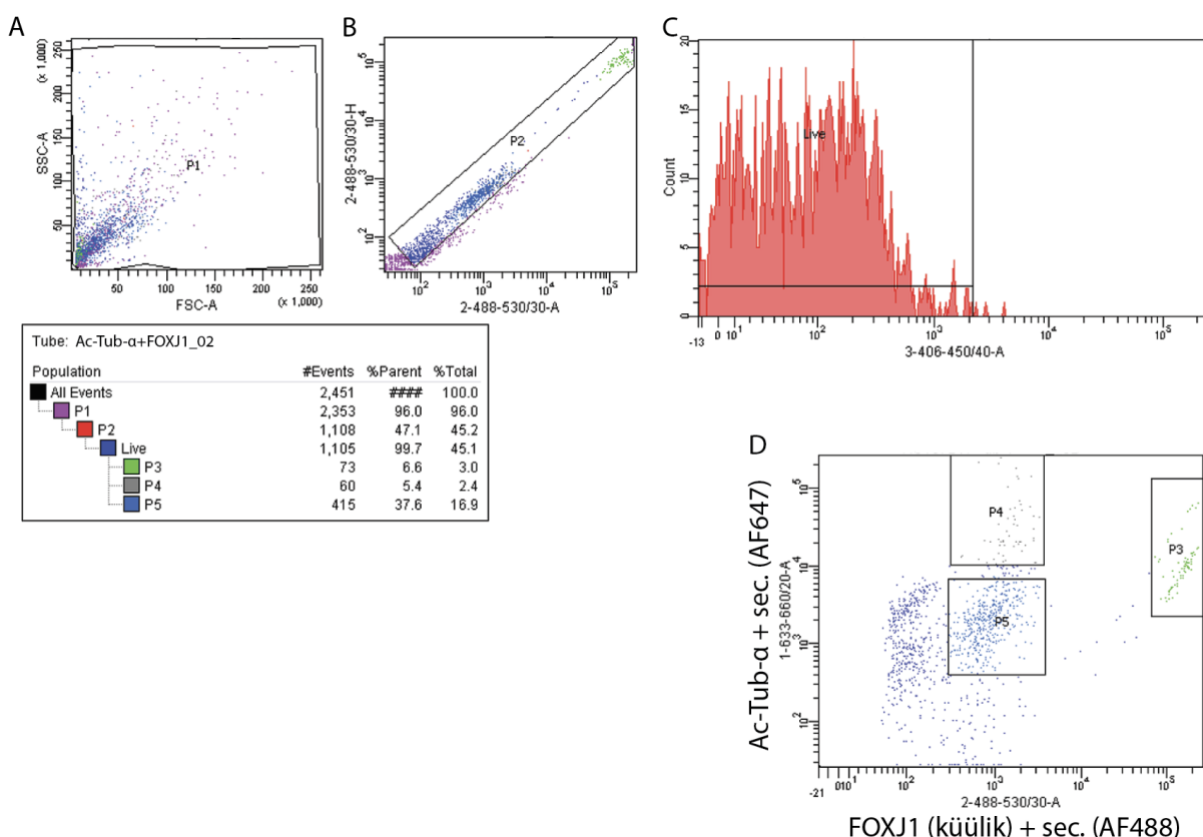
Esimese sorteerimise (Joonised 13-15) jaoks fikseeriti rakud tsinkfiksaatoriga. Kaks tehnilist replikaati (Joonised 13 ja 14) märgistati Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeerimata antikeha ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga. Kolmas proov (Joonis 15), mida ei fikseeritud ja kasutati kontrollina, märgistati SiR-tubuliiniga.



**Joonis 13. Tsinkfikseeritud ja fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine Ac-Tub- $\alpha$ - ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga esimesest tehnilisest replikaadist. (A)** Sorteeritavas proovis esinevate rakkude suhtelised suurused (X-telg) ja granulaarsused (Y-telg). Kõik etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakud on värvavas P1. **(B)** Valguse hajuvuse kõrguse (Y-telg) ja pindala (X-telg) suhe eristamiseks

üksikrakke (värav P2) kokkukleepunudest. **(C)** DAPI-ga mittevärvunud rakkude arv (Y-telg) emissiooni lainepikkusel 450 nm. X-telg näitab suhtelist emissiooni intensiivsust. **(D)** Sorteertavad rakud lainepikkustel 660 ja 530 nm. Värvasse P3, P4 ja P5 jäävad vastavalt Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>+</sup>, Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>-</sup> ja Ac-Tub- $\alpha$ -FOXJ1<sup>+</sup> rakud. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, FSC-A – *forward scatter area, sec.* – sekundaarne (antikeha, ingl. k. *secondary*), SSC-A – *side scatter area*. Tõlked: *all events* – kõik sündmused, *count* – rakkude arv, *forward scatter area* – valguse hajumise pindala, *live* – elusad (rakud), *%parent* – osaprotsent, *population* – (raku)populatsioon, *side scatter area* – valguse külghajumise pindala, *tube* – tuub/proov, *total* – kokku/täisprotsent.

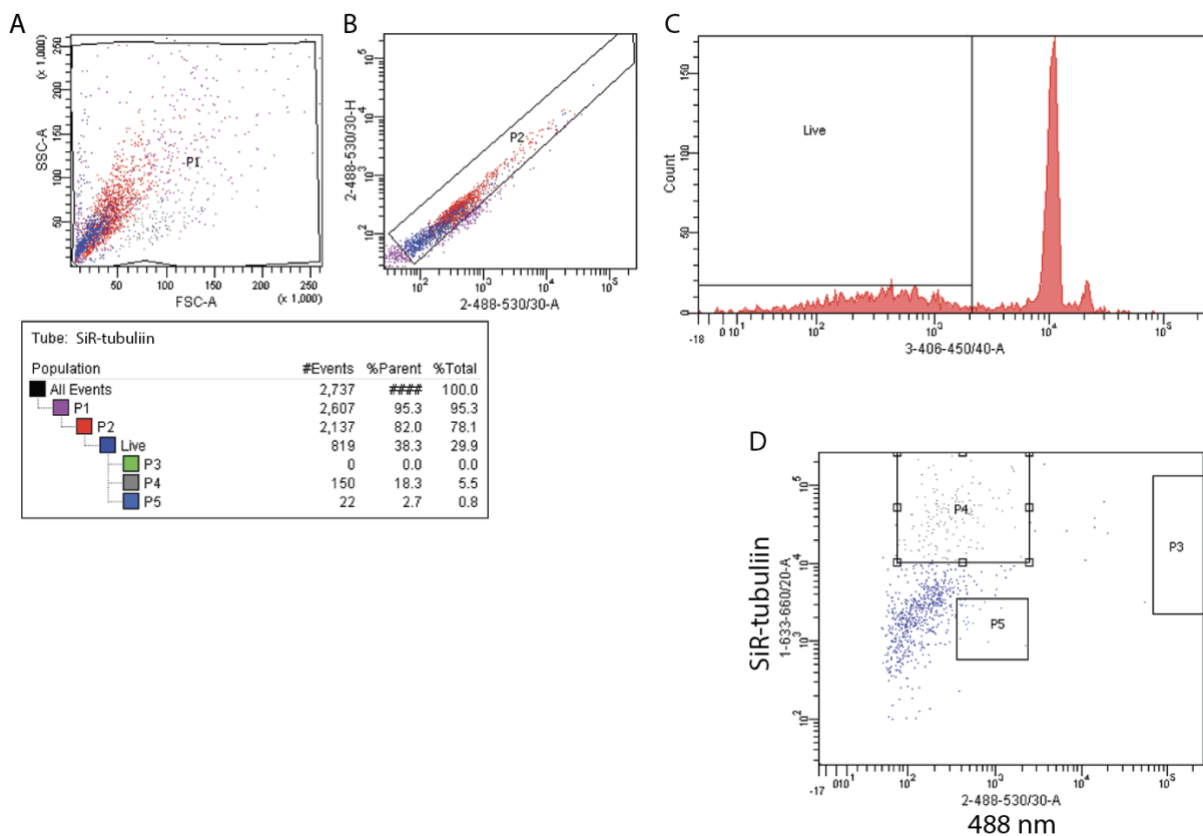
Esimeses tehnilises replikaadis oli 2459 sündmust ehk raku (ingl. k. *all events*) (Joonis 13). Joonise A osas on kujutatud rakkude jaotumine suuruse ja granulaarsuse järgi. Y-telg (ingl. k. *side scatter area* ehk SSC-A) näitab raku granulaarsust, X-telg (ingl. k. *forward scatter area* ehk FSC-A) kujutab raku suhtelist suurust. Kõik rakud, mille suurus ja granulaarsus jäävad etteantud vahemikku, on nähtavad väravas P1. Joonise B osas jäävad väravasse P2 sellised rakud, mis liiguvad ühekaupa ega ole kokkukleepunud ning neid oli 1017. Joonise C osa näitab elusaid (ingl. k. *live*) rakke, kuid tulenevalt asjaolust, et antud proovis olid kõik rakud fikseeritud ja DAPI-t ei lisatud, luges masin enamiku rakkudest elusaks. Antud proovist saadi 988 raku (Joonis 12D), millest sorteeriti välja 69 Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>+</sup> (värav P3), 56 Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>-</sup> (värav P4) ja 349 Ac-Tub- $\alpha$ -FOXJ1<sup>+</sup> (värav P5) raku.



**Joonis 14.** Tsinkfikseeritud ja fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine Ac-Tub- $\alpha$ - ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga teisest tehnilisest replikaadist. **(A)** Sorteertavas proovis esinevate rakkude suhtelised suurused (X-telg) ja granulaarsused (Y-telg). Kõik etteantud piiridesse jääva suuruse ja

granulaarsusega rakud on värvas P1. **(B)** Valguse hajuvuse kõrguse (Y-telg) ja pindala (X-telg) suhe eristamaks üksikrakke (värv P2) kokkukleepunutest. **(C)** DAPI-ga mittevärvunud rakkude arv (Y-telg) emissiooni lainepikkusel 450 nm. X-telg näitab suhtelist emissiooni intensiivsust. **(D)** Sorteertavad rakud lainepikkustel 660 ja 530 nm. Värvasse P3, P4 ja P5 jäävad vastavalt Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>+</sup>, Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>-</sup> ja Ac-Tub- $\alpha$ -FOXJ1<sup>+</sup> rakud. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, FSC-A – *forward scatter area, sec.* – sekundaarne (antikeha, ingl. k. *secondary*), SSC-A – *side scatter area*. Tõlked: *all events* – kõik sündmused, *count* – rakkude arv, *forward scatter area* – valguse hajumise pindala, *live* – elusad (rakud), *%parent* – osaprotsent, *population* – (raku)populatsioon, *side scatter area* – valguse külghajumise pindala, *tube* – tuub/proov, *total* – kokku/täisprotsent.

Teises tehnilises replikaadis oli 2451 sündmust (Joonis 14). Etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakke oli 2353 (Joonis 14A, värv P1) ning üksikuid rakke oli 1108 (Joonis 14B, värv P2). Sarnaselt esimese tehnilise replikaadiga olid ka teise replikaadi rakud tsinkfikseeritud, kuid masin luges elusaks 1105 raku (Joonis 14D). Nendest sorteeriti välja 73 Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>+</sup> (värv P3), 60 Ac-Tub- $\alpha$ +FOXJ1<sup>-</sup> (värv P4) ja 415 Ac-Tub- $\alpha$ -FOXJ1<sup>+</sup> (värv P5) raku.

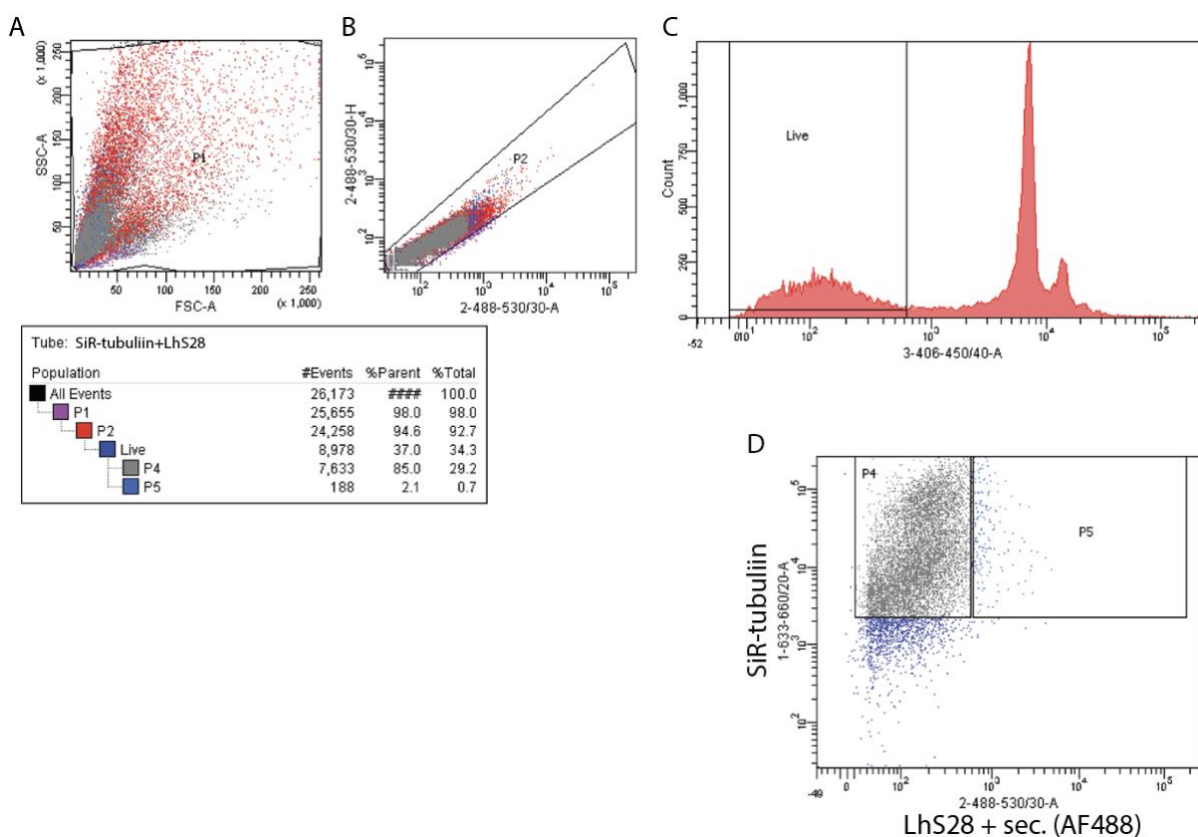


**Joonis 15. Elusate fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine SiR-tubuliiniga. (A)** Sorteertavas proovis esinevate rakkude suhtelised suurused (X-telg) ja granulaarsused (Y-telg). Kõik etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakud on värvas P1. **(B)** Valguse hajuvuse kõrguse (Y-telg) ja pindala (X-telg) suhe eristamaks üksikrakke (värv P2) kokkukleepunutest. **(C)** DAPI-ga värvunud või mittevärvunud rakkude arv (Y-telg) emissiooni lainepikkusel 450 nm. X-telg näitab suhtelist emissiooni intensiivsust. Elusad, väikse intensiivsusega rakud jäävad vasakule poole joont; surnud, suure intensiivsusega rakud paremale poole joont. **(D)** Sorteertavad rakud lainepikkustel 660 ja 530 nm. Sorteertavad SiR-tubuliin<sup>+</sup> rakud jäävad värvasse P4. Teistesse värvatesse jäänud rakke ei sorteeritud. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, FSC-A – *forward scatter area, sec.* – sekundaarne (antikeha), SiR – silikoonrodamiin, SSC-A – *side scatter area*. Tõlked: *all events* – kõik sündmused, *count* – rakkude arv, *forward scatter area* – valguse hajumise pindala,

*live* – elusad (rakud), *%parent* – osaprotsent, *population* – (raku)populatsioon, *side scatter area* – valguse külghajumise pindala, *tube* – tuub/proov, *total* – kokku/täisprotsent.

Kolmandas proovis oli 2737 sündmust (Joonis 15). Etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakke oli 2607 (Joonis 15A, värv P1) ning üksikuid rakke oli 2137 (Joonis 15B, värv P2). DAPI lisamisega eraldati surnud rakud elusatest lainepikkusel 450 nm (Joonis 15C). 819 elusast rakust sorteeriti välja 150 SiR-tubuliin<sup>+</sup> raku (Joonis 15D, värv P4). Teistesse värvatesse jäänud rakke ei sorteeritud.

Teise sorteerimise (Joonis 16) rakke ei fikseeritud. Rakud märgistati SiR-tubuliini ja LhS28-ga. Sorteeriti ainult elusaid rakke ja nende eraldamiseks kasutati DAPI-t ning lainepikkust 450 nm (Joonis 16C).



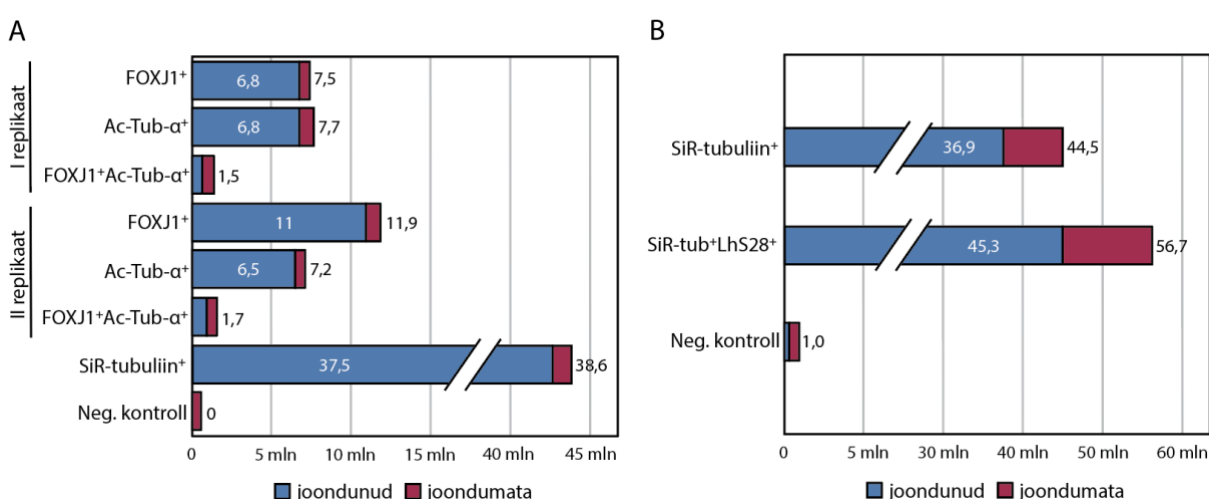
**Joonis 16. Elusate fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine SiR-tubuliini ja LhS28-ga. (A)** Sorteeritavas proovis esinevate rakkude suhtelised suurused (X-telg) ja granulaarsused (Y-telg). Kõik etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakud on värvas P1. **(B)** Valguse hajuvuse kõrguse (Y-telg) ja pindala (X-telg) suhe eristamiseks üksikrakke (värv P2) kokkuklepnutest. **(C)** DAPI-ga värvunud või mittevärvunud rakkude arv (Y-telg) emissiooni lainepikkusel 450 nm. X-telg näitab suhtelise emissiooni intensiivsust. Elusad, väikse intensiivsusega rakud jäävad vasakule poole joont; surnud, suure intensiivsusega rakud paremale poole joont. **(D)** Sorteeritavad rakud lainepikkustel 660 ja 530 nm. Värvasse P4 ja P5 jäävad vastavalt SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakud. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, FSC-A – *forward scatter area*, sec. – sekundaarne (antikeha, ingl. k. *secondary*), SiR – silikoonrodamiin, SSC-A – *side scatter area*. Tõlked: *all events* – kõik sündmused, *count* – rakkude arv, *forward scatter area* – valguse

hajumise pindala, *live* – elusad (rakud), *%parent* – osaprotsent, *population* – (raku)populatsioon, *side scatter area* – valguse külghajumise pindala, *tube* – tuub/proov, *total* – kokku/täisprotsent.

Teiseks sorteerimiseks ettevalmistatud proovis oli 26 173 sündmust (Joonis 16). Etteantud piiridesse jääva suuruse ja granulaarsusega rakke oli 25 655 (Joonis 16A, värv P1) ning üksikuid rakke oli 24 258 (Joonis 16B, värv P2). Elusaid rakke saadi 8978 ning neist sorteeriti välja 500 SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> (Joonis 16D, värv P4) ja 300 SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakku (Joonis 16D, värv P5). See tähendab, et kõiki SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakke ei sorteeritud ning mõned sorteeritud SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakud jäid värvast P5 välja.

### 2.3.5. Sorteeritud rakkude RNA sekveneerimine

Sorteeritud rakkude RNA-st sünteesiti ja amplifitseeriti cDNA, millest valmistati seejärel DNA fragmentide raamatukogu. Pärast raamatukogu amplifitseerimist sekveneeriti saadud produkt ja tulemusi analüüsiti bioinformaatilise tarkvaraga. Esimesel sorteerimisel eraldati nii Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastaste antikehadega märgistatud rakud kui ka elusad SiR-tubuliiniga märgistatud rakud. Kuna FOXJ1 on transkriptsioonifaktor ja seega rakusisene marker, tuli rakud sorteerimiseks fikseerida. RNA kvaliteedi säilitamiseks kasutati tsinkfiksaatorit, mis ei tekita ristsidemeid ega ole toksiline (Lykidis et al., 2007). SiR-tubuliiniga märgistatud rakkude RNA-d kasutati kontrollina, sest ei olnud teada, kas fikseeritud rakkude RNA-st õnnestub valmistada raamatukogu.

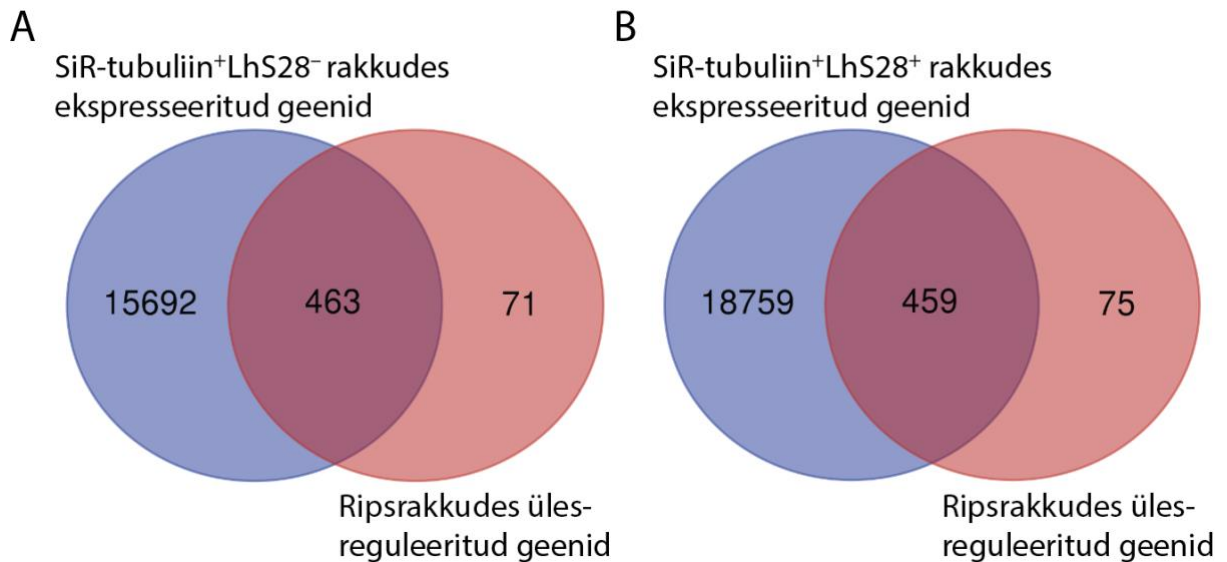


**Joonis 17. RNA sekveneerimisest saadud joondunud ja joondumata lugemid.** Sinine tähistab joondunud ja punane joondumata lugemid miljonites. Mustas kirjas tulpade taga on saadud lugemite koguarv, valges kirjas on joondunud lugemite arv. Negatiivse (Neg.) kontrollina kasutati proovi, kuhu ei lisatud cDNA-d. **(A)** I sorteerimisel saadud rakupopulatsioonide joondunud ja joondumata lugemite arv miljonites. FOXJ1<sup>+</sup> tähistab Ac-Tub- $\alpha$ <sup>-</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakke, Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup> tähistab Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>-</sup> rakke ja Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>+</sup> tähistab tugevalt

märgistatud Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakke (esines ka nõrgemalt märgistatud Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakke, mida ei sorteeritud ega sekveneritud). **(B)** II sorteerimisel saadud rakupopulatsioonide joondunud ja joondumata lugemite arv miljonites. SiR-tubuliin<sup>+</sup> tähistab SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakke ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> tähistab nõrgemalt märgistatud SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakke (voolutsütomeetrilisel analüüsil esines ka tugevalt märgistatud SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakke, kuid sorteerimisel neid ei esinenud). Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, SiR – silikoonrodamiin, SiR-tub – SiR-tubuliin.

Ac-Tub- $\alpha$ <sup>-</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakkude RNA-st saadi I ja II replikaadist vastavalt 7,5 ja 11,9 miljonit lugemit, millest referentsgenoomiga (GRCh38) joondus 6,8 (91,2%) ja 11 miljonit (92,4%) (Joonis 17A). Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>-</sup> rakkude RNA-st saadi vastavalt 7,7 ja 7,2 miljonit lugemit, millest joondus 6,8 (88,1%) ja 6,5 (90,4%) miljonit. Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakkude RNA-st saadi vastavalt 1,5 ja 1,7 miljonit lugemit, millest joondus 0,7 (46,8%) ja 1 (59,0%) miljon lugemit. SiR-tubuliin<sup>+</sup> rakkude RNA-st saadi 38,7 miljonit lugemit, millest joondus 37,5 (97,0%) miljonit. Negatiivse kontrollina kasutati cDNA-ta proovi ning sellest saadi 0,6 miljonit lugemit, millest joondus 0,008 miljonit (1,3%).

Teisel korral sorteeriti elusaid SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakke. Lugemeid saadi kummagi rakupopulatsiooni RNA-st vastavalt 44,5 ja 56,7 miljonit, millest joondus vastavalt 36,9 (82,8%) ja 45,3 (79,9%) miljonit lugemit (Joonis 17B). Negatiivsest kontrollist saadi miljon lugemit, millest joondus 0,2 (23,0%) miljonit. II sorteerimisest saadud rakkudes ekspresseeritud geene võrreldi *The Human Protein Atlas*'es (versioon 23.0) 19.06.2023 seisuga väljatoodud geenidega, mis ripsrakkudes on ülesreguleeritud (Joonis 18). Kokku võrreldi 534 geeni, millest kattus SiR-tubuliin<sup>+</sup> rakkudes 463 (Joonis 18A) ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes 459 geeni (Joonis 18B).



**Joonis 18. SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes ekspresseeritud geenide ja ripsrakkudega seotud geenide kattuvus.** Sinises ringis on sorteeritud rakkudes ekspresseeritud geenide arv, punases ringis on *The Human Protein Atlas*'e (versioon 23.0) andmetel ripsrakkudes üleekspressiooniga geenide arv (kokku 534) ja ringide kokkusaamiskohas on näha kattunud geenide arv. **(A)** SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes ekspresseeritud geenide ja ripsrakkudega seotud geenide kattuvus. **(B)** SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes ekspresseeritud geenide ja ripsrakkudega seotud geenide kattuvus. Lühendid: SiR – silikoonrodamiin.

Nii SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> kui ka SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes ekspresseeritud geenide seas oli mitmeid ripsrakkude struktuuri ja funktsiooniga seotud gene. Ripsmete ja viburitega seotud valke (*cilia and flagella associated protein* ehk CFAP) kodeeris vastavalt 42 ja 44 geeni ning kummalgi rakupopulatsioonil oli ekspresseeritud 19 IFT geeni.  $\alpha$ -tubuliini erinevaid alamklasse ekspresseeriti kummaski rakupopulatsioonis kuuelt,  $\beta$ -tubuliini kuuelt (SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup>) ja viielt (SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup>) ning tektiini (TEKT) neljalt geenilt. Ekspresseeriti ka ripsmete muude struktuuridega, nagu „rattakodaraid meenutavate“ struktuuride (ingl. k. *radial spokes*) ning aksoneemi düneiini kerge, keskmise ja raske ahelaga seotud gene.

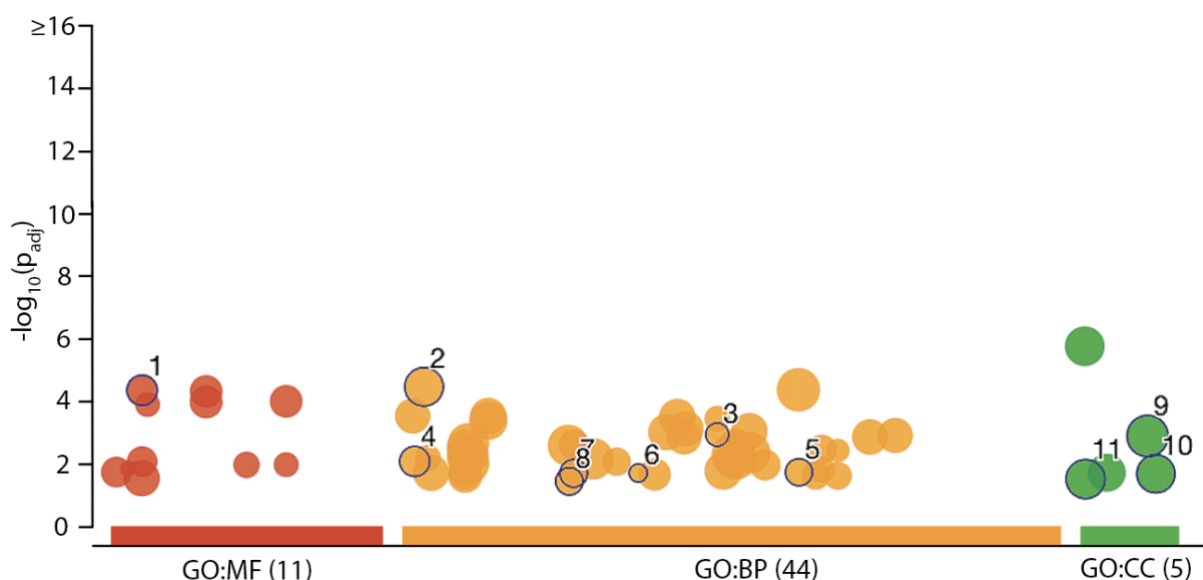
Lisaks uuriti mõnede üksikute geenide ekspressioone. Ripsrakkude markeritest ekspresseerusid kõrgemalt *FOXJ1* (Bonser et al., 2021; Patir et al., 2020) ja kadheriiniga seotud perekonna liige 3 (ingl. k. *cadherin related family member 3* ehk *CDHR3*) (Bonser et al., 2021). Kummaski sorteeritud populatsioonis ekspresseerusid epiteelimerkist kõrgelt *EpCAM* (Haider et al., 2019a), *CD9* (K. R. Park et al., 2000) ja keratiin-8 (*KRT8*) (Haider et al., 2019a; Kirkwood et al., 2022), kuigi SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes oli ekspressioon madalam. Strooma fibroblastide marker dekoriin (ingl. k. *decorin* ehk *DCN*) (Ono et al., 2014; Yanaihara et al., 2004, 2005) ekspresseerus kõrgelt SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes. Tabelis 6 on välja toodud näited mõnedest kõrgemalt ekspresseerunud geenidest.

**Tabel 6. Näited mõnedest kõrgemalt ekspresseerunud geenidest SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes.**

Geen (ingl. k.)	Lühend	TPM	
		SiR-tubuliin <sup>+</sup> LhS28 <sup>-</sup>	SiR-tubuliin <sup>+</sup> LhS28 <sup>+</sup>
<i>Cilia and flagella associated protein 276</i>	<i>CFAP276</i>	582,33	243,70
<i>Intraflagellar transport 25</i>	<i>IFT25</i>	248,04	149,45
<i>Dynein axonemal heavy chain 12</i>	<i>DNAH12</i>	182,12	94,65
<i>Tektin 1</i>	<i>TEKT1</i>	99,46	33,38
<i>Radial spoke head component 1</i>	<i>RSPH1</i>	187,54	53,50
<i>Tubulin alpha 1a</i>	<i>TUBA1A</i>	110,91	64,36
<i>Cadherin related family member 3</i>	<i>CDHR3</i>	84,95	29,59
<i>Forkhead box J1</i>	<i>FOXJ1</i>	5,81	14,65
<i>Epithelial cell adhesion molecule CD9</i>	–	161,34	201,96
<i>Keratin-8</i>	<i>KRT8</i>	64,78	123,15
<i>Decorin</i>	<i>DCN</i>	243,23	27,0

Lühendid: TPM – transkriptide arv miljoni transkripti kohta (ingl. k. *transcripts per million*).

Sekveneemistulemustel leidis ka selliseid gene, mis olid ekspresseeritud SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes, kuid puudusid või olid väga madalalt ekspresseeritud (TPM<2) SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes. Enamik sellistest geenidest olid seotud immuunsüsteemi bioloogiliste protsesside või molekulaarsete funktsioonidega (Joonis 19, Tabel 7). Vererakkude markeritest vaadeldi monotsüütide markerit CD14 (Hudson et al., 2020), makrofaagide markerit CD68 (Ganeva et al., 2021), dendriitrakkude markereid CD11c ja HLA-DR (Rodriguez-Garcia et al., 2017), NK-rakkude markereid CD56 (Ganeva et al., 2021) ja CD94 (McGrath et al., 2009), T-rakkude markerit CD3 (Ganeva et al., 2021), B-rakkude markerit CD79 (Ganeva et al., 2021), erütrotsüütide markerit CD235a (Kim et al., 2023), kuid need olid väga madalalt ekspresseeritud või jäid alla detekteerimisläve.



**Joonis 19. SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes ekspresseeritud ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes ekspresseerimata geenidega seotud signaalirajad.** Manhattani tüüpi joonise tegemiseks kasutati veebitööriista gProfiler (versioon e111\_eg58\_p18\_30541362), mis kasutab GO andmeid. Punasega on välja toodud 11 molekulaarset funktsiooni, oranžiga 44 bioloogilist protsessi ja rohelisega viis rakuosa, millega antud geenid seotud on. Iga vaste kohta on välja toodud kohandatud p-väärtus ( $p_{adj}$ ). Lühendid: adj – kohandatud (ingl. k. *adjusted*), BP – bioloogiline protsess, CC – rakuosa (ingl. k. *cellular compartment*), GO – geeniontoloogia, MF – molekulaarne funktsioon.

**Tabel 7. Näited SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes ekspresseeritud ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes ekspresseerimata geenidega seotud radadest.**

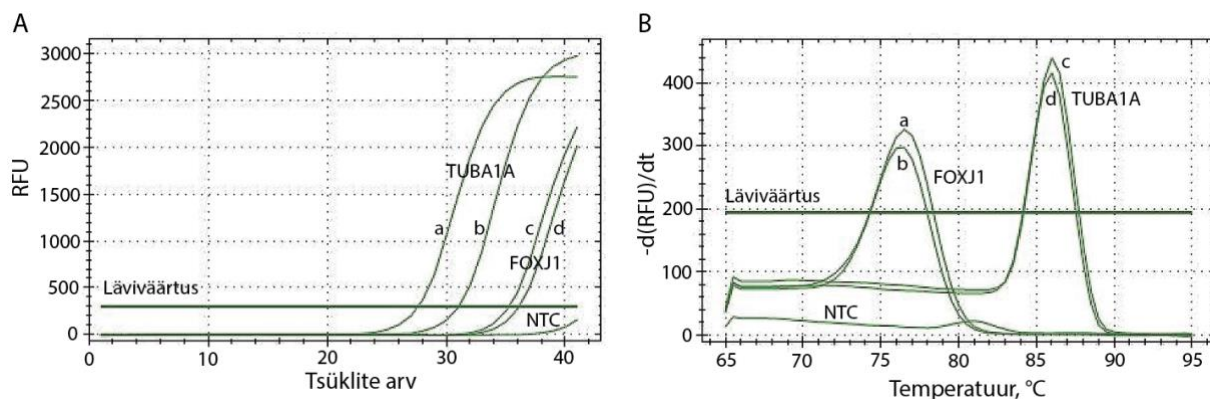
Termini jrk nr	Allikas	Termini ID	GO termin	$p_{adj}$
1	GO:MF	GO:0005125	Tsütokiinide aktiivsus	$4,664 \cdot 10^{-5}$
2	GO:BP	GO:0002376	Immuunsüsteemi protsess	$3,608 \cdot 10^{-5}$
3	GO:BP	GO:0048245	Eosinofiilide kemotaksis	$1,213 \cdot 10^{-3}$
4	GO:BP	GO:0001906	Rakutapmine	$8,707 \cdot 10^{-3}$
5	GO:BP	GO:0070098	Kemokiin-vahendatud signaalirada	$1,929 \cdot 10^{-2}$
6	GO:BP	GO:0036100	Leukotrieenide kataboolne protsess	$2,053 \cdot 10^{-2}$
7	GO:BP	GO:0030593	Neutrofiilide kemotaksis	$2,087 \cdot 10^{-2}$
8	GO:BP	GO:0030101	NK-rakkude aktivatsioon	$3,773 \cdot 10^{-2}$
9	GO:CC	GO:0071944	Raku perifeeria	$1,348 \cdot 10^{-3}$
10	GO:CC	GO:0097708	Rakusisene vesiikul	$2,169 \cdot 10^{-2}$
11	GO:CC	GO:0005615	Rakuväline ala	$3,193 \cdot 10^{-2}$

Terminid on nummerdatud Joonisel 18. Lühendid: adj – kohandatud (ingl. k. *adjusted*), BP – bioloogiline protsess, CC – rakuosa (ingl. k. *cellular compartment*), GO – geeniontoloogia, MF – molekulaarne funktsioon.

### 2.3.6. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon sorteeritud rakkudest pärit cDNA-ga

Sekveneerimistulemuste kinnitamiseks teostati qPCR kahele geenile (Joonis 20): *TUBA1A* ja *FOXJ1*. qPCR-i tulemusena selgus, et *TUBA1A* geeni signaali tase ületas läviväärtuse amplifitseerimistsüklil 31,02 (SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup>) ja 27,57 (SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup>) (Joonis 20A, vastavalt b ja a). *FOXJ1* signaali tase ületas läviväärtuse tsüklil 35,22 (SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup>) ja

36,08 (SiR-tubuliin+LhS28<sup>-</sup>) (Joonis 20A, vastavalt c ja d). See langeb kokku sekveneerimistulemustega, mille järgi ekspresseerub  $\alpha$ -tubuliini palju rohkem kui transkriptsioonifaktorit *FOXJ1*. Sulamiskõvera (Joonis 20B) kohaselt saadi õiged produktid, sest nende sulamistemperatuur langes kokku oodatava sulamistemperatuuriga (*TUBA1A* puhul 85-87 °C ja *FOXJ1* puhul 75-78 °C).



**Joonis 20. qPCR SiR-tubuliin+LhS28<sup>+</sup> ja SiR-tubuliin+LhS28<sup>-</sup> rakkude cDNA-ga. (A)** Amplifitseerimisgraafik *TUBA1A* ja *FOXJ1* geenidele (a ja d – SiR-tubuliin+LhS28<sup>+</sup>, b ja c – SiR-tubuliin+LhS28<sup>-</sup>). **(B)** Sulamiskõver (a ja d – SiR-tubuliin+LhS28<sup>+</sup>, b ja c – SiR-tubuliin+LhS28<sup>-</sup>). Lühendid: NTC – cDNA-ta kontroll (ingl. k. *no template control*), RFU – suhteline fluorestsents (ingl. k. *relative fluorescence units*).

## 2.4. Arutelu

Antud magistritöö raames uuriti, kuidas muudab vanus naise endomeetriumi ripsrakkude arvukust ning arendati välja meetod ripsrakkude geeniekspressiooni analüüsiks. Ripsrakud visualiseeriti ja loendati IHC meetodil, kasutades Ac-Tub- $\alpha$  märgistamist vastava antikehaga. Varasemalt on kasutatud sama antikeha ripsrakkude märgistamiseks nii munajuhas kui ka endomeetriumis (Coy et al., 2016; Yan et al., 2024), aga ka hingamisteedes (Bonser et al., 2021). Eelnevalt on kasutatud ripsrakkude märgistamiseks põhiliselt basaalkhade vastast antikeha (LhS28) (Comer et al., 1999; Horree et al., 2007). Kahe vanuselise grupi võrdlemisel leiti, et vanematel naistel (47-50 eluaastat) on ripsrakke võrreldes nooremate naistega (20-27 eluaastat) rohkem. Kuna ripsrakud on östrogeenist sõltuvad (More & Masterton, 1976), siis klapib rohkemate ripsrakkude esinemine teadmise, et vanematel menstrueerivatel naistel võib olla munasarja reservi kahanemisest tingitud kõrge E<sub>2</sub> tase (Burger et al., 2002; Fitzgerald et al., 1994; Reyes et al., 1977). Samuti on teada, et P<sub>4</sub> on ripsrakkudele vastupidine, arvukust kahandav mõju (Andrews, 1951). Lisaks on leitud, et P<sub>4</sub> omab antagonistlikku mõju E<sub>2</sub> retseptorite tootmisele (Anderson et al., 1977; Hsueh et al., 1975). Kuigi kõik patsiendid, kelle biopsiaid IHC jaoks kasutati, said hormoonasendusravi P<sub>4</sub>-ga, siis rohkemate ripsrakkude esinemine vanematel naistel viitab hoopis P<sub>4</sub> retseptorite vähenemisele või defektile. Tuleb silmas pidada, et kõikidele patsientidele (YMA1-11 ja AMA1-11) tehti beREADY test, mida kasutatakse endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks viljatuseprobleemidega naistel (Meltsov et al., 2023), mistõttu võib ripsrakkude arv olla tingitud mingist muust probleemist.

Endomeetriumi ripsrakkude geeniekspressiooni analüüsiks vajaliku meetodi väljaarendamiseks eraldati ripsrakud ülejäänud endomeetriumi rakkudest, kasutades FACS-i. Eelnevalt teostatud IHC kinnitas, et märgistusid õiged struktuurid – ripsrakkude ripsmed (täpsemalt  $\alpha$ -tubuliini atsetüleeritud K40). Geeniekspressiooni analüüsimise meetodina kasutati RNA sekveneerimist, kuid on teada, et enamasti kipub RNA rakkude fikseerimisel lagunema (Ding et al., 2004; Kashofer et al., 2013), mistõttu teostati algselt voolutsütomeetriline analüüs SiR-tubuliiniga. Viimane märgistab sarnaselt Ac-Tub- $\alpha$ -vastase antikehaga ripsrakkude  $\alpha$ -tubuliini (Lukinavičius et al., 2014).  $\alpha$ -tubuliini leidub ka teistes rakkudes, sh stroomarakkudes, kuid ripsrakkudes on neid oluliselt rohkem. Eraldamiseks mikrotorukestega epiteelirakud stroomarakkudest, kasutati lisaks EpCAM-vastast antikeha, mille sihtmärgiks on EpCAM ehk CD326 molekulid epiteelirakkude pinnal (Nguyen et al., 2018).

Vaatamata kahe markeri kasutamisele ei õnnestunud ripsrakke teistest rakkudest selgelt eraldada, sest lisaks ripsrakkudele märgistusid ka rakud, kus leidis vähemal määral mikrotorukest ja/või EpCAM. Seda kinnitas kolm tulemust. Esiteks leidis nii SiR-tubuliini kui ka EpCAM-vastase antikehaga märgistatud proovides ainult üksikuid SiR-tubuliin<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakke, mis tähendab, et SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakkude seas olid kõik epiteelirakud, kuid endomeetriumis ei ole kõik epiteelirakud ühtlasi ka ripsrakud. Teiseks esines nendes proovides lisaks SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakkudele ka palju SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> rakke, mis näitab, et SiR-tubuliin ei ole ainult ripsrakkude spetsiifiline. Kolmandaks oli SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> ja SiR-tubuliin<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> rakkude osakaal vastavalt isegi kuni 24,6% ja 89% kõigist rakkudest, kuid on teada, et kõige rohkem ripsrakke (kuni 20%) esineb vaid ovulatsiooni ajal (Masterton et al., 1975; More & Masterton, 1976). Antud töös kasutatud patsiendid said hormoonasendusravi P<sub>4</sub>-ga, mis imiteerib sekretoorset faasi, kui ripsrakke esineb kõige vähem (Masterton et al., 1975). Sekveneerimistulemuste põhjal võib arvata, et tõenäoliselt märgistas SiR-tubuliin ka stroomarakke, mis on kooskõlas varasemate andmetega (Huet-Calderwood et al., 2022), aga ka immuunrakke. EpCAM-i leidub kirjanduse kohaselt ka mõningatel vähirakkudel (Jenkins et al., 2017). Seetõttu jätkati sobiva markeri otsimist ja prooviti järgmisena kasutada kombinatsiooni Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastasest antikehast.

Ac-Tub- $\alpha$ -vastase antikehaga märgistatud rakke võrreldi SiR-tubuliiniga märgistatutega, millest selgus, et viimane märgistab samuti lisaks ripsrakkudele ka teisi rakke, kus esineb atsetüleeritud K40 (kuni 34,3% kõigist rakkudest). Seepärast kasutati lisaks Ac-Tub- $\alpha$ -vastasele antikehale tsiliogeneesi olulist transkriptsioonifaktorit FOXJ1, kuid selleks tuli rakud fikseerida. Ac-Tub- $\alpha$ -vastase antikehaga märgistatud ja sorteeritud rakke on fikseeritud paraformaldehüüdiga (Bonser et al., 2021), kuid pidades silmas RNA kvaliteeti, prooviti antud töös kasutada tsinkfiksaatorit, mis ei tekita ristsidemeid ega ole toksiline, olles seetõttu "pehmem" fiksaator (Lykidis et al., 2007). Võrdlusena kasutati formaliiniga fikseeritud rakke ja kummagi fiksaatori puhul saadi sarnane tulemus, mistõttu fikseeriti sorteeritavad rakud tsingiühenditega. Ac-Tub- $\alpha$ <sup>+</sup>FOXJ1<sup>+</sup> rakkude protsent oli küll vastav menstruaaltsükli sekretoorsele faasile, kuid sekveneerimisel saadud tulemustest selgus, et tsinkfiksaatoriga ei õnnestunud rakkudest piisavalt RNA-d eraldada ja/või oli RNA lagunenud. On võimalik, et kasutatud kommertsiaalne cDNA raamatukogu valmistamise komplekt ei sobinud fikseeritud rakkude RNA-st raamatukogu tegemiseks kõige paremini ja fikseeritud rakkude RNA

sekveneerimiseks võiks edaspidi eraldada RNA spetsiaalselt fikseeritud rakkudele ettenähtud meetodiga (Hrvatin et al., 2014).

Veel üks meetod ripsrakkude märgistamiseks on kasutada ripsraku basaalkoha vastast antikeha (LhS28). Eelnevalt on kasutatud ripsrakkude basaalkohade märgistamiseks antikeha LhS28, kuid seda on tehtud peamiselt fikseeritud rakkudega (Comer et al., 1999; Horree et al., 2007). Basaalkoha on ripsraku sisse jääv struktuur ja antikehad elusa raku membraani üldjuhul ei läbi. Siiski on ühes katses näidatud, et LhS28 võimaldab sorteerida elusaid munajuha ripsrakke neid eelnevalt fikseerimata (Liu et al., 2015). Fikseerimise ärajätmine lihtsustab ja lühendab rakkude ettevalmistamise protseduuri ning võimaldab saada koest rohkem intaktse RNA-ga rakke, mistõttu teostati voolutsütomeetriline analüüs LhS28-ga elusatel endomeetriumi ripsrakkudel. Analüüsist selgus, et LhS28 sobib märgistama ka elusaid endomeetriumi ripsrakke. Selle taga olev mehhanism ei ole selge, sest kuigi basaalkohad on raku apikaalsele pinnale üsna lähedal ja kinnituvad membraanile, siis on need ikkagi rakusisesed struktuurid. On võimalik, et ainult LhS28-ga märgistuvad sellised ripsrakud, millel on basaalkoha juba raku apikaalsele poolele kinnitatud, kuid aksoneemi alles hakatakse ehitama.

SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkude sekveneerimine kinnitas ripsrakkude geeniekspressiooni profiili. Kõrgelt olid ekspresseerunud ripsmete ja viburitega seotud valkude (*CFAP*), viburisesse transpordi (*IFT*), tubuliinide (*TUBA*, *TUBB*), tektiini (*TEKT*), „rattakodaraid meenutavate“ struktuuride (*ingl. k. radial spokes, RSPH*) ja aksoneemi düneiini (*DNAH*, *DNAI*, *DNAL*) geenid. Üldjuhul ekspresseeriti vaadeldud geene kõrgemalt SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes, mis on seletatav suurema rakkude arvuga. Samas ekspresseerus ripsrakkude-spetsiifiline transkriptsioonifaktor *FOXJ1* (Bonser et al., 2021; Patir et al., 2020), aga ka epiteelirakkude markerid *EpCAM* (Haider et al., 2019a), *CD9* (K. R. Park et al., 2000) ja *KRT8* (Haider et al., 2019a; Kirkwood et al., 2022) kõrgemalt just SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes, mis viitab lisaks ripsrakkudele (ja epiteelirakkudele) ka muude rakkude esinemisele SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkude seas. SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes ekspresseeriti strooma fibroblasti markerit *DCN*, mis SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes aga puudus (Ono et al., 2014; Yanaihara et al., 2004, 2005), kinnitades, et SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkude seas ei olnud ainult epiteelirakud. Analüüsides aga hoopis selliseid geene, mis SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkudes olid ekspresseeritud, SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> rakkudes aga puudusid või olid väga madalalt ekspresseeritud, selgus, et

need geenid on seotud immuunsüsteemi signaaliradadega. Varasemalt on immuunrakkudest SiR-tubuliiniga märgistatud nt mikrogliat (Sanchini et al., 2023) ja makrofaage (Seta et al., 2023). SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>+</sup> ja et SiR-tubuliin<sup>+</sup>LhS28<sup>-</sup> rakkude cDNA-le teostatud qPCR kinnitas ripsrakkude olemasolu mõlemas sorteeritud populatsioonis ja ühtlasi ka seda, et  $\alpha$ -tubuliini on võrreldes FOXJ1-ga rohkem.

Väljatöötatud meetodikat endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks saab edaspidi kasutada nooremate ja vanemate naiste ripsrakkude geeniekspressiooni profiili võrdlemiseks, sest on leitud, et vanematel naistel on endomeetriumi täiskoe geeniekspressiooni profiilis ülesreguleeritud epiteeli ripsrakkudega seotud geenid (Devesa-Peiro et al., 2022), kuid ei ole teada, kas see on tingitud suurenenud ripsrakkude arvust või toimuvad ripsrakkudes vanusega seotud muutused. Käesolevas töös näidati, et vanematel naistel on endomeetriumis rohkem ripsrakke, kuid üksiku ripsraku geeniekspressiooni uurimiseks tuleks lisaks kasutusele võtta üksikraku RNA sekveneerimine (ingl. k. *single-cell RNA sequencing*). Sarnane katse on varasemalt läbi viidud võrdlemaks tervete ja korduva implantatsiooni ebaõnnestumisega (ingl. k. *recurrent implantation failure* ehk RIF) patsientide endomeetriumi rakupopulatsioonidest pärit üksikuid rakke (sh ripsrakke) (Lai et al., 2022). Tulemusena leiti, et RIF patsientidel esineb muutusi rakkude arvukuses, aga ka endomeetriimirakkude geeniekspressioonis. Seepärast ei ole võimatu, et ka vanuse kasvades muutub endomeetriumi ripsrakkude enda geeniekspressioon. Siiski ei sorteerinud Lai *et al.* ripsrakke voolutsütomeetria abil, vaid järeldused tehti sekveneerimistulemustest, kuna puudus hea meetod endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks muust koest.

Antud magistritöös oli kohati probleemiks liiga vähene rakkude arv proovis, mis võis tulla nii patsiendi enda eripärast (täheldati kindlaid patsiente, kelle puhul saadi vähem rakke) kui ka biopsiate kvaliteedist (kasutati juba eelnevalt muuks eesmärgiks kogutud biopsiaid). Lisaks oli raske saada just endomeetriumi näärmetest eraldiseisvaid rakke, sest need kippusid kokku kleepuma ja seetõttu filtrisse kinni jääma, kuid seda probleemi on esinenud ka teistel (Lai et al., 2022). Vaatamata mõningatele puudustele õnnestus käesoleva tööga püstitatud eesmärgid täita. Katsete tulemusena selgus, et vanematel naistel on võrreldes noorematega endomeetriumis rohkem ripsrakke. Teiseks eesmärgiks oli välja töötada meetodika endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks muust endomeetriumi koest ning selgus, et sobivaim viis selleks on ripsrakkude märgistamine SiR-tubuliini ja LhS28-ga. Meetodikat on

plaanis edaspidi kasutada endomeetriumi ripsrakkude uurimiseks ühe raku tasandil, mis pikemas perspektiivis võib viia seosteni ripsrakkude arvukuse ja nende geeniekspressiooni profiili ning viljatuse vahel. Lisaks võimaldab väljatöötatud meetodika uurida ripsrakke ka seoses teiste endomeetriumiga seotud haiguste ja häiretega.

## KOKKUVÕTE

Tänapäeval on naise reproduktiivsüsteemi vananemine oluline viljatuse põhjustaja. Vanusega seotud muutused naise reproduktiivsüsteemis toimuvad nii hormonaalsel, rakulisel kui ka molekulaarsel tasandil. On leitud, et vanematel naistel on endomeetriumis ülesreguleeritud ripsrakkudega seotud geenid, kuid ei ole teada, kas see on põhjustatud ripsrakkude arvu muutusest või toimuvad vanusega seotud muutused ka ripsrakus endas. Tänapäevaks ei ole head meetodit ripsrakkude eraldamiseks, mis võimaldaks uurida ripsrakkude geeniekspressiooni profiili. Sellest tulenevalt oli käesoleva magistritöö üheks eesmärgiks välja selgitada, kas vanematel reproduktiivses eas naiste ripsrakkude arv erineb noorte naiste omast. Teiseks eesmärgiks oli välja töötada meetod endomeetriumi ripsrakkude eraldamiseks teistest endomeetriumi rakkudest.

Töö tulemustele tuginedes tehti järgmised järeldused:

- 1) Vanematel naistel on  $\mu\text{m}^2$  endomeetriumi luminaalepiteeli kohta keskmiselt 0,00082 (41,6%) ripsrakku rohkem kui noorematel naistel.
- 2) Atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliini vastased antikehad on sobilikud ripsrakkude visualiseerimiseks immunohistokeemiliselt, kuid mitte ripsrakkude eraldamiseks voolutsütomeetriliselt eraldi kasutatuna.
- 3) Sobiv meetod ripsrakkude eraldamiseks muudest endomeetriumi rakkudest on elusate ripsrakkude märgistamine SiR-tubuliini ja LhS28-ga, mida kinnitas visuaalselt immunofluorestsentsanalüüs. Lisaks võimaldab selline ripsrakkude eraldamise meetod saada sekveneerimiseks piisavas koguses kvaliteetset RNA-d.

Kokkuvõtteks selgus käesoleva töö katsete käigus, et vanematel naistel on endomeetriumis ripsrakke võrreldes nooremate naistega rohkem. Ripsrakkude geeniekspressiooni profiili uurimiseks töötati välja meetod ripsrakkude fluorestsents-aktiveeritud sorteerimiseks ülejäänud endomeetriumi koest. Töö edasiarenduseks on võimalik kasutada väljatöötatud meetodikat nooremate ja vanemate naiste ripsrakkude geeniekspressiooni profiili erinevuste väljaselgitamiseks, mis võiks anda olulist teavet reproduktiivbioloogiliste protsesside mõistmisel.

## SUMMARY

### **Epithelial ciliated cells in the endometrium of young and older women of reproductive age: immunohistological analysis and development of a new methodology of analysis**

Arina Laanemets

Although the 20s are considered to be the most fertile years of woman's life, in today's modern society family planning has been postponed until 30-40 years of life. Age is the most important factor of infertility. Although assisted reproductive technologies allow to select high-quality oocytes/embryos or use donor eggs, the probability of successful implantation is lower in older women. This suggests that molecular and/or cellular changes occur in the endometrium with age, which reduce endometrial receptivity.

In order to find out whether the abundance of ciliated cells in endometrial epithelium changes with age, immunohistochemical (IHC) method using an antibody against acetylated  $\alpha$ -tubulin was conducted. Biopsies were collected from anonymous women with infertility problems on the 5th day (P+5) of progesterone administration, which corresponds to the window of implantation, and endometrial response to progesterone treatment was confirmed by analysis of receptivity markers. Endometrial biopsies from four volunteers were used to isolate ciliated cells by flow cytometry, which were obtained on days 1-2 (LH+1-2) and 7 (LH+7) after LH surge in natural cycles. Tissues were labelled with ciliated cell specific antibodies. RNA from ciliated cells isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) was sequenced. Sequencing results were confirmed by qPCR. The specificity of the markers used in FACS was confirmed by immunofluorescence (IF).

Labelling endometrial ciliated cells with an antibody against acetylated  $\alpha$ -tubulin is a suitable method for visualizing ciliated cells, but when used alone is not optimal for fluorescence-activated cell analysis. As a result of IHC analysis, it was found that older women have an average of 0.00082 (41.6%) more ciliated cells per  $\mu\text{m}^2$  of endometrial luminal epithelium than younger women. The most efficient method to isolate ciliated cells for gene expression analysis was the labelling of live cells with SiR-tubulin (a silicon rhodamine and doxetaxel based probe that labels  $\alpha$ -tubulin) and LhS28, an antibody against ciliated basal bodies. IF confirmed the specificity of the LhS28 antibody compared to FOXJ1, an intracellular marker of

cilia. Flow cytometric analysis confirmed the suitability of the LhS28 antibody for live ciliated cell sorting. RNA sequencing confirmed the gene expression profile of sorted ciliated cells.

The results showed that one cellular difference in the endometrium of younger and older women is the proportions of ciliated cells. Impaired receptivity in older women may be due to an increase in the number of, as well as abnormal development of endometrial ciliated cells. The developed specific method for the separation of endometrial ciliated cells from other tissue will allow to compare the gene expression profile of ciliated cells in younger and older women at the single cell level and also in other endometrial pathologies.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänu avaldada oma juhendajatele Marina Loid, Keiu Kask ja Tambet Tõnissoo. Olen tänulik, et nad olid alati valmis juhiseid andma, selgitama ja abistama. Minu tänusõnad lähevad ka Andres Salumetsale ja Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse AS toetavale kollektiivile. Soovin tänada Vijayachitra Modhukur'i, kes aitas mind sekveneerimistulemuste analüüsimisega, ja Dmitri Lubenetsi, kes jagas teadmisi rakkude sorteerimisel ning opereeris voolutsütomeetriga.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdalla, H. I., Wren, M. E., Thomas, A., & Korea, L. (1997). Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor. *Human Reproduction*, *12*(4), 827–829. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.4.827>
- Abuwala, N., & Tal, R. (2021). Endometrial stem cells: Origin, biological function, and therapeutic applications for reproductive disorders. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *33*(3), 232–240. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000702>
- Ali, S., Balachandran, K., & O'Malley, B. (2020). 90 Years of progesterone: Ninety years of progesterone: the 'other' ovarian hormone. *Journal of Molecular Endocrinology*, *65*(1), E1–E4. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0145>
- Allen, W. M., & Corner, G. W. (1929). Physiology of the corpus luteum. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *88*(2), 340–346. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1929.88.2.340>
- Altmäe, S., Koel, M., Võsa, U., Adler, P., Suhorutšenko, M., Laisk-Podar, T., Kukushkina, V., Saare, M., Velthut-Meikas, A., Krjutškov, K., Aghajanova, L., Lalitkumar, P. G., Gemzell-Danielsson, K., Giudice, L., Simón, C., & Salumets, A. (2017). Meta-signature of human endometrial receptivity: A meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Scientific Reports*, *7*(1), 10077. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10098-3>
- Ambildhuke, K., Pajai, S., Chimegave, A., Mundhada, R., & Kabra, P. (2022). A Review of Tubal Factors Affecting Fertility and its Management. *Cureus*, *14*(11), e30990. <https://doi.org/10.7759/cureus.30990>
- Ameer, M. A., Fagan, S. E., Sosa-Stanley, J. N., & Peterson, D. C. (2022). Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470297/>
- Anderson, W. A., Desombre, E. R., & Kang, Y.-H. (1977). Estrogen-Progesterone Antagonism with Respect to Specific Marker Protein Synthesis and Growth by the Uterine Endometrium<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *16*(3), 409–419. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.3.409>
- Andersson, S., Bishop, R. W., & Russell, D. W. (1989). Expression Cloning and Regulation of Steroid 5 $\alpha$ -Reductase, an Enzyme Essential for Male Sexual Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(27), 16249–16255.
- Andrews, M. C. (1951). Epithelial changes in the puerperal Fallopian tube. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, *62*(1), 28–37. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(51\)91088-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(51)91088-5)
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G. M., Giampietro, F., Palumbo, P., & Di Ilio, C. (2006). Proteome analysis of human follicular

- fluid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(11), 1775–1785. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.09.001>
- Austin, C. R. (1952). The ‘Capacitation’ of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170(4321), 326–326. <https://doi.org/10.1038/170326a0>
- Bianchi, V. E., Bresciani, E., Meanti, R., Rizzi, L., Omeljaniuk, R. J., & Torsello, A. (2021). The role of androgens in women’s health and wellbeing. *Pharmacological Research*, 171, 105758. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105758>
- Bonavina, G., & Taylor, H. S. (2022). Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2022.1020827>
- Bonser, L. R., Koh, K. D., Johansson, K., Choksi, S. P., Cheng, D., Liu, L., Sun, D. I., Zlock, L. T., Eckalbar, W. L., Finkbeiner, W. E., & Erle, D. J. (2021). Flow-Cytometric Analysis and Purification of Airway Epithelial-Cell Subsets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 64(3), 308–317. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0149MA>
- Borodkina, A. V., Deryabin, P. I., Giukova, A. A., & Nikolsky, N. N. (2018). “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10(1), 4–14.
- Brauning, A., Rae, M., Zhu, G., Fulton, E., Admasu, T. D., Stolzing, A., & Sharma, A. (2022). Aging of the Immune System: Focus on Natural Killer Cells Phenotype and Functions. *Cells*, 11(6), 1017. <https://doi.org/10.3390/cells11061017>
- Brighton, P. J., Maruyama, Y., Fishwick, K., Vrljicak, P., Tewary, S., Fujihara, R., Muter, J., Lucas, E. S., Yamada, T., Woods, L., Lucciola, R., Hou Lee, Y., Takeda, S., Ott, S., Hemberger, M., Quenby, S., & Brosens, J. J. (2017). Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *eLife*, 6, e31274. <https://doi.org/10.7554/eLife.31274>
- Brody, S. L., Yan, X. H., Wuerffel, M. K., Song, S.-K., & Shapiro, S. D. (2000). Ciliogenesis and Left–Right Axis Defects in Forkhead Factor HFH-4–Null Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(1), 45–51. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.1.4070>
- Broom, T. J., Matthews, C. D., Cooke, I. D., Ralph, M. M., Seamark, R. F., & Cox, L. W. (1981). Endocrine profiles and fertility status of human menstrual cycles of varying follicular phase length. *Fertility and Sterility*, 36(2), 194–200. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)45678-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)45678-5)
- Burger, Cahir, Robertson, Groome, Dudley, Green, & Dennerstein. (1998). Serum Inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clinical Endocrinology*, 48(6), 809–813. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1998.00482.x>
- Burger, H. G., Dudley, E. C., Robertson, D. M., & Dennerstein, L. (2002). Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 257–275. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.257>

- Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA*, 326(1), 65–76. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>
- Chan, R. W. S., Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2004). Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Biology of Reproduction*, 70(6), 1738–1750. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109>
- Chemerinski, A., Garcia de Paredes, J., Blackledge, K., Douglas, N. C., & Morelli, S. S. (2024). Mechanisms of endometrial aging: Lessons from natural conceptions and assisted reproductive technology cycles. *Frontiers in Physiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1332946>
- Chen, J., Knowles, H. J., Hebert, J. L., & Hackett, B. P. (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1077–1082.
- Cole, D. G., Diener, D. R., Himelblau, A. L., Beech, P. L., Fuster, J. C., & Rosenbaum, J. L. (1998). Chlamydomonas Kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in *Caenorhabditis elegans* Sensory Neurons. *The Journal of Cell Biology*, 141(4), 993–1008.
- Comer, M. T., Shires, M., Goode, N. P., Leese, H. J., Trejdosiewicz, L. K., & Southgate, J. (1999). Expression of an Antigen Associated with Basal Bodies of Human Ciliated Epithelial Cells. *The Histochemical Journal*, 31(1), 39–43. <https://doi.org/10.1023/A:1003470113851>
- Cooke, P. S., Spencer, T. E., Bartol, F. F., & Hayashi, K. (2013). Uterine glands: Development, function and experimental model systems. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 547–558. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat031>
- Coutifaris, C., Myers, E. R., Guzick, D. S., Diamond, M. P., Carson, S. A., Legro, R. S., McGovern, P. G., Schlaff, W. D., Carr, B. R., Steinkampf, M. P., Silva, S., Vogel, D. L., & Leppert, P. C. (2004). Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertility and Sterility*, 82(5), 1264–1272. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.03.069>
- Coy, S., Du, Z., Sheu, S.-H., Woo, T., Rodriguez, F. J., Kieran, M. W., & Santagata, S. (2016). Distinct patterns of primary and motile cilia in Rathke's cleft cysts and craniopharyngioma subtypes. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(12), 1446–1459. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.153>
- Crow, J., Amso, N. N., Lewin, J., & Shaw, R. W. (1994). Physiology: Morphology and ultrastructure of Fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. *Human Reproduction*, 9(12), 2224–2233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138428>
- Danforth, D. R., Arbogast, L. K., Mroueh, J., Kim, M. H., Kennard, E. A., Seifer, D. B., & Friedman, C. I. (1998). Dimeric inhibin: A direct marker of ovarian aging. *Fertility and Sterility*, 70(1), 119–123. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00127-7)

- Davis, S. R., Lambrinoudaki, I., Lumsden, M., Mishra, G. D., Pal, L., Rees, M., Santoro, N., & Simoncini, T. (2015). Menopause. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.4>
- de Kat, A. C., van der Schouw, Y. T., Eijkemans, M. J. C., Herber-Gast, G. C., Visser, J. A., Verschuren, W. M. M., & Broekmans, F. J. M. (2016). Back to the basics of ovarian aging: A population-based study on longitudinal anti-Müllerian hormone decline. *BMC Medicine*, 14, 151. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0699-y>
- Dennett, C. C., & Simon, J. (2015). The Role of Polycystic Ovary Syndrome in Reproductive and Metabolic Health: Overview and Approaches for Treatment. *Diabetes Spectrum : A Publication of the American Diabetes Association*, 28(2), 116–120. <https://doi.org/10.2337/diaspect.28.2.116>
- Deryabin, P., Griukova, A., Nikolsky, N., & Borodkina, A. (2020). The link between endometrial stromal cell senescence and decidualization in female fertility: The art of balance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(7), 1357–1370. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03374-0>
- Devesa-Peiro, A., Sebastian-Leon, P., Parraga-Leo, A., Pellicer, A., & Diaz-Gimeno, P. (2022). Breaking the ageing paradigm in endometrium: Endometrial gene expression related to cilia and ageing hallmarks in women over 35 years. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 37(4), 762–776. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac010>
- Di Guardo, F., Della Corte, L., Vilos, G. A., Carugno, J., Török, P., Giampaolino, P., Manchanda, R., & Vitale, S. G. (2020). Evaluation and treatment of infertile women with Asherman syndrome: An updated review focusing on the role of hysteroscopy. *Reproductive BioMedicine Online*, 41(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.03.021>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d’Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Didon, L., Zwick, R. K., Chao, I. W., Walters, M. S., Wang, R., Hackett, N. R., & Crystal, R. G. (2013). RFX3 Modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respiratory Research*, 14(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-70>
- Ding, J., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., & Shimada, H. (2004). Effect of formalin on extraction of mRNA from a formalin-fixed sample: A basic investigation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.1080/00365510410005758>
- Fitzgerald, C. T., Seif, M. W., Killick, S. R., & Elstein, M. (1994). Age related changes in the female reproductive cycle. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101(3), 229–233. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1994.tb13115.x>
- Fleming, S., Tweeddale, D. N., & Roddick, J. W. (1968). Ciliated endometrial cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 102(2), 186–191. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(68\)90317-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(68)90317-7)

- Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility*, *101*(3), 656-663.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.004>
- Ganeva, R., Parvanov, D., Handzhiyska, M., Vidolova, N., Arsov, K., Decheva, I., & Stamenov, G. (2021). IMMUNE CELLS IN THE ENDOMETRIUM DURING MID-LUTEAL PHASE. *Fertility and Sterility*, *116*(3), e113. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.07.315>
- Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews*, *35*(6), 851–905. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1045>
- Gougeon, A., & Chainy, G. B. N. (1987). Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Reproduction*, *81*(2), 433–442. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810433>
- Griffin, J. E. (1979). *Androgen resistance syndromes*. <https://utswmed-ir.tdl.org/server/api/core/bitstreams/dfda3c16-2852-400e-b975-ef4b3f0a4e7c/content>
- Grodin, J. M., Siiteri, P. K., & MacDonald, P. C. (1973). Source of Estrogen Production in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *36*(2), 207–214. <https://doi.org/10.1210/jcem-36-2-207>
- Gupta, P., Banker, M., Patel, P., & Joshi, B. (2012). A study of recipient related predictors of success in oocyte donation program. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *5*(3), 252–257. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.106336>
- Haider, S., Gamperl, M., Burkard, T. R., Kunihs, V., Kaindl, U., Junttila, S., Fiala, C., Schmidt, K., Mendjan, S., Knöfler, M., & Latos, P. A. (2019a). Estrogen Signaling Drives Ciliogenesis in Human Endometrial Organoids. *Endocrinology*, *160*(10), 2282–2297. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00314>
- Haider, S., Gamperl, M., Burkard, T. R., Kunihs, V., Kaindl, U., Junttila, S., Fiala, C., Schmidt, K., Mendjan, S., Knöfler, M., & Latos, P. A. (2019b). Estrogen Signaling Drives Ciliogenesis in Human Endometrial Organoids. *Endocrinology*, *160*(10), 2282–2297. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00314>
- Hart, R. J. (2016). Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological Reviews*, *96*(3), 873–909. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2015>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *25*(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Henriet, P., Gaide Chevonnay, H. P., & Marbaix, E. (2012). The endocrine and paracrine control of menstruation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *358*(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.042>

- Hetemäki, N., Savolainen-Peltonen, H., Tikkanen, M. J., Wang, F., Paatela, H., Hämäläinen, E., Turpeinen, U., Haanpää, M., Vihma, V., & Mikkola, T. S. (2017). Estrogen Metabolism in Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *102*(12), 4588–4595. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01474>
- Holesh, J. E., Bass, A. N., & Lord, M. (2024). Physiology, Ovulation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/>
- Hong, I.-S. (2023). Endometrial stem/progenitor cells: Properties, origins, and functions. *Genes & Diseases*, *10*(3), 931–947. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.08.009>
- Horree, N., Heintz, A. P. M., Sie-Go, D. M. D. S., & van Diest, P. J. (2007). P16 is Consistently Expressed in Endometrial Tubal Metaplasia. *Analytical Cellular Pathology*, *29*, 37–45. <https://doi.org/10.1155/2007/868952>
- Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C. W., Gifford, D. K., & Melton, D. A. (2014). MARIS: Method for Analyzing RNA following Intracellular Sorting. *PLoS ONE*, *9*(3), e89459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089459>
- Hsueh, A. J. W., Peck, E. J., & Clark, J. H. (1975). Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature*, *254*(5498), 337–339. <https://doi.org/10.1038/254337a0>
- Hudson, Q. J., Ashjaei, K., Perricos, A., Kuessel, L., Husslein, H., Wenzl, R., & Yotova, I. (2020). Endometriosis Patients Show an Increased M2 Response in the Peritoneal CD14+low/CD68+low Macrophage Subpopulation Coupled with an Increase in the T-helper 2 and T-regulatory Cells. *Reproductive Sciences*, *27*(10), 1920–1931. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00211-9>
- Huet-Calderwood, C., Rivera-Molina, F. E., Toomre, D. K., & Calderwood, D. A. (2022). Fibroblasts secrete fibronectin under lamellipodia in a microtubule- and myosin II-dependent fashion. *The Journal of Cell Biology*, *222*(2), e202204100. <https://doi.org/10.1083/jcb.202204100>
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3085>
- Jabrane-Ferrat, N. (2019). Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01397>
- Jenkins, S. V., Nima, Z. A., Vang, K. B., Kannarpady, G., Nedosekin, D. A., Zharov, V. P., Griffin, R. J., Biris, A. S., & Dings, R. P. M. (2017). Triple-negative breast cancer targeting and killing by EpCAM-directed, plasmonically active nanodrug systems. *NPJ Precision Oncology*, *1*(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0030-1>
- Kashofer, K., Viertler, C., Pichler, M., & Zatloukal, K. (2013). Quality Control of RNA Preservation and Extraction from Paraffin-Embedded Tissue: Implications for RT-PCR and Microarray Analysis. *PLOS ONE*, *8*(7), e70714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070714>

- Kim, H. K., Cho, S., Choi, Y. S., Lee, B. S., Kim, S., Kim, H. O., & Park, J. H. (2023). Human Endometrium Derived Induced Pluripotent Stem Cells Are Amenable to Directed Erythroid Differentiation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 20(6), 939. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00554-9>
- Kim, S.-M., & Kim, J.-S. (2017). A Review of Mechanisms of Implantation. *Development & Reproduction*, 21(4), 351–359. <https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.4.351>
- Kirkwood, P. M., Gibson, D. A., Shaw, I., Dobie, R., Kelepouri, O., Henderson, N. C., & Saunders, P. T. (2022). Single-cell RNA sequencing and lineage tracing confirm mesenchyme to epithelial transformation (MET) contributes to repair of the endometrium at menstruation. *eLife*, 11, e77663. <https://doi.org/10.7554/eLife.77663>
- Kitaya, K., Yasuda, J., Yagi, I., Tada, Y., Fushiki, S., & Honjo, H. (2000). IL-15 Expression at Human Endometrium and Decidua. *Biology of Reproduction*, 63(3), 683–687. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.683>
- Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Adler, P., Vilo, J., & Peterson, H. (2023). g:Profiler— Interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W207–W212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad347>
- Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P., & Rosenbaum, J. L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Cell Biology*, 90, 5519–5523. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5519>
- Kukushkina, V., Modhukur, V., Suhorutšenko, M., Peters, M., Mägi, R., Rahmioglu, N., Velthut-Meikas, A., Altmäe, S., Esteban, F. J., Vilo, J., Zondervan, K., Salumets, A., & Laisk-Podar, T. (2017). DNA methylation changes in endometrium and correlation with gene expression during the transition from pre-receptive to receptive phase. *Scientific Reports*, 7, 3916. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03682-0>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: An evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), 508–520. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa213>
- Lai, Z.-Z., Wang, Y., Zhou, W.-J., Liang, Z., Shi, J.-W., Yang, H.-L., Xie, F., Chen, W.-D., Zhu, R., Zhang, C., Mei, J., Zhao, J.-Y., Ye, J.-F., Zhang, T., & Li, M.-Q. (2022). Single-cell transcriptome profiling of the human endometrium of patients with recurrent implantation failure. *Theranostics*, 12(15), 6527–6547. <https://doi.org/10.7150/thno.74053>
- Levanon, K. (2010). *Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis*.
- Li, M., Song, J., Zhao, Y., Wu, S., Liu, H., Tang, R., & Yan, L. (2017). Fertility outcomes in infertile women with complex hyperplasia or complex atypical hyperplasia who received progestin therapy and in vitro fertilization. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 18(11), 1022–1025. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600523>

- Liu, Y., Qiang, W., Xu, X., Dong, R., Karst, A. M., Liu, Z., Kong, B., Drapkin, R. I., & Wei, J.-J. (2015). Role of miR-182 in response to oxidative stress in the cell fate of human fallopian tube epithelial cells. *Oncotarget*, *6*(36), 38983–38998.
- Longcope, C., Kato, T., & Horton, R. (1969). Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *Journal of Clinical Investigation*, *48*(12), 2191–2201.
- Lucas, E. S., Vrljicak, P., Muter, J., Diniz-da-Costa, M. M., Brighton, P. J., Kong, C.-S., Lipecki, J., Fishwick, K. J., Odendaal, J., Ewington, L. J., Quenby, S., Ott, S., & Brosens, J. J. (2020). Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window. *Communications Biology*, *3*, 37. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0763-1>
- Lukinavičius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Göttfert, F., Ta, H., Güther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., Blaukopf, C., Sommer, C., Gerlich, D. W., Arndt, H.-D., Hell, S. W., & Johnsson, K. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods*, *11*(7), 731–733. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2972>
- Lykidis, D., Noorden, S., Armstrong, A., Spencer-Dene, B., Li, J., Zhuang, Z., & Stamp, G. (2007). Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Research*, *35*, e85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm433>
- Lyons, R. A., Djahanbakhch, O., Mahmood, T., Saridogan, E., Sattar, S., Sheaff, M. T., Naftalin, A. A., & Chenoy, R. (2002). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Human Reproduction*, *17*(3), 584–588. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.584>
- Magoffin, D. A., & Weitsman, S. R. (1994). Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Luteinizing Hormone (LH) Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression and LH-Stimulated Signal Transduction in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells1. *Biology of Reproduction*, *51*(4), 766–775. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.4.766>
- Manocha, A., Kankra, M., Singla, P., Sharma, A., Ahirwar, A. K., & Bhargava, S. (2018). Clinical significance of reproductive hormones. *Current Medicine Research and Practice*, *8*(3), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.cmrp.2018.05.006>
- Marieb, E., & Hoehn, K. (2010). The Reproductive System. In *Human Anatomy & Physiology* (8th ed., p. 1045).
- Masterton, R., Armstrong, E. M., & More, I. a. R. (1975). THE CYCLICAL VARIATION IN THE PERCENTAGE OF CILIATED CELLS IN THE NORMAL HUMAN ENDOMETRIUM. *Reproduction*, *42*(3), 537–540. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420537>
- McGrath, E., Ryan, E. J., Lynch, L., Golden-Mason, L., Mooney, E., Eogan, M., O'Herlihy, C., & O'Farrelly, C. (2009). Changes in Endometrial Natural Killer Cell Expression of CD94, CD158a and CD158b are Associated with Infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, *61*(4), 265–276. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00688.x>
- Melnick, A. P., & Rosenwaks, Z. (2018). Oocyte donation: Insights gleaned and future challenges. *Fertility and Sterility*, *110*(6), 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.09.021>

- Meltsov, A., Saare, M., Teder, H., Paluoja, P., Arffman, R. K., Piltonen, T., Laudanski, P., Wielgoś, M., Gianaroli, L., Koel, M., Peters, M., Salumets, A., Krjutškov, K., & Palta, P. (2023). Targeted gene expression profiling for accurate endometrial receptivity testing. *Scientific Reports*, *13*, 13959. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40991-z>
- Miao, Y.-L., Kikuchi, K., Sun, Q.-Y., & Schatten, H. (2009). Oocyte aging: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, *15*(5), 573–585. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp014>
- Mizuno, N., Taschner, M., Engel, B. D., & Lorentzen, E. (2012). Structural Studies of Ciliary Components. *Journal of Molecular Biology*, *422*(2), 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.040>
- Moghadam, A. R. E., Moghadam, M. T., Hemadi, M., & Saki, G. (2022). Oocyte quality and aging. *JBRA Assisted Reproduction*, *26*(1), 105–122. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20210026>
- Moon, Y. S., Tsang, B. K., Simpson, C., & Armstrong, D. T. (1978). 17 beta-Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: Stimulation by follicle-stimulating hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *47*(2), 263–267. <https://doi.org/10.1210/jcem-47-2-263>
- More, I. a. R., & Masterton, R. G. (1976). The role of oestrogen in the control of ciliated cells of the human endometrium. *Reproduction*, *47*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0470019>
- Mulholland, J., & Jones, C. J. P. (1993). Characteristics of uterine aging. *Microscopy Research and Technique*, *25*(2), 148–168. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070250207>
- Murray, M. J., Meyer, W. R., Zaino, R. J., Lessey, B. A., Novotny, D. B., Ireland, K., Zeng, D., & Fritz, M. A. (2004). A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and Sterility*, *81*(5), 1333–1343. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.030>
- Muter, J., Lynch, V. J., McCoy, R. C., & Brosens, J. J. (2023). Human embryo implantation. *Development (Cambridge, England)*, *150*(10), dev201507. <https://doi.org/10.1242/dev.201507>
- Navot, D., Drews, M. R., Bergh, P. A., Guzman, I., Karstaedt, A., Scott, R. T., Garrisi, G. J., & Hofmann, G. E. (1994). Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation\*. *Fertility and Sterility*, *61*(1), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56459-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56459-0)
- Nguyen, Q. H., Pervolarakis, N., Blake, K., Ma, D., Davis, R. T., James, N., Phung, A. T., Willey, E., Kumar, R., Jabart, E., Driver, I., Rock, J., Goga, A., Khan, S. A., Lawson, D. A., Werb, Z., & Kessenbrock, K. (2018). Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nature Communications*, *9*, 2028. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04334-1>
- Noci, I., Borri, P., Chieffi, O., Scarselli, G., Biagiotti, R., Moncini, D., Paglierani, M., & Taddei, G. (1995). I. Aging of the human endometrium: A basic morphological and

- immunohistochemical study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 63(2), 181–185. [https://doi.org/10.1016/0301-2115\(95\)02244-9](https://doi.org/10.1016/0301-2115(95)02244-9)
- Noyes, R. W., Hertig, A. T., & Rock, J. (1950). Dating the Endometrial Biopsy. *Fertility and Sterility*, 1(1), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)30062-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)30062-0)
- Ohta, Y. (1987). Age-Related Decline in Deciduogenic Ability of the Rat Uterus1. *Biology of Reproduction*, 37(4), 779–785. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.4.779>
- Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 220–227. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12088>
- Olesen, M. S., Starnawska, A., Bybjerg-Grauholm, J., Bielfeld, A. P., Agerholm, I., Forman, A., Overgaard, M. T., & Nyegaard, M. (2018). Biological age of the endometrium using DNA methylation. *Reproduction*, 155(2), 165–170. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0601>
- Ono, Y. J., Terai, Y., Tanabe, A., Hayashi, A., Hayashi, M., Yamashita, Y., Kyo, S., & Ohmichi, M. (2014). Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis. *The Journal of Endocrinology*, 223(2), 203–216. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0393>
- Park, K. R., Inoue, T., Ueda, M., Hirano, T., Higuchi, T., Maeda, M., Konishi, I., Fujiwara, H., & Fujii, S. (2000). CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins  $\alpha 6$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 1$ . *Molecular Human Reproduction*, 6(3), 252–257. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.252>
- Park, S. U., Walsh, L., & Berkowitz, K. M. (2021). Mechanisms of ovarian aging. *Reproduction (Cambridge, England)*, 162(2), R19–R33. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0022>
- Pathare, A. D. S., Loid, M., Saare, M., Gidlöf, S. B., Zamani Esteki, M., Acharya, G., Peters, M., & Salumets, A. (2023). Endometrial receptivity in women of advanced age: An underrated factor in infertility. *Human Reproduction Update*, dmad019. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad019>
- Patir, A., Fraser, A. M., Barnett, M. W., McTeir, L., Rainger, J., Davey, M. G., & Freeman, T. C. (2020). The transcriptional signature associated with human motile cilia. *Scientific Reports*, 10, 10814. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66453-4>
- Pazour, G. J., Wilkerson, C. G., & Witman, G. B. (1998). A Dynein Light Chain Is Essential for the Retrograde Particle Movement of Intraflagellar Transport (IFT). *The Journal of Cell Biology*, 141(4), 979–992.
- Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: Mammalian female germ cell development. *Genesis*, 44(12), 622–632. <https://doi.org/10.1002/dvg.20258>
- Prasad, S. V., Skinner, S. M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., & Dunbar, B. S. (2000). Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells, Tissues, Organs*, 166(2), 148–164. <https://doi.org/10.1159/000016730>

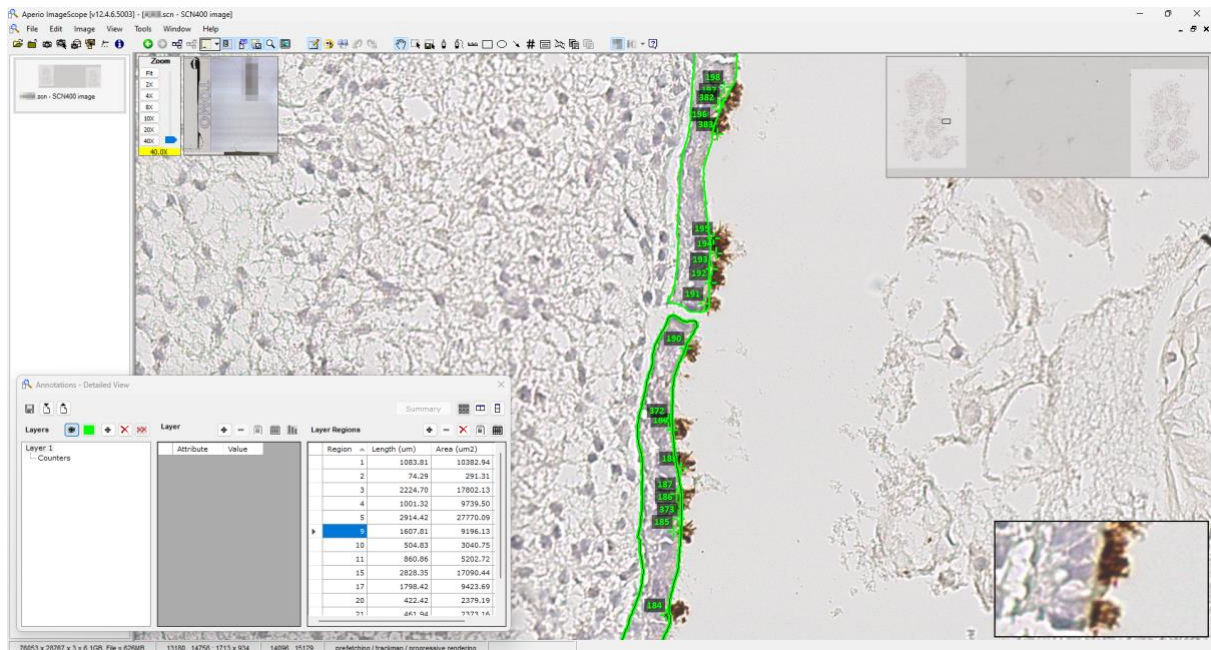
- Quinn, C. E., & Casper, R. F. (2009). Pinopodes: A questionable role in endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, 15(2), 229–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn052>
- Reame, E., Kelch'F, P., Beitinss, Z., & Zawacki, M. (1996). *Hormone and Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion across the Menstrual Cycle of Premenopausal Women*.
- Reyes, F. I., Winter, J. S., & Faiman, C. (1977). Pituitary-ovarian relationships preceding the menopause. I. A cross-sectional study of serum follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, estradiol, and progesterone levels. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 129(5), 557–564.
- Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., Barr, F. D., Boesch, A. W., Ackerman, M. E., Kappes, J. C., Ochsenbauer, C., & Wira, C. R. (2017). Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunology*, 10(2), 531–544. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.72>
- Rosner, J., Samardzic, T., & Sarao, M. S. (2022). Physiology, Female Reproduction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537132/>
- Rubin, S. C., Abdulkadir, M., Lewis, J., Harutyunyan, A., Hirani, R., & Grimes, C. L. (2023). Review of Endometrial Receptivity Array: A Personalized Approach to Embryo Transfer and Its Clinical Applications. *Journal of Personalized Medicine*, 13(5), 749. <https://doi.org/10.3390/jpm13050749>
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Díaz-Gimeno, P., Gómez, E., Fernández-Sánchez, M., Carranza, F., Carrera, J., Vilella, F., Pellicer, A., & Simón, C. (2013). The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*, 100(3), 818–824. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.004>
- Sacchi, L., Albani, E., Cesana, A., Smeraldi, A., Parini, V., Fabiani, M., Poli, M., Capalbo, A., & Levi-Setti, P. E. (2019). Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Clinical, Gestational, and Neonatal Outcomes in Advanced Maternal Age Patients Without Compromising Cumulative Live-Birth Rate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(12), 2493–2504. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01609-4>
- Sanchini, C., Rosito, M., Comincini, A., De Panfilis, S., Bartolini, F., & Di Angelantonio, S. (2023). Protocol for observing microtubules and microtubule ends in both fixed and live primary microglia cells. *STAR Protocols*, 4(3), 102499. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102499>
- Sanders, K. D., Silvestri, G., Gordon, T., & Griffin, D. K. (2021). Analysis of IVF live birth outcomes with and without preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): UK Human Fertilisation and Embryology Authority data collection 2016–2018. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(12), 3277–3285. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02349-0>

- Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Sebastian-Leon, P., Garrido, N., Remohí, J., Pellicer, A., & Diaz-Gimeno, P. (2018). Asynchronous and pathological windows of implantation: Two causes of recurrent implantation failure†. *Human Reproduction*, 33(4), 626–635. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey023>
- Seta, Y., Kawakatsu, K., Degawa, S., Goto, T., & Nishikata, T. (2023). Morphological Evidence for Novel Roles of Microtubules in Macrophage Phagocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1373. <https://doi.org/10.3390/ijms24021373>
- Sherman, B. M., & Korenman, S. G. (1975). Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. *The Journal of Clinical Investigation*, 55(4), 699–706. <https://doi.org/10.1172/JCI107979>
- Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B., & Nachury, M. V. (2010). The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21517–21522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013728107>
- Singla, V., & Reiter, J. F. (2006). The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*, 313(5787), 629–633. <https://doi.org/10.1126/science.1124534>
- Soares, S. R., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2005). Age and Uterine Receptiveness: Predicting the Outcome of Oocyte Donation Cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(7), 4399–4404. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2252>
- Sun, B., & Yeh, J. (2022). Non-Invasive and Mechanism-Based Molecular Assessment of Endometrial Receptivity During the Window of Implantation: Current Concepts and Future Prospective Testing Directions. *Frontiers in Reproductive Health*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frph.2022.863173>
- Tasca, A., Helmstädter, M., Brislinger, M., Haas, M., Mitchell, B., & Walentek, P. (2021). Notch signaling induces either apoptosis or cell fate change in multiciliated cells during mucociliary tissue remodeling. *Developmental Cell*, 56(4), 525–539.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.005>
- Thiyagarajan, D. K., Basit, H., & Jeanmonod, R. (2024). Physiology, Menstrual Cycle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/>
- Tinkanen, H., Bläuer, M., Laippala, P., Tuohimaa, P., & Kujansuu, E. (2001). Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 94(1), 109–113. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00319-5](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00319-5)
- Toner, J. P., Grainger, D. A., & Frazier, L. M. (2002). Clinical outcomes among recipients of donated eggs: An analysis of the U.S. national experience, 1996–19981. *Fertility and Sterility*, 78(5), 1038–1045. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03371-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03371-X)

- Ulrich, N. D., Shen, Y., Ma, Q., Yang, K., Hannum, D. F., Jones, A., Machlin, J., John F. Randolph, J., Smith, Y. R., Schon, S. B., Shikanov, A., Marsh, E. E., Lieberman, R., Gurczynski, S. J., Moore, B. B., Li, J. Z., & Hammoud, S. (2022). Cellular heterogeneity of human fallopian tubes in normal and hydrosalpinx disease states identified by scRNA-seq. *Developmental Cell*, *57*(7), 914. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.017>
- Van Heertum, K., & Rossi, B. (2017). Alcohol and fertility: How much is too much? *Fertility Research and Practice*, *3*, 10. <https://doi.org/10.1186/s40738-017-0037-x>
- Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, *7*(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>
- Wang, W., Vilella, F., Alama, P., Moreno, I., Mignardi, M., Isakova, A., Pan, W., Simon, C., & Quake, S. R. (2020). Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle. *Nature Medicine*, *26*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1040-z>
- Welt, C. K., Pagan, Y. L., Smith, P. C., Rado, K. B., & Hall, J. E. (2003). Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: Critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *88*(4), 1766–1771. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021516>
- Welt, C. K., & Schneyer, A. L. (2001). Differential Regulation of Inhibin B and Inhibin A by Follicle-Stimulating Hormone and Local Growth Factors in Human Granulosa Cells from Small Antral Follicles<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(1), 330–336. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7107>
- Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00008>
- Winuthayanon, W., & Li, S. (2018). Fallopian Tube/Oviduct: Structure and Cell Biology. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 282–290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64401-X>
- Wise, P. M. (1999). Neuroendocrine modulation of the “menopause”: Insights into the aging brain. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *277*(6), E965–E970. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.6.E965>
- Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., & Gaertig, J. (2017). Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(6), a028159. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028159>
- Woods, L., Perez-Garcia, V., Kieckbusch, J., Wang, X., DeMayo, F., Colucci, F., & Hemberger, M. (2017). Decidualisation and placentation defects are a major cause of age-related reproductive decline. *Nature Communications*, *8*(1), 352. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00308-x>
- World Health Organization. (2023a). *Infertility prevalence estimates, 1990–2021*. <https://www.fertilityanswers.com/13-stats-know-infertility/>

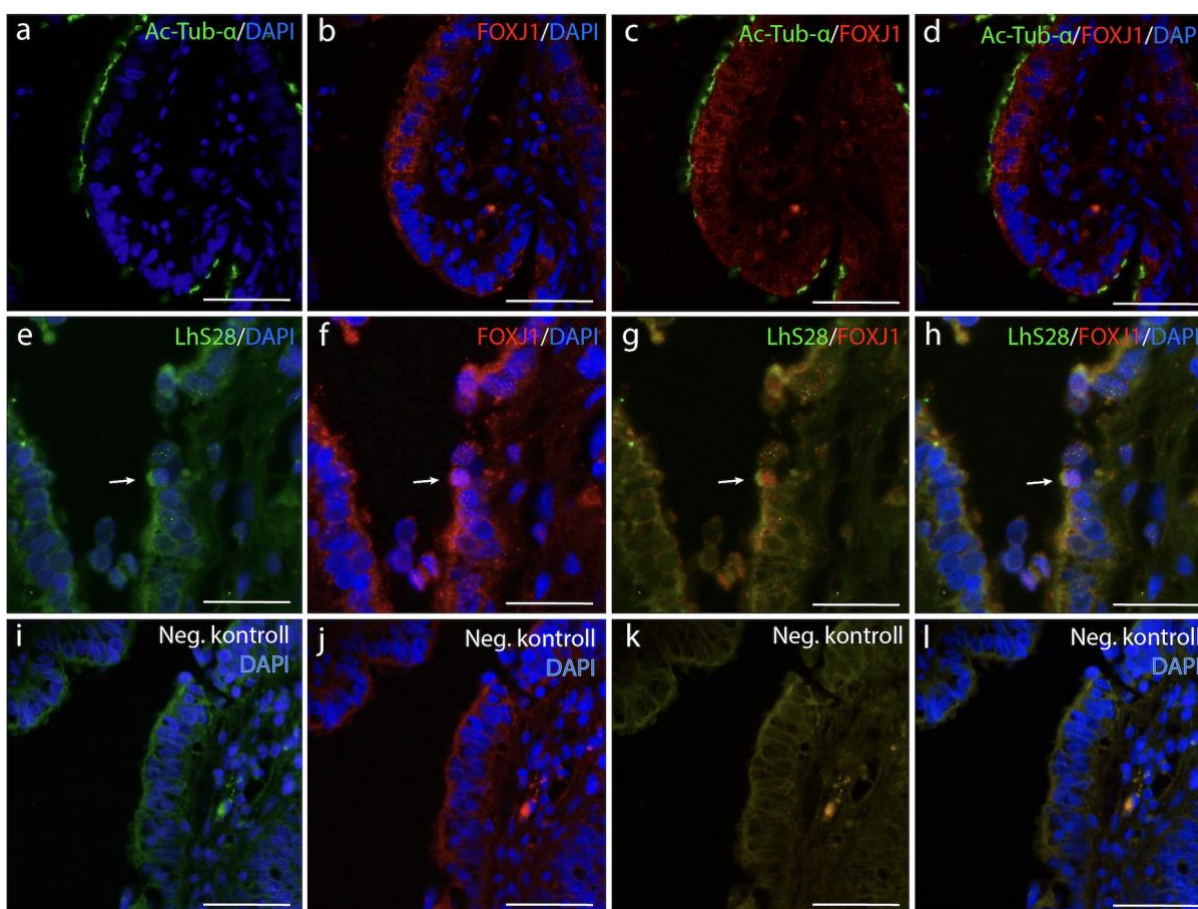
- World Health Organization. (2023b, April 3). *Infertility*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- Wu, Y., Li, M., Zhang, J., & Wang, S. (2023). Unveiling uterine aging: Much more to learn. *Ageing Research Reviews*, *86*, 101879. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101879>
- Yamoto, M., Shima, K., & Nakano, R. (1992). Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Hormone Research*, *37 Suppl 1*, 5–11. <https://doi.org/10.1159/000182335>
- Yan, J., Zhou, L., Liu, M., Zhu, H., Zhang, X., Cai, E., Xu, X., Chen, T., Cheng, H., Liu, J., Wang, S., Dai, L., Chang, X., & Tang, F. (2024). Single-cell analysis reveals insights into epithelial abnormalities in ovarian endometriosis. *Cell Reports*, *43(3)*, 113716. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113716>
- Yanaihara, A., Otsuka, Y., Iwasaki, S., Aida, T., Tachikawa, T., Irie, T., & Okai, T. (2005). Differences in gene expression in the proliferative human endometrium. *Fertility and Sterility*, *83(4, Supplement)*, 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.032>
- Yanaihara, A., Otsuka, Y., Iwasaki, S., Koide, K., Aida, T., & Okai, T. (2004). Comparison in gene expression of secretory human endometrium using laser microdissection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *2(1)*, 66. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-66>
- Yoshimura, Y., & Wallach, E. E. (1987). Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. *Fertility and Sterility*, *47(1)*, 22–34. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)49931-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)49931-0)

## LISA 1. Endomeetriumi luminaalepiteeli piiritlemine ja ripsrakkude loendamine skaneeritud koelõigul



**Joonis L1. Endomeetriumi luminaalepiteeli piiritlemine ja ripsrakkude loendamine skaneeritud koelõigul.** Analüüs teostati programmis Aperio ImageScope (versioon 12.4.6.). Joonisel on kuvatõmmis ühest skaneeritud endomeetriumlõigu piirkonnast luminaalepiteeli ja ripsrakkudega. Luminaalepiteeli tükid piiritleti rohelise joonega luminaalepiteeli pindala arvutamiseks. Ripsrakud loendati „count“ funktsiooniga. Arvutamaks ripsrakkude arvu  $\mu\text{m}^2$  LE kohta jagati ripsrakkude summa LE pindala summaga.

## LISA 2. Immunofluorestsentsanalüüsil kasutatud munajuhade kontrollid



**Joonis L2. Munajuha ripsrakkude visualiseerimine immunofluorestsentsiga.** Ripsrakkude tuvastamiseks on kasutatud Ac-Tub- $\alpha$ - (roheline) ja FOXJ1-vastast (punane) antikeha ning LhS28 (roheline). Tuumad on värvitud DAPI-ga (sinine). Valge noolega on tähistatud üksik ripsrakk. Negatiivsele (Neg.) kontrollile (i-l) ei lisatud primaarset antikeha. Mõõtskaala: 50  $\mu$ m (a-d ja i-l) ja 25  $\mu$ m (e-h). Joonisel on näha **a** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase antikehaga ja DAPI-ga märgistatud koelõik, **b** FOXJ1-vastase antikehaga ja DAPI-ga märgistatud koelõik, **c** Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud koelõik, **d** Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga ning DAPI-ga märgistatud koelõik, **e** LhS28-ga ja DAPI-ga märgistatud koelõik, **f** FOXJ1-vastase antikehaga ja DAPI-ga märgistatud koelõik, **g** LhS28-ga ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud koelõik, **h** LhS28-ga, FOXJ1-vastase antikehaga ja DAPI-ga märgistatud koelõik. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, FOXJ1 – *Forkhead box J1*.

**LISA 3. I voolutsütomeetriline analüüs 1 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkudega**

**Tabel L3. 1 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkude fraktsioonid voolutsütomeetrilisel analüüsil lainepikkustel 660 ja 530 nm.**

<b>Joonis 9a</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	14 125	100
660 nm	Q1	360	2,5
660 nm & 530 nm	Q2	3	0,0
Negatiivsed	Q3	13 762	97,4
488 nm	Q4	0	0
<b>Joonis 9b</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	16 004	100
660 nm	Q1	31	0,2
660 nm & EpCAM	Q2	227	1,4
Negatiivsed	Q3	13 551	84,7
EpCAM	Q4	2195	13,7
<b>Joonis 9c</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	14 657	100
SiR-tubuliin (1 µM)	Q1	13 046	89,0
SiR-tubuliin (1 µM) & 488 nm	Q2	69	0,5
Negatiivsed	Q3	1542	10,5
530 nm	Q4	0	0
<b>Joonis 9d</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	15 954	100
SiR-tubuliin (1 µM)	Q1	9456	59,3
SiR-tubuliin (1 µM) & EpCAM	Q2	3930	24,6
Negatiivsed	Q3	2558	16,0
EpCAM	Q4	9	0,1

Heledama halliga on tähistatud, millega antud proovi märgistati. "Negatiivsed" tähendab märgistamata rakke. Lühendid: EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul, Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*).

**LISA 4. II ja III voolutsütomeetriline analüüs 0,004-2 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkude**

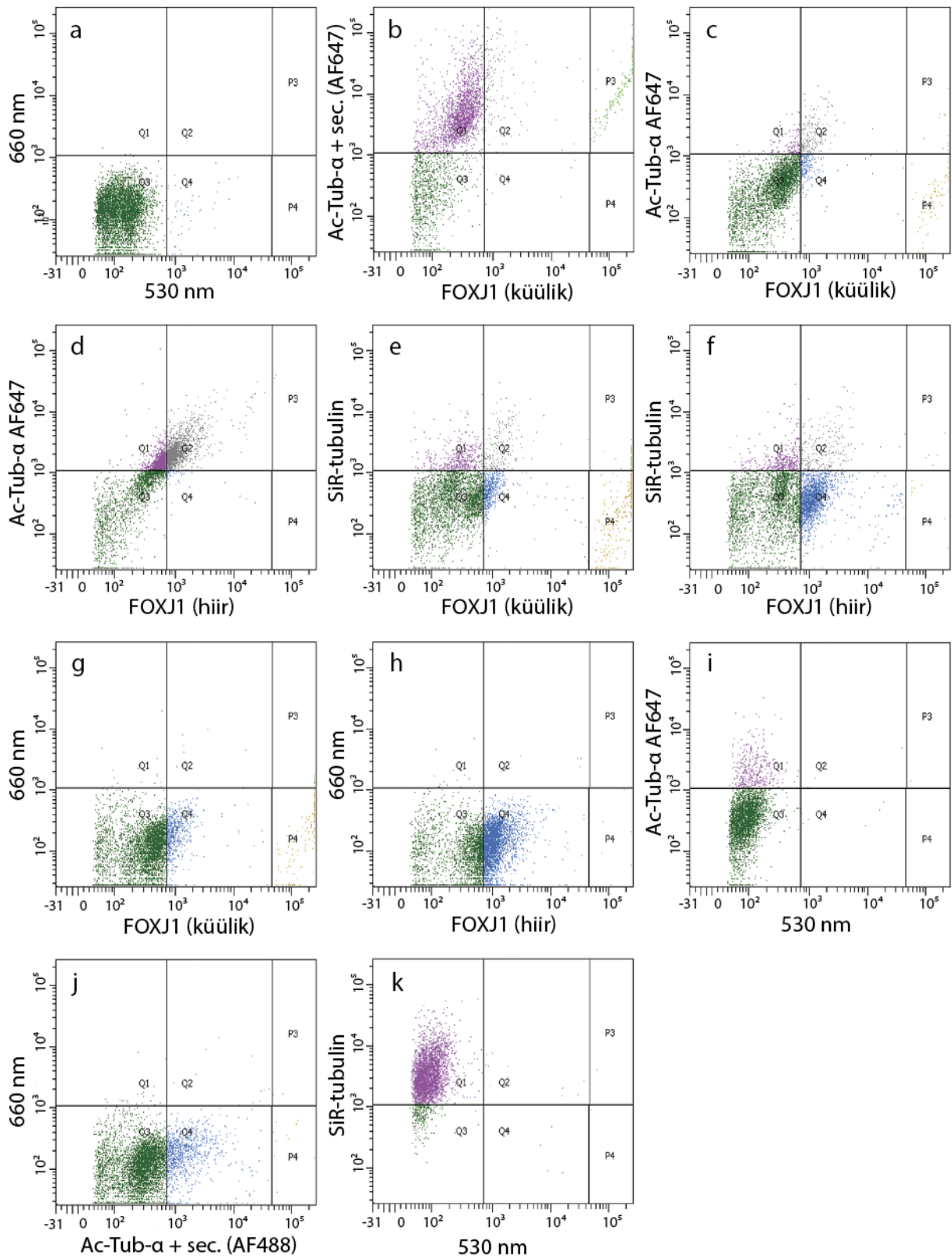
**Tabel L4. 0,004-2 µM SiR-tubuliini ja verapamiiliga ning EpCAM-vastase antikehaga märgistatud rakkude fraktsioonid voolutsütomeetrilisel analüüsil lainepikkustel 660 ja 530 nm.**

<b>Joonis 10Aa</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	1300	100
660 nm	Q1	14	1,1
660 nm & 530 nm	Q2	0	0
Negatiivsed	Q3	1285	98,8
530 nm	Q4	1	0,1
<b>Joonis 10Ab</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	1113	100
SiR-tubuliin (2 µM)	Q1	915	82,2
SiR-tubuliin (2 µM) & 530 nm	Q2	1	0,1
Negatiivsed	Q3	197	17,7
530 nm	Q4	0	0
<b>Joonis 10Ac</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	2287	100
SiR-tubuliin (0,2 µM)	Q1	1826	79,8
SiR-tubuliin (0,2 µM) & 530 nm	Q2	0	0
Negatiivsed	Q3	461	20,2
530 nm	Q4	0	0
<b>Joonis 10Ad</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	1274	100
633 nm	Q1	10	0,8
633 nm & EpCAM	Q2	4	0,3
Negatiivsed	Q3	959	75,3
EpCAM	Q4	301	23,6
<b>Joonis 10Ae</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	367	100
SiR-tubuliin (2 µM)	Q1	167	45,5
SiR-tubuliin (2 µM) & EpCAM	Q2	69	18,8
Negatiivsed	Q3	125	34,1
EpCAM	Q4	6	1,6
<b>Joonis 10Af</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	586	100
SiR-tubuliin (0,2 µM)	Q1	261	44,5
SiR-tubuliin (0,2 µM) & EpCAM	Q2	135	23,0
Negatiivsed	Q3	181	30,9
EpCAM	Q4	9	1,5
<b>Joonis 10Ag</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	783	100
SiR-tubuliin (0,2 µM) & verapamiil	Q1	274	35

SiR-tubuliin (0,2 $\mu$ M) & verapamiil & EpCAM	Q2	142	18,1
Negatiivsed	Q3	358	45,7
EpCAM	Q4	9	1,1
<b>Joonis 10Ba</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	4295	100
660 nm	Q1	29	0,7
660 nm & 530 nm	Q2	0	0
Negatiivsed	Q3	4263	99,3
530 nm	Q4	3	0,1
<b>Joonis 10Bb</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	4607	100
SiR-tubuliin (0,01 $\mu$ M)	Q1	2000	43,4
SiR-tubuliin (0,01 $\mu$ M) & 488 nm	Q2	2	0,0
Negatiivsed	Q3	2598	56,4
530 nm	Q4	7	0,2
<b>Joonis 10Bc</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+Q3+Q4	4471	100
SiR-tubuliin (0,004 $\mu$ M)	Q1	1167	26,1
SiR-tubuliin (0,004 $\mu$ M) & 530 nm	Q2	3	0,1
Negatiivsed	Q3	3296	73,7
EpCAM	Q4	5	0,1

Heledama halliga on tähistatud, millega antud proovi märgistati. "Negatiivsed" tähendab märgistamata rakke. Lühendid: EpCAM – epiteeliraku adhesioonimolekul, Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*).

**LISA 5. IV voolutsütomeetriline analüüs formaliiniga fikseeritud ning Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudele**



**Joonis L5. Voolutsütomeetriline analüüs Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga formaliiniga fikseeritud rakkudel lainepikkustel 660 ja 530 nm. Skaala tähistab rakkude värvumise intensiivsust. SiR-tubuliiniga märgistatud rakke ei fikseeritud ning neid kasutati võrdluseks Ac-Tub- $\alpha$ -vastase antikehaga märgistatud**

rakkudega. Joonisel on kujutatud voolutsütomeetiline analüüs **a** negatiivsete, märgistamata rakkudega, **b** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeerimata antikehaga ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **c** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikeha ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **d** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikeha ja monokloonaalse, hiirest pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **e** SiR-tubuliini ja polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **f** SiR-tubuliini ja monokloonaalse, hiirest pärit FOXJ1-vastase antikehaga, **g** polükloonaalse, küülikust pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega **h** monokloonaalse, hiirest pärit FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega, **i** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeeritud antikehaga märgistatud rakkudega, **j** Ac-Tub- $\alpha$ -vastase konjugeerimata antikehaga märgistatud rakkudega **k** SiR-tubuliiniga märgistatud rakkudega. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), sec – sekundaarne (antikeha; ingl. k. *secondary*), SiR – silikoonrodamiin.

**Tabel L5. Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga ning SiR-tubuliiniga märgistatud rakkude fraktsioonid voolutsütomeetrisel analüüsil lainepikkustel 660 ja 530 nm.**

<b>Joonis L5a</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	6613	100
660 nm	Q1	2	0,0
660 nm & 530 nm	Q2+P3	0	0
Negatiivsed	Q3	6559	99,2
530 nm	Q4+P4	52+0	0,8+0
<b>Joonis L5b</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	3477	100
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF647)	Q1	2156	82,2
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF647) & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	176+130	5,1+3,7
Negatiivsed	Q3	1005	28,9
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	0	0
<b>Joonis L5c</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	4352	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	104	2,4
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 + FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	212+11	4,9+0,3
Negatiivsed	Q3	3722	85,5
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	219+84	5,0+1,9
<b>Joonis L5d</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	5625	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	1408	25,0
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 + FOXJ1 (hiir)	Q2+P3	2224+2	39,5+0,0
Negatiivsed	Q3	1917	34,1
FOXJ1 (hiir)	Q4+P4	74+0	1,3+0
<b>Joonis L5e</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	4543	100
SiR-tubuliin	Q1	423	9,3
SiR-tubuliin & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	200+39	4,4+0,9
Negatiivsed	Q3	3001	66,1
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	575+305	12,7+6,7

<b>Joonis L5f</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	5358	100
SiR-tubuliin	Q1	340	6,3
SiR-tubuliin & FOXJ1 (hiir)	Q2+P3	239+6	4,5+0,1
Negatiivsed	Q3	2729	50,9
FOXJ1 (hiir)	Q4+P4	2032+12	37,9+0,2
<b>Joonis L5g</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	5395	100
660 nm	Q1	14	0,3
660 nm & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	8+5	0,1+0,1
Negatiivsed	Q3	4545	84,2
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	685+138	12,7+2,6
<b>Joonis L5h</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	6766	100
660 nm	Q1	12	0,2
660 nm & FOXJ1 (hiir)	Q2+P3	6+1	0,1+0,0
Negatiivsed	Q3	2712	40,1
FOXJ1 (hiir)	Q4+P4	4029+6	59,5+0,1
<b>Joonis L5i</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	4204	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	354	8,4
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 & 530 nm	Q2+P3	4+1	0,1+0,0
Negatiivsed	Q3	3837	91,3
530 nm	Q4+P4	8+0	0,2+0
<b>Joonis L5j</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	7073	100
660 nm	Q1	19	0,3
660 nm & Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF488)	Q2+P3	13+2	0,2+0,0
Negatiivsed	Q3	6006	84,9
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (A488)	Q4+P4	1022+11	14,4+0,2
<b>Joonis L5k</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ Q4+P4	4155	100
SiR-tubuliin	Q1	3853	92,7
SiR-tubuliin & 530 nm	Q2+P3	14+1	0,3+0,0
Negatiivsed	Q3	282	6,8
530 nm	Q4+P4	4+1	0,1+0,0

Heledama halliga on tähistatud, millega antud proovi märgistati. "Negatiivsed" tähendab märgistamata rakke. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), P – osa (ingl. k. *parent*).

**LISA 6. V** voolutsütomeetriline analüüs tsinkfikseeritud ning Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkudega

**Tabel L6. Ac-Tub- $\alpha$ - ja FOXJ1-vastase antikehaga märgistatud rakkude fraktsioonid voolutsütomeetrilisel analüüsil lainepikkustel 660 ja 530 nm.**

<b>Joonis 11a</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	10 734	100
660 nm	Q1	25	0,2
660 nm & 530 nm	Q2+P3	3+0	0,0+0
Negatiivsed	Q3	10 598	98,7
530 nm	Q4+P4	107+1	1,0+0,0
<b>Joonis 10b</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	14 024	100
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF647)	Q1	2727	19,4
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF647) & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	6046+122	43,1+0,9
Negatiivsed	Q3	4880	34,8
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	246+3	1,8+0,0
<b>Joonis 11c</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	13 691	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	53	0,4
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	315+12	2,3+0,1
Negatiivsed	Q3	7369	53,8
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	5856+86	42,8+0,6
<b>Joonis 11d</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	13 817	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	21	0,2
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 & FOXJ1 (hiir)	Q2+P3	553+5	4,0+0,0
Negatiivsed	Q3	9815	71,0
FOXJ1 (hiir)	Q4+P4	3420+3	24,8+0,0
<b>Joonis 11e</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	13 461	100
660 nm	Q1	8	0,1
660 nm & FOXJ1 (küülik)	Q2+P3	21+1	0,2+0,0
Negatiivsed	Q3	7250	53,9
FOXJ1 (küülik)	Q4+P4	6072+109	45,1+0,8
<b>Joonis 11f</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	13 647	100
660 nm	Q1	2	0,0
660 nm & FOXJ1 (hiir)	Q2+P3	34+0	0,2+0

Negatiivsed	Q3	10 344	75,8
FOXJ1 (hiir)	Q4+P4	3261+6	23,9+0,0
<b>Joonis 11g</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	14 344	100
660 nm	Q1	0	0
660 nm & Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF488)	Q2+P3	37+1	0,3+0,0
Negatiivsed	Q3	9380	65,4
Ac-Tub- $\alpha$ + sec. (AF488)	Q4+P4	4923+3	34,3+0,0
<b>Joonis 11h</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+ +Q4+P4	6272	100
Ac-Tub- $\alpha$ AF647	Q1	919	14,7
Ac-Tub- $\alpha$ AF647 & 530 nm	Q2+P3	5+0	0,1+0
Negatiivsed	Q3	5343	85,2
530 nm	Q4+P4	5+0	0,1+0

Heledama halliga on tähistatud, millega antud proovi märgistati. "Negatiivsed" tähendab märgistamata rakke. Lühendid: Ac-Tub- $\alpha$  – atsetüleeritud  $\alpha$ -tubuliin, AF – Alexa Fluor, FOXJ1 – *Forkhead box J1*, Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*), P – osa (ingl. k. *parent*).

LISA 7. VI ja VII voolutsütomeetriline analüüs SiR-tubuliini ja LhS28-ga märgistatud rakkudega

Tabel L7. SiR-tubuliini ja LhS28-ga märgistatud rakkude fraktsioonid voolutsütomeetrilisel analüüsil lainepikkustel 660 ja 530 nm.

<b>Joonis 12Aa</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	2758	100
660 nm	Q1	5	0,2
660 + 530 nm	Q2+P3	0+1	0+0,0
Negatiivsed	Q3	2747	99,6
530 nm	Q4+P4	5+0	0,2+0
<b>Joonis 12Ab</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	2189	100
SiR-tubuliin	Q1	2168	99,0
SiR-tubuliin + 530 nm	Q2+P3	0	0
Negatiivsed	Q3	21	1,0
530 nm	Q4+P4	0	0
<b>Joonis 12Ac</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	3617	100
660 nm	Q1	0	0
660 nm & LhS28	Q2+P3	0	0
Negatiivsed	Q3	3495	96,6
LhS28	Q4+P4	106+16	2,9+0,4
<b>Joonis 12Ba</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	3660	100
660 nm	Q1	4	0,1
660 nm & 488 nm	Q2+P3	0	0
Negatiivsed	Q3	3652	99,8
530 nm	Q4+P4	4+0	0,1+0
<b>Joonis 12Bb</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	3912	100
SiR-tubulin	Q1	3837	98,1
SiR-tubulin & 530 nm	Q2+P3	2+0	0,1+0
Negatiivsed	Q3	72	1,8
530 nm	Q4+P4	0+1	0+0,0
<b>Joonis 12Bc</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	7818	100
660 nm	Q1	1	0,0
660 nm & LhS28	Q2+P3	0	0
Negatiivsed	Q3	7740	99,0
LhS28	Q4+P4	76+1	1,0+0,0
<b>Joonis 12Bd</b>	<b>Värv</b>	<b>Rakkude arv</b>	<b>% kõigist rakkudest</b>
Kokku	Q1+Q2+P3+Q3+Q4+P4	3466	100
SiR-tubulin	Q1	3138	90,5
SiR-tubulin & LhS28	Q2+P3	34+7	1,0+0,2
Negatiivsed	Q3	287	8,3

LhS28	Q4+P4	0	0
-------	-------	---	---

Heledama halliga on tähistatud, millega antud proovi märgistati. "Negatiivsed" tähendab märgistamata rakke.  
Lühendid: AF – Alexa Fluor, P – osa (ingl. k. *parent*), Q – kvadrant (ingl. k. *quadrant*).

## LIHTLITSENTS

Mina, Arina Laanemets (sünnikuupäev 07.04.2000),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Epiteeli ripsrakud noorte ja vanemate reproduktiiveas naiste endomeetriumis: immunohistoloogiline analüüs ja uue analüüsimetoodika arendus“, mille juhendaja on Marina Loid ning kaasjuhendajateks Keiu Kask ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Arina Laanemets

30.05.2024