

Yardımcı üreme tekniklerinde endometriyal kokültür hücreleri

Endometrial cocultured cells in assisted reproduction techniques

Leyla Bahar¹, Semra Kahraman²

ÖZET

Amaç: Endometriyum, üreme biyolojisinde çok önemli bir rol oynar ve ona bağlı olarak gelişen patolojilerden biri implantasyonda yaşanan olumsuzluklardır. İmplantasyon başarısızlıkları, kadın infertilitesi için önemli süreçlerdendir ve çözümüne dair geliştirilen yöntemlerden biri ise endometriyal kokültür uygulamalarıdır. Bu çalışmada, in vitro monolayer endometriyal kokültürdeki hücre tiplerinin ayırt edilmesi, doku dinamiğinin aydınlatılabilmesi ve klinik uygulamalarda kullanımı açısından yararlılığının gösterilmesi amaçlandı.

Yöntemler: Çalışmamıza 8 fertil ve Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) yaşayan 16 infertil kadından oluşan 2 grup dâhil edildi. Negatif basınçlı pipelle aspirasyon yapılarak endometriyal doku örnekleri elde edildi. Embriyoyu blastosist aşamasına götüreceği düşünülen "Endometriyal Epitel-Gland hücresi (EE)" ve "Stromal (ES) hücreler" ayrıştırılıp kültürleri yapıldı. Daha sonra bu dokular ışık mikroskopik doku takibine alındı. Kokültür hücreleri, toluidin mavisi ile boyandıktan sonra gruplandırıldı. Hücre tiplerine ait sayısal değerler ile çalışmanın istatistiksel analizi ki-kare metodu kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Kokültürlerde hem fertil hem de TİB grubundan elde edilen hücre tipleri ışık mikroskopik incelemeyle morfolojik özelliklerine göre ayırt edildi. Her iki grupta da, vakuollü, mikrovilluslu ve sitoplazmik uzantılı olarak isimlendirilen hücreler tanımlandı.

Sonuç: Her iki grubun, endometriyum dokularından elde edilen kokültürleri ışık mikroskopik düzeyde incelendi. Böylece gruplar arası farklılıkların belirlenmesi kokültürdeki hücre yapılarının sınıflandırılması sağlandı ve endometriyal kokültür uygulamalarının embriyonun gelişiminde faydalı olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: infertilite, endometriyum, kokültür uygulamaları, implantasyon başarısızlığı

ABSTRACT

Objective: Endometrium, which plays a very important role in reproductive biology and one of the pathologies connected with it as are the problems in the implantation. One of the most important processes for the female fertility are experienced in implantation failure and one of the developed methods for the solution are endometrial coculture application. In this study, to provide knowledge of the types of cells in in vitro monolayer endometrial coculture.

Methods: In our study, consisting of 8 fertile and 16 infertile women suffering from recurrent implantation failure were included in two groups. Performing aspiration with negative pressure pipeline endometrial tissue samples were obtained. Intended to carry embryo to the blastocyst stage, Endometrial Epithelial-gland cells (EG) and Epithelial stromal (ES) cells are obtained, after concluding of the culture was provided to do light microscopic tissue follow of these tissues. Cocultured cells were grouped stained with toluidine blue. Working with the numerical values of the cell types was performed using the Chi-square statistical analysis method.

Results: In cocultured, both fertile and cell types derived from the TIB group, with light microscopic examination, were distinguished by morphological characteristics. Each of the two groups, called cells called vacuoles, microvilli and cytoplasmic extension was defined.

Conclusion: Both groups, coculture derived from endometrial tissue were examined by light microscope. Thus, the identification of differences between groups was provided classification of cell structures in the coculture and endometrial cocultured practices, was concluded to be beneficial in the embryo's development. *J Clin Exp Invest* 2015; 6 (4): 357-363

Key words: infertility, endometrium, coculture applications, implantation failure

¹ Mersin Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin, Türkiye

² Memorial Hastanesi, Yardımcı Üreme Teknikleri ve Genetik Merkezi, İstanbul, Türkiye

Correspondence: Leyla Bahar,

Mersin Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin, Türkiye Email: laylabahar@gmail.com

Received: 08.07.2015, Accepted: 29.10.2015

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2015, All rights reserved

GİRİŞ

Endometriyum, birçok biyokimyasal faktörün üretildiği ve vasküler yapı olarak değişen derecelerde kanlanan karmaşık bir dokudur [1]. Başarılı bir implantasyon, blastosist ve reseptif endometriyum arasındaki karşılıklı etkileşimlerin bir sonucudur. Endometriyumda reseptivite oluşana kadar çeşitli moleküler ve morfolojik değişimler oluşur. İn vitro fertilizasyon (IVF), embriyo transferi ve implantasyon başarısında, endometriyal reseptivite önemli bir basamaktır. Blastosist, sadece endometriyumun bu benzersiz moleküler ve morfolojik değişimleriyle karakterize olan reseptif fazında implante olabilir [2]. Endometriyumda çeşitli yapısal, hücrenel ve moleküler olaylar dizisi implantasyon penceresi ile kontrol edilir ve bu durumun sonucunda endometriyal reseptiviteyi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilir [3]. IVF'de, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı kompleks bir konudur ve tamamen anlaşılmamıştır [4].

TİB, 40 yaş altında, en az dört iyi kaliteli, taze veya dondurulmuş embriyo transferinin en az 3 siklusta yapılmasına rağmen klinik gebelik oluşmaması durumu şeklinde tanımlanabilir [5]. Bu durum, IVF uygulamalarındaki başarıyı etkileyen en önemli parametrelerden biridir [6,7]. Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarına çözüm olarak kullanılan yöntemlerden biri olan kokültür uygulamaları bu konudaki birçok çalışmayı da beraberinde getirmiştir. Son yapılan çalışmalarda kokültürde ortaya çıkan moleküller ve miktarları üzerinde durulmaktadır. Racicot ve ark'ları [8] blastosist gibi küremsi yapıda sferoid-epitelyal hücre kokültüründe, trofoblast-epitelyal kokültür sistemi kullanılarak, trofoblastın epitel hücrelerine yaklaşması sırasında hCG'nin arttığını doğrulamışlardır. Kaynak ve konsantrasyon açısından çok önemli olan hCG, ilk etapta implantasyonla bağlantılı olan MUC16 ve osteopontin maddeleri üzerinde çok etkilidir. 2. aşamada ise implantasyondaki etkiyi sağlamada sitokinlere ihtiyaç duyar. Kokültür sistemleri kullanılmasının faydaları arasında, hücreler hakkında kapsamlı bilgi sağlanması ve hCG'nin etkilediği hedef genlerin tespitinin yapılması sayılabilir. Bunun yanısıra embriyonun endometriyuma yaklaşması, implantasyonundaki diğer önemli faktörlerin saptanması ve subfertil hastalar için terapötik hedeflerin sayısının artırılması da kokültürün faydaları arasındadır [9]. Geleneksel medyumlar yerine uygulanan kokültür sistemlerinin embriyo gelişimine olumlu faydalar sağladığı; embriyoda fragmentasyonu azaltıp, klivajı hızlandırarak embriyo kalitesini artırdığı tespit edilmiştir. Bu gelişme, yardımcı hücreler olarak da bilinen farklı tipler-

de besleyici monolayer hücreler ile sağlanmaktadır [10]. Kokültür sistemlerinin embriyo gelişimine pozitif etkisi invivo şartları başarı ile taklit etmesinden kaynaklanmaktadır [11]. Farklı canlı türlerine ait hücreler ile (örneğin maymun vero hücreleri 12) kokültür için güvenli, tıbbi ve etik olarak birçok hücre denenmiştir. Farklı canlı türlerine ait hücrelerin çeşitli olumsuz sonuçlara neden olabileceği kanısına varıldıktan sonra da insan üreme sistemi hücrelerinden, kumulus granuloza hücreleri [13], tuba uterina-endometriyum [14] ve endometriyum [8] hücrelerinin kullanıldığı kokültür sistemlerine geçilmiştir. Ancak kokültür hücrelerinin faydalı olup olmadığına dair birçok moleküler ve biyokimyasal araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, hücrelerin yapısal karakterleri hakkında çok fazla bilinmeyen vardır. Literatürde özellikle bu hücrelerin morfolojik yapısına dair çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızın amacı endometriyal kokültürde embriyo gelişimine katkı sağlayan bu hücrelerin morfolojisinin ortaya konması ve hücre tiplerinin sınıflandırılması olacaktır. Bu durumda, hücrelerin yapısal özelliklerinin göz önüne serilmesiyle, fonksiyonel durumları hakkında direkt bilgilerin eldesi sağlanabilecektir.

YÖNTEMLER

Grupların belirlenmesi ve biyopsi elde edilmesi

Çalışmamıza iki grup dahil edildi. Vaka grubu olarak, İstanbul Memorial Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine infertilite nedeniyle başvuran ve tıbbi değerlendirmeler sonucunda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) tanısı alan toplam 16 kadının endometriyumlarından biyopsi örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak yine, hastaneye infertilite hariç farklı jinekolojik nedenlerle başvuran fertil bireyler seçildi (n:8). Biyopsi örneklemeinden önce hastalar bilgilendirilerek onamları alındı. Bu çalışma Helsinki Deklerasyonu Prensipleri'ne uygun olarak planlanmış ve İstanbul Memorial Hastanesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

TİB vakalarının ve fertil (kontrol) grubun ortalama yaşları sırasıyla 31±5.3 (minimum: 22- maksimum: 42) yıl ve 32±7.2 (minimum: 22- maksimum: 42) yıl idi. Çalışmamızda TİB grubu, 3 veya daha fazla yardımcı üreme tekniği uygulanmasına rağmen, implantasyonda başarısızlık nedeniyle gebe kalamayan gruptu. Endometriyal biyopsi için bireylerin menstrual siklusun orta luteal fazında olmasına dikkat edildi. Önemli olan parametreler, menstrual siklusun 19-21. gününde olmaları ve ultrasonografi (USG) kontrolünde korpus luteumun gözlenmesi idi.

Endometriyal biyopsi işlemi ameliyathane şartlarında, steril koşullarda sedasyon sağlandıktan sonra gerçekleştirildi. İşlemden negatif basınçlı pipelle aspirasyon yapılarak doku örnekleri elde edildi. Memorial Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'nde endometriyal epitel-gland ve stromal hücre elde edilişi ve kültürü için Barmat ve ark'larının [15,16] kullandığı yöntem laboratuvar koşullarına adapte edilmiş protokolu kullanıldı.

Öncelikle, endometriyal biyopsilerden elde edilen doku örneklerine, histolojik değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla, rutin doku takibi işlemleri uygulandı. Nötral tamponlu %10'luk formalin solüsyonuyla 24 saat boyunca tespit işlemi yapıldı. Tespit sonrasında akşamdan sabaha kadar musluk suyuyla yıkama yapıldı. Dokular daha sonra derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon sağlandı. Ksilol ile şeffaflandırma, parafin+ksilol karışımında bekletme ve sonrasında da parafinde bekletilerek dokuların infiltrasyonu yapıldı ve parafine gömülü doku blokları hazırlandı. Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler toluidin mavisi ile boyandı. Hazırlanan kesitler Olympus BX52 mikroskopla incelendi ve Olympus DP26 kamera ile fotoğrafları çekildi.

Diğer yandan, kokültür yöntemiyle elde edilen endometriyal kokültür hücreleri, pellet haline getirildi ve daha sonra, yukarıdaki rutin ışık mikroskopik doku takibi uygulandı. 5 µm'lik kesitler alındıktan sonra, kesitler toluidin mavisi ile boyandı ve Olympus BX52 mikroskopla incelenerek, Olympus DP26 kamera ile fotoğrafları çekildi.

İstatistiksel değerlendirme

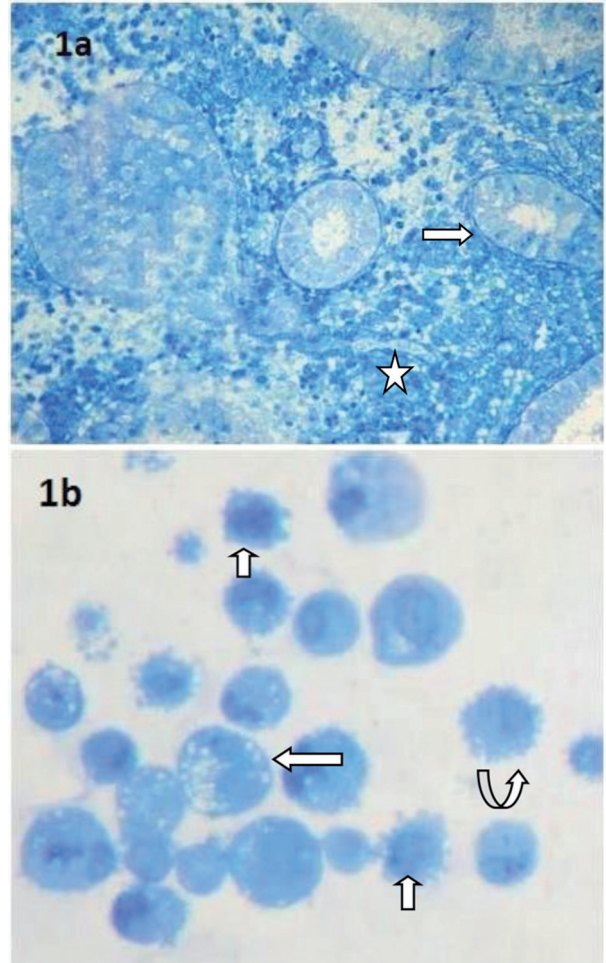
Işık mikroskopunda X20'lik ve X40'luk büyütme ile incelenen preparatlarda, hem fertil hem de TİB grubunda 3 tip hücre tanımlandı. Bireylerin her birine ait beşer fotoğraf ve her fotoğraftan 80-100 hücre sayıldı. Her fotoğraftaki hücre tiplerinin rakamsal değerleri not edildi, tüm fotoğraflar değerlendirilerek her hücre tipinin aritmetik ortalaması alındı. Hücre tiplerine ait sayısal değerler ile istatistiksel analiz yapıldı. Fertil ve TİB grupları arasında, hücre tipleri frekansları açısından gözlenen farklılıkların anlamlı olup olmadığının tespiti için istatistiksel yöntem olarak "ki-kare analizi" uygulandı.

BULGULAR

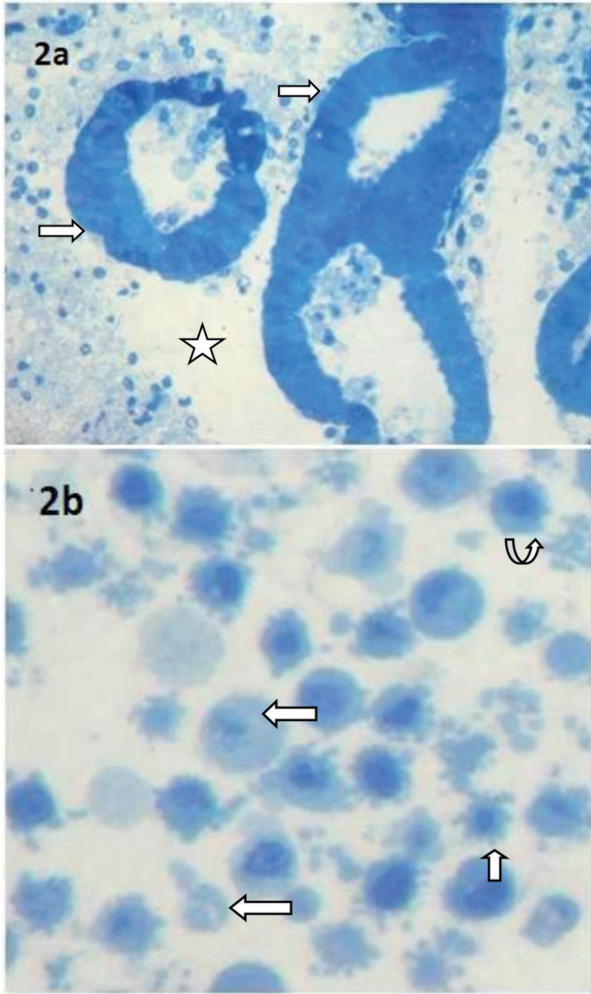
Fertil ve TİB grubunun endometriyum doku kesitlerinin ışık mikroskopik olarak değerlendirilmesi.

Fertil grupta

Lümen bakan yüzeyde sağlam ve süreklilik gösteren epitel hücrelerinden oluşan yüzey epiteli uzanmaktaydı. Bazal lamina altında oldukça yoğun ve çok sayıda hücre içeren stroma yer alıyordu. Aktif stromal hücreler çok sayıda ve belirgindi. Çoğu alanda stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüştüğü belirlendi. Kıvrımlı tübüler bezler, stroma da yaygın ve dikkat çekici yoğunlukta (Şekil 1a). TİB grubunda; epitel hücrelerinin apikal yüzeyde devamlılık sağlayamadığı, yer yer dökülmeler olduğu ve hücrelerin birbiriyle bağlantılarının azaldığı gözlemlendi. Bazal lamina altında stromanın, bazı bölgelerde normal hücresel yoğunlukta bazı bölgelerde ise hücreden fakir ve düzensiz olduğu, bazen de hücre olmayan alanlar oluştuğu gözlemlendi (Şekil 2a).



Şekil 1a,b: Fertil grup endometriyal örtü ve bez epiteli (1a), Fertil grup kokültür hücre tipleri (1b). **Sağ ok:** Endometriyum bez epiteli, **yıldız:** endometriyum stromal alanı, **Sol ok:** vakuollü hücreler, **Yukarı bükülü ok:** mikrovillüslü hücreler, **yukarı ok:** sitoplazmik uzantılı hücreler (Toluidin blue X20, X40).



Şekil 2a,b: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) grubu bez epiteli ve stroma (2a). TİB grubu kokültür hücre tipleri (2b).

Sağ ok: Endometriyum bez epiteli, **yıldız:** endometriyum stromal alanı, **Sol ok:** vakuollü hücreler, **Yukarı bükülü ok:** mikrovillüslü hücreler, **yukarı ok:** sitoplazmik uzantılı hücreler (Toluidin blue. X40).

Endometriyal kokültür hücrelerinin ışık mikroskopik olarak değerlendirilmesi.

Fertil grubun endometriyum kokültür hücreleri

Fertil gruptaki kokültür hücreleri incelendi, özellikleri bakımından farklı üç grup hücre olduğu belirlendi. Birinci grup hücreler "vakuollü hücreler" olarak isimlendirildi. Bu hücre grubu, diğer hücreler arasında en büyük boyutlu olanlardı, seyrek olarak sıralanmış, düzensiz mikrovillusları mevcuttu. Bu hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda vakuol gözleniyordu ve çekirdekleri ökromatik görünümdeydi. Çe-

kirdeklerde belirgin çekirdekçiklerinin varlığı tespit edildi (Şekil 1b).

İkinci grup

Orta büyüklükte olan, sitoplazmalarında az sayıda vakuoller içeren hücrelerdi. Mikrovilluslarının belirgin olması nedeniyle "mikrovillüslü hücreler" olarak adlandırıldı. Çekirdekleri heterokromatik ve ekzantrik yerleşimli, yarım ay görünümündelerdi. Üçüncü ve son grup hücreler ise "sitoplazmik uzantılı hücreler" olarak tanımlandı. Değişik boyutlarda hücrelerdi, sitoplazmik uzantılara sahiptiler. Hücrelerin bir kısmı ökromatik bir kısmı heterokromatik çekirdeklerle sahip görünümdeydi (Şekil 1b).

TİB grubunun endometriyum kokültür hücreleri

TİB grubunda, özellikleri açısından farklı üç tip hücrenin varlığı dikkat çekti. Birinci grup "vakuollü hücreler" şeklinde isimlendirilen ve ökromatik çekirdeklerle sahip olan iri ve bol vakuollü hücrelerdi. Çekirdeklerinde belirgin olarak, çekirdekçiklere sahip oldukları gözlemlendi. TİB olan bireylerde de ikinci grup "mikrovillüslü hücreler"di ve bu hücreler nadiren rastlanan hücre grubuydu. Kontrol grubunda en az sayıda görülen mikrovillüslü kokültür hücrelerine TİB grubunda da nadiren rastlanmaktaydı. Son grup ise "sitoplazmik uzantılı hücreler" şeklinde isimlendirildi. Çok sayıda sitoplazmik uzantılara sahip bu hücrelerin genellikle heterokromatik olan çekirdekleri dikkat çekiyordu (Şekil 2b).

İstatiksel değerlendirme tablosu

Tablo 1'de fertil ve TİB grubunda tanımladığımız hücre tiplerinin sayısal değerleri belirtildi. Fertil grupta en sık görülen hücre tipi sitoplazmik uzantılı hücrelerdi (%40). TİB grubunda ise en sık vakuollü hücrelere rastlanmaktaydı (%80). Her 2 grupta da en az rastlanan hücre mikrovillüslü hücrelerdi. Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda; fertil ve TİB grubu arasında hücre tipleri frekansları açısından farkın anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$).

Tablo 1. Ki-kare testine göre istatistiksel değerlendirme tablosu

Hücre Tipi	Fertil	TİB	p
Vakuollü	18	40	
Mikrovillüslü	12	2	<0.001
Sitoplazmik uzantılı	20	8	

TİB: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı

TARTIŞMA

Üreme sağlığı ve infertilite çalışmalarında; intrauterin patolojilerin erken dönemde tanınabilmesi ve hastalarda gebelik oranının artırılabilmesi için farklı yöntemler denenmektedir [17]. İmplantasyon başarısızlığı üreme tıbbının henüz çözülmemiş önemli bir problemi olup, bu durumdan yetersiz endometriyal reseptivitenin sorumlu olabileceği düşünülmektedir [16]. Bundan sonraki sürecin hedefi, birçok etik ve pratik anlamdaki zorluklara rağmen, insan implantasyon mekanizmasının anlaşılmasına dair bazı sinyal yollarının tanınması ve ortaya konması olmalıdır [2]. TİB ile ilgili olarak bugüne kadar yapılan henüz standardize edilemeyen birçok tanımlar ve terapötik amaçlı çalışmalar vardır [18]. IVF döngüsünde, tekrarlayan düşük ve implantasyon başarısızlığı olan hastalarda granülosit koloni uyaran faktör (G-CSF) ile tedavi, immün terapi için yeni bir öneridir [19]. TİB ile ilgili yapılan son çalışmalarda varılan kanı; daha önce TİB ve endometriyal yaralanma olan kadınların gebelik süreçlerinde, yaralanma öyküsünün endometriyal komplikasyonların insidansını artırmadığı yönündedir [20]. Bunun yanı sıra bazı araştırmacılar, lokal endometriyal yaralanmanın sitokin ekspresyonu gibi inflamatuvar yanıtla, endometriyal reseptiviteyi ve dolayısıyla implantasyon oranını geliştirdiğini bildirmişlerdir [21-23]. Çalışmamızda olduğu gibi, in vitro kokültür sistemleri için gerekli olan endometriyal biyopsi örneğinin alınması da inflamatuvar yanıt gibi bazı mekanizmaları tetikleyerek olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. Ancak, Melnick ve ark'ları [24], endometrial biopsi zamanlamasının, IVF'de otolog endometrial kokültür uygulanan hastalarda, implantasyon oranları ve gebelik sonuçlarını etkileyip etkilemediğini belirlemeye çalışmışlardır. Sonuç olarak, bu gruptaki hastalarda embriyo kalitesi ve gebelik sonuçlarında daha önce ortaya çıkan olumlu gelişmelerin, muhtemelen biyopsi kaynaklı endometriyal yaralanma ile oluşmadığını bildirmişlerdir.

IVF'de kullanılan in vitro kokültür sistemleri, in vivo şartlara olabildiğince benzer koşullar sağlayan sistemlerdir [25-28]. Bu sistemlerden sıralı, tek, kondisyonel ve kokültür sistemleri aktif olarak günümüzde kullanılmaktadır. Otolog endometriyal kokültür sistemini uygulayan Barbat ve ark'ları, bu sistemin embriyo gelişimini iyileştirdiği ve oosit donasyonu vakalarında gebelik oranlarını artırdığını kaydetmişlerdir. 15 Çalışmamızda fertil ve TİB grubuna ait bireylerin endometriyal kokültür hücreleri ışık mikroskopik olarak gruplandırılmaya çalışılmıştır. Endometriyumun fertilitate belirleyici bir faktör olduğunu bildiren Stowitzki ve ark'ları [29] çalışma-

larında, endometriyal tabakalar ve blastosist arasındaki dinamik sürecin burada rol oynayan hücrelerle bağlantısını belirtmişlerdir. Ancak endometriyumda moleküler düzeyde birçok bilinen olmasına rağmen, rutin olarak kullanılan klinik bilgilerin sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu durumda in vitro monolayer endometriyal dokudaki hücre tiplerinin bilinmesi ve doku dinamiğinin aydınlatılabilmesi, klinik uygulamalarda kullanımı açısından yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda endometriyum kokültür hücreleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; literatürde ilk kez hem fertil hem de TİB grubunda morfolojik özellikleri bakımından farklı üç hücre tipi olduğu tanımlanmıştır. Uygulanan kikare testi ile fertil ve TİB gruplarında hücre tipleri frekansları açısından gözlenen farklılık, istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Birinci grup "vakuollü hücreler" olarak adlandırılmıştır. Bu hücrelerin dikkat çeken özellikleri arasında sitoplazmalarında çok sayıda vakuol içermeleri ve seyrek olarak sıralanmış, düzensiz mikrovilluslarının varlığı belirtilebilir. Çok miktarda salgı materyali içeren vakuollerin varlığı, hücrenin zengin bir granüllü endoplazmik retikulum (GER) sistemine sahip olmasını açıklamaktadır. Bu gruptaki vakuollü hücrelerin, kontrol grubunun normal endometriyum dokusundaki salgı materyalini üreten bez epitel hücreleriyle benzer hücreler olduğu düşünülmüştür. Çünkü birbirine fonksiyon olarak benzeyen bu hücrelerin en belirgin özellikleri, luteal evredeki endometriyumda salgı vakuolleri oluşturmalarıdır. İn vitro kültür koşullarındaki salgı vakuollerinin embriyo gelişimine katkıda bulunan özel proteinler salgıladıkları düşünülmüştür. TİB grubundaki hücrelerin incelenmesinde de çok sayıda, irili ufaklı vakuollere sahip hücreler görülmekle birlikte fertil gruptaki kadar dev vakuoller gözlenmemiştir. Bu hücreler, TİB grubu hücreleri arasında en sık gözlenen hücre tipidir. Bu oranın yüksekliği implantasyonun kolaylaşması ve embriyonun beslenmesi açısından çok önemli olan salgı materyalini sağlayabilmek için, çok sayıda vakuol oluşturabilme çabası şeklinde düşünülmektedir. Bu çaba morfolojiye hücre sayısının artışı ve her hücrede çok sayıda vakuol oluşumu şeklinde yansımaktadır. Aynı zamanda çalışmamızdaki bu hücre grubunun fertil gruptaki vakuollü hücrelerden fazla olması istatistiksel açıdan anlamlıdır.

İkinci grup hücreler; az sayıda vakuoller içeren "mikrovilluslu hücreler"dir. Bunlar fertil grup kokültür hücre tiplerinden sayıca en az görülen hücrelerdir. Mikrovilluslu hücrelerin sitoplazmalarında az da olsa vakuoller bulunmaktadır. Bu hücrelerin ilk göze

çarpan belirleyici özellikleri mikrovillusları olmasına karşın, yapı olarak ilk grupta tanıttığımız vakuollü hücrelere benzemeleridir. Hücrenin mikrovillus yapıları, sitoplazmadaki vakuollerin artması ile gittikçe değişime uğradığı izlenimi vermektedir. Kontrol grubunda en az sayıda görülen mikrovilluslu kokültür hücrelerine TİB grubunda da nadiren rastlanmaktadır. Bu durum TİB grubu dokusundaki yetersizlik göstergelerinden biri olarak yorumlanabilir. Diğer yandan, TİB grubunda vakuol içeriğinin oluşma yetersizliğinden dolayı mikrovilluslu hücrelerin vakuollü hücreye dönüşümü çok hızlı gerçekleşmekte olduğu için TİB grubunda en sık vakuollü hücreler tespit edilmiş olabilir. Her iki tip hücre grubunda da vakuollerin varlığı ve salgı materyalinin sağlanmasına yönelik bir hücre dinamiği dikkati çekmektedir.

Üçüncü grup hücreler ise "sitoplazmik uzantılı hücreler" olarak adlandırılmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi, bu hücre tipi fertil grubun en sık görülen hücre tipidir. Sitoplazmik uzantılı hücrelerin yüzeyi embriyo transferi sonrasında implantasyonu kolaylaştıran özel reseptörleri barındıran, belki de embriyonun yaklaşması ve tutunması aşamalarında ilk iletişim kuran, kontrol grubunun pinopod oluşturan yüzey epitel hücreleriyle eş değer hücreler olabilirler. Bir başka deyişle, bu hücreler, embriyonun implantasyon sürecinde etkileşimde bulunduğu yüzey epitel hücrelerinin kokültürdeki görüntüleri olduğu fikrini vermektedirler. TİB grubu sitoplazmik uzantılı kokültür hücrelerinin, fertil grupta olduğu gibi, endometriyum yüzey epitel hücrelerine benzerlik gösteren hücreler olabileceği tahmin edilmektedir. Dokudaki epitel hücrelerinden köken aldıklarından dolayı aynı tip hücre davranışını göstermektedirler. Bazen de bir tarafa doğru tomurcuklanma veya kutuplaşma eğilimi göstermesi ise yüzey epitel hücrelerinden köken aldığı bir kanıtı olarak değerlendirilebilir. Fertil gruptaki gibi bu hücrelerin de yüzey reseptörlerine sahip oldukları, bu reseptörlerin embriyonun tutunmasında ve implantasyonun kolaylaştırılmasında rol oynadıkları düşünülebilir. Sitoplazmik uzantılı bu hücrelerin yüzeyinde, son yıllarda konfokal mikroskopisi ile endometriyal dokuda ortaya çıkarılan HB-EGF, integrinler, HOXA10 gibi preimplantasyon süreci moleküllerinin ekspresyonları bulunabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sitokinlerin, implantasyonu düzenleyen etkisi üzerinde de durulmaktadır [30]. Bilindiği gibi, insan embriyonik kök hücreleri (İEKH) pre-implantasyon döneminde embriyoda gelişen iç hücre kitlesinden elde edilirler. Son dönemde geliştirilen kültürlerde, İEKH'nin besleyici hücre ile birebir temasına gerek olmadığı, ancak hücre tutunmasını sağlayan substratın varlığının

uzun süreli, etkin in vitro İEKH'nin kültürü için gerekli olduğu ileri sürülmüştür [31]. İmplantasyon başarısını artıran sonuçlar için, endometriyal kokültür hücreleri ve İEKH arasındaki hücresel ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, araştırmadaki hedefimiz olan endometriyum kökenli infertilitenin ana sebeplerinden biri olan implantasyon başarısızlığına katkı ve yarar sağlamak üzere uygulanan endometriyal kokültür yönteminin ve hücrelerinin incelenmesi sağlanmıştır. IVF sonuçlarının başarılı olmasındaki sebepler ayrıntılarıyla, hücre tipi ve yapısıyla açıklanmaya çalışılmıştır. Hücre tiplerinin ayrıntılı özelliklerinin incelenmesini ve klinikte infertilite tedavi yöntemlerine yansıtılmasını esas alan daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Maugey-Laulom B, Commenges-Ducos M, Jullien V, et al. Endometrial vascularity and on going pregnancy after IVF. Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio 2002;104:137-143.
2. Bahar L, Baykal T. Endometriyal reseptivitenin implantasyondaki rolü. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2008;1:1-6.
3. Polanski LT, Baumgarten MN, Quenby S, et al. What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion. Reprod Biomed Online 2014;28:409-423.
4. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. J Endocrinol 2011;210:5-14.
5. Bee K, Tan BK, Vandekerckhove P, et al. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. Int J O&G 2005;112:773-780.
6. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod Biomed Online 2014;28:14-38.
7. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update 2006;12:731-746.
8. Racicot KE, Wu'nsche V, Auerbach B, et al. Human chorionic gonadotropin enhances trophoblast-epithelial interaction in an in vitro model of human implantation. Reprod Sci 2014;21:1274-1280.
9. Nardo LG. Human embriyo implantation failure and recurrent miscarriage: basic science and clinical. Reprod Biomed Online 2006;13:11-2.
10. Plachot M, Alvarez S, Merviel P, et al. Role of endometrial cells in "in vitro" embryo development. Assist Reprod Rev 1994;4:85-95.
11. Bahar L, Eras N. Endometrial ko-kültür uygulamaları. Genel Tıp Derg 2012;22:31-36.

12. Kim YB, Ahn SH, Chang DY, et al. Vero cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos in vitro. *J Korean Med Sci* 2002;17:217-219.
13. Nottola SA, Heyn R, Camboni A, et al. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. *Microsc Res Tech* 2006;69:508-516.
14. Bongso A, Fong, CY, Ng SC. Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. *Fertil Steril* 1994;61:976-978.
15. Barmat LI, Liu H-C, Spandorfer CD, et al. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium: A randomized trial. *Fertil Steril* 1998;70:1109-1113.
16. Barmat LI, Liu H-C, Spandorfer SD, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:121-127.
17. Seferli R, Tokmak A, Ersoy AÖ, et al. Assessment of reproductive results of infertile patients who had undergone operative hysteroscopy for intrauterine pathology. *J Clin Exp Invest* 2015;6:52-58.
18. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002;17:213-218.
19. Cavalcante MB, Costa FD, Barini R, Júnior EA. Granulocyte colony-stimulating factor and reproductive medicine: A review. *Iran J Reprod Med* 2015;13:195-202.
20. Tada Y, Kitaya K, Amano N, et al. A pilot survey on obstetric complications in pregnant women with a history of repeated embryo implantation failure and those undergoing single local endometrial injury. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015;42:176-178.
21. Potdar N, Gelbaya T, Nardo LG. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012;25:561-571.
22. Zhou L, Li R, Wang R, et al. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil Steril* 2008;89:1166-1176.
23. Zhang XH, Liu ZZ, Tang MX, et al. Morphological changes and expression of cytokine after local endometrial injury in a mouse model. *Reprod Sci* 2015; doi: 10.1177/1933719115580999.
24. Melnick AP, Murphy EM, Masbou AK, et al. Autologous endometrial coculture biopsy: is timing everything? *Fertil Steril* 2015;104:104-109.
25. Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2638-2646.
26. Urman B, Yakın K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *RBM Online* 2005;11:371-381.
27. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu H-C, et al. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for IVF patients with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:377-381.
28. Spandorfer SD, Soslow R, Clark R, et al. Histologic characteristics of the endometrium predicts success when utilizing autologous endometrial coculture in patients with IVF failure. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:185-189.
29. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006;12:617-630.
30. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation *Hum Reprod Update* 2005;11:613-630.
31. İskender B, İzgi K, Şanlıoğlu S, Canatan H. Human embryonic stem cells and microenvironment. *J Clin Exp Invest* 2014;5:486-495.