

Derleme:

Embriyo transfer öncesi endometrial ko-kültür uygulamaları

Leyla Bahar¹, Nazan Eras²

Mersin Üniversitesi ¹Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, ²Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin

Amaç: Embriyo implantasyon başarısını etkileyen faktörler arasında, embriyo kalitesi, endometrial reseptivite, ve embriyo transfer (ET) tekniği başlıca sayılabilecek etkenlerdir. İn-vitro fertilizasyon uygulamalarından sonuç alamayan infertil kadınlarda başarıyı olumlu yönde etkilemek için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Günümüzde ko-kültür uygulamaları, iyi kalite embriyo transferine rağmen ≥ 3 Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan kadınlar için olumlu sonuca götürebilen önemli bir seçenektir. Endometrial ko-kültür ortamları 'yapay uterus' kavramında da olduğu gibi, embriyoların transfer dönemi öncesi doğala yakın bir ortamda gelişimlerine izin veren sistemlerdir. Bu amaca yönelik, IVF kültür medyumlarına ilave olarak endometrial dokudan hazırlanan ko-kültür sistemleri tercih edilebilmektedir. **Ana bulgular:** Endometrium ile embriyo arasındaki etkileşimin en yüksek düzeyde olduğu dönem, embriyonun implantasyon dönemi olup, embriyo transferinin zamanlanması açısından da kritik bir süreçtir. Embriyo endometrium arası iletişimin 4, 5 ya da 6.gün olması nedeniyle, bu dönemde Embriyo Transferi (ET) yapılması daha avantajlı gibi görünmektedir. Bu uzun süreyi sağlamak için, in vivo şartları mümkün olduğunca taklit edebilen kültür sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. **Sonuç:** Ko-kültür sistemlerinin embriyo gelişimine pozitif etkisi in vivo şartları başarı ile taklit etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu derlemede, yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) ko-kültür uygulamalarının gerekliliği ve sonuçları ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Embriyo implantasyonu, endometrium, infertilite, in vitro fertilizasyon

Endometrial coculture applications before embryo transfer

Objective: It can be considered that the factors which affect the success of embryo implantation, embryo quality, embryo transfer (ET) technique and endometrial receptivity are the main ones. New methods were applied with the practices of invitro fertilization for the women who failed for positive impact on the success. Today, coculture application is an important option that can take a positive outcome for women with ≥ 3 recurrent implantation failure (RIF) despite the transfer of good quality embryos. Endometrial coculture ambience, the artificial uterus as discourse and this system allows development embryos that are prior to the transfer embryos in natural environment. For this purpose, in addition to IVF culture medium, endometrial tissue coculture systems can be preferred. **Main findings:** The period when the highest level of interaction between endometrium and embryo, the embryo implantation period is a critical process in terms of timing of embryo transfer Embryo implantation 4, 5 or 6th day due to the ET in this period seems to be more advantageous. This long-time is to ensure, culture systems that mimic in vivo conditions as possible are needed. **Conclusion:** There is a positive effect of coculture systems on the development of the embryo. The reason for this is that successfully mimicked in vivo conditions. In this review, the requirement and results of assisted reproductive techniques (ART) and coculture applications are discussed.

Key words: Embryo implantation, endometrium, infertility, in vitro fertilization

Genel Tıp Derg 2012;22(1): 31-36

Gönderim tarihi: 03.10.2011

Kabul tarihi: 09.01.2012

Yazışma adresi: Dr.Leyla Bahar, Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin

E-posta: laylabahar@gmail.com

İnsan gelişimi bir oositin fertilize olmasıyla başlar. Fertilizasyon birbirleriyle ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir (1). Fertilize olmuş oosit, fertilizasyon sonrası gelişimine bağlı olarak genellikle 6. günden itibaren endometriuma implantasyon sürecine girer (2). İmplantasyon,

embriyonun endometriuma yerleşmesinin gerçekleştiği kompleks bir işlemdir. İnsan endometriumu; endometrial hücreler ve embriyodan kaynaklanan steroid hormonlar ve parakrin faktörlerin etkisi altında, luteal faz süresince kendini hazırlar embriyoyu kabul etmeye hazır hale gelir. Bu aşamada embriyo ile endometrium arasında hala sınırları çözülmeye çalışılan bir diyalog başlar (3). Lösemi inhibitör faktör (LIF) ve interlökin (İL)-11'de dahil olmak üzere, pek çok parakrin faktör implantasyonu etkiler. Bunun yanısıra endometriumda gelişen pinopodlar, integrinler, HOX genleri ve aynı zamanda oosit kalitesi de implantasyon sonucunda etkilidir (4,5).

Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinden en sık olarak In Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) kullanılmaktadır. İyi kalite embriyo transferine rağmen, gebe kalmadaki başarısızlık, IVF uygulamalarında önemli bir klinik problemdir. IVF'nun başarısını sınırlayan majör faktör, implantasyon yetersizliğidir. İmplantasyon başarısızlığına neden olan etkenlerin çalışılması konusunda dev adımlar atılmıştır. Ancak bunlar terapötik çözümler ile eşleşmemiştir. Önerilmiş birçok girişimin değeri henüz kanıtlanmamıştır veya yan etkileri olabilir. Endometrial reseptiviteyi etkileyen etkenler geniş ölçüde çözülemeden kalmıştır. Gen ekspresyon profili için mikrodiziler kullanan son teknoloji ve progesteron reseptör polimorfizmi, yakın gelecekte daha çok ışık tutabilecektir (6). Embriyonun preimplantasyon dönemindeki gelişiminin artırılması ve besleyici hücreler adı verilen başka hücreler varlığında, ko-kültüre edilen embriyoların implantasyon yeteneğinin geliştirilmesi kavramı yeni bir sistemin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Ko-kültür adı verilen bu sistem için değişik türde birçok hücre kullanılmaktadır (7,8).

Endometrial ko-kültür uygulamaları

IVF'de kullanılan in vitro kültür sistemleri, in vivo şartlara mümkün olduğunca benzer ortam koşulları sağlamayı amaçlayan sistemlerdir (9-11). Bu sistemlerden sıralı, tek, kondisyonel ve ko-kültür sistemleri aktif olarak günümüzde kullanılmaktadır. Barmat ve arkadaşları tarafından endometrial ko-kültür sisteminin embriyo gelişim parametrelerini

iyileştirdiği ve oosit donasyonu vakalarında gebelik oranında da artış sağladığı kaydedilmiştir (11,12). Simon ve ark (13) benzer şekilde, insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini sağlayan ve kültür ortamına embriyonik parakrin moleküllerin salınımını indükleyen endometrial epitel hücrelerinden oluşan bir ko-kültür sistemi tanımlamışlardır. Joo ve ark (14) çalışmasında ise endometrial ko-kültür sisteminin embriyo gelişimini desteklemesini, embriyo ve helper (destek) hücreleri arasında hücreden hücreye direkt temasın varlığına bağlı olduğu iddia edilmiştir. Ayrıca medyumlardan geriye kalan toksik zararlı maddelerin ve reaktif oksijen türlerinin ko-kültür hücreleri tarafından elimine edildiği ve aynı hücrelerin besleyici maddeleri kültür ortamına salarak embriyo gelişimini olumlu etkilediği gösterilmiştir (14). Rubio ve ark (15) implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda endometrial ko-kültür uygulamaları ile daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları elde etmişlerdir. Kumtepe ve ark. (16) endometrial ko-kültür uygulandıktan sonra transfer edilen embriyoların gelişmiş iç hücre kitlesi yapısına sahip olduklarını, gebelik sonuçları ve devam eden gebelik oranlarında anlamlı bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir.

Ko-kültür uygulanan merkezlerde, her ne kadar her hastanın kendi özelliği göz önüne alınarak özel bir değerlendirme ile ko-kültür uygulaması yapılırsa da, konuyla ilgili belli standartların oluşturulması sağlanmıştır. Ko-kültür uygulama endikasyonları; 35 yaş ve üstü hastalar, önceki Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) denemeleri sonucu gebelik elde edilemeyen durumlar, yüksek FSH düzeyine sahip kadınlar, Ovulasyon indüksiyon programlarına kötü yanıt veren hastalar, önceki denemelerinde düşük kalitede embriyo gelişimi (yüksek oranda fragmentasyon, yavaş embriyo gelişimi, düzensiz klivaj) gözlenen hastalar ve 3 veya daha fazla implantasyon başarısızlığı yaşayan hastalar şeklinde sayılabilir (17). Bununla birlikte, ko-kültürün etkinliğiyle ilgili karşıt görüşlerde vardır. Fabbri ve ark (19) ko-kültüre alınan embriyoların uterusu transferinden sonra gebelik oranlarının gerçek artışıyla sonuçların çelişebileceğini belirtmişlerdir. Plachot ve ark (19); ko-kültür sonucunda, granüloza hücrelerinin embriyo gelişimini olumlu etkilemesine rağmen, TİB olan bireylerde gebelik oranlarında bir gelişme sağlamadığını vurgulamışlardır. Urman ve

Balaban (8), canlı blastosistleri daha kapsamlı inceleyebilmek için ko-kültür veya sıralı medyum kullanımı konusundaki tercihin bugün hala tartışmalı bir konu olduğuna dikkat çekmişlerdir. Zhang ve ark (9) ise, embriyonun endometriuma yaklaşması ve invazyonunun ana sürecinin keşfedilmesini sağlayan, yeni bir embriyo implantasyon modeli üzerinde çalışmışlardır. Fare blastosistlerini Ishikawa hücreleriyle kokültüre ederek, bu yeni modelin embriyonun implantasyonu için uygun olup olmadığını araştırmışlardır (8,9).

Ko-kültür yöntemi her ne kadar uygulaması nisbeten zor, titizlik ve tecrübe gerektiren zorlayıcı unsurlar içerse de, TİB olan vakalar için başarıyı artırdığı bilinmektedir. Embriyonun; eskiden beri kullanılmakta olan geleneksel medyumlardan oluşan besiyerleri yerine, anne endometriumundan elde edilen otolog endometrial dokuda kültüre edilmesinin, gebelik oranını olumlu olarak etkilediğini bildiren birçok araştırmada (10,20), otolog endometrial ko-kültür tercih edilmiştir. Bazı araştırmacılar çalışmalarında ko-kültür hücreleri arasında ortaya çıkan etkileşimin morfolojik yansımalarını değerlendirmişlerdir (10,15,21). Daha önce ko-kültür sistemleriyle çalışan araştırmacıların bir kısmı insan hücreleri haricinde hücrelerle ko-kültür çalışmaları yapmışlardır (22,23). Daha sonra insan üreme sistemi kaynaklı olarak tuba uterina (24,25), tuba uterina-endometrium sıralı ko-kültürleri (25,26), endometrium (27,28), kümülüs-granüloza hücreleri (29) gibi farklı hücre grupları da kullanılmıştır. Günümüze kadar yapılmış olan ko-kültür hücrelerine ait ultrastrüktürel çalışmalar, genellikle oosit granüloza hücreleri ile yapılmıştır (30). Nottola ve ark (31) da kültüre edilmiş granüloza hücrelerinin bazı biyolojik özellikleri ve ince yapısı hakkında incelemelerde bulunmuşlardır.

Monolayer endometrial ko-kültür

IVF’de kullanılan in vitro kültür koşulları her ne kadar kabul edilebilir iyi embriyo gelişim ve gebelik oranları sağlasa da bugün hala istenen yeterlilikte değildir. Bu nedenle, embriyo kalitesini geliştirmeye yönelik ileri çalışmalarda modern ko-kültür teknikleri kullanılmaktadır (32,33). Preimplantasyon döneminde embriyonun gelişimi ve başarılı implantasyona hazırlığı açısından endometrial epitel hücrelerinden oluşan bir ko-kültür sistemi

tanımlanmıştır. Bu sistemlerinin en büyük avantajı, ko-kültür hücrelerinin ortama embriyotrofik maddeleri salması ve ortamdaki toksik maddelerin kültür medyumundan uzaklaştırmasıdır (34). Besleyici maddeler, büyüme faktörleri, sitokinler embriyotrofik faktörleri oluştururken, kültür medyumunda ortaya çıkan amonyum, serbest radikaller, ağır metaller de atılması gereken toksik ajanları oluşturmaktadır. Monolayer ko-kültürlerin özelliklerinden biri medyumda ortaya çıkan embriyotrofik faktörlerin hücre tipine spesifik olmamasıdır. Aynı zamanda kültür ortamındaki zararlı elementlerin elimine edilmesi de bu hücre tiplerinin genel özelliği sayılabilir. Ayrıca monolayer ko-kültür hücrelerinin genel etkilerinin yanı sıra hücre tipine spesifik belirli etkileri de olabilir (35). Monolayer ko-kültür hücrelerinin asıl işlevi, blastosist aşamasına kadar embriyoların in vitro koşullarda kültüre edilebilmesini ve bunun sonucunda yüksek implantasyon başarısını sağlayabilmesidir. Bu işlevini, insan embriyosunun in vitro koşullardaki metabolizmasını düzenleyerek gerçekleştirebilmektedir (36). Serum destekli medyumlarla ko-kültürün kıyaslandığı prospektif randomize çalışmalarda da somatik hücreler ile ko-kültüre edilen embriyoların blastosiste ulaşma oranlarında artış görülmüştür (37). Buna karşın, ko-kültür sistemleri ve geleneksel medyumlar arasında fark olmadığını belirten çalışmalar da vardır (38,39).

Her ne kadar günümüzde Yardımla Üreme Teknikleri’nde kullanılan ticari kültür sistemleri in vivo koşulları sağlamaya çalışsa da, üreme sistemi hücrelerinin sekrete ettiği büyüme faktörleri ve potansiyel parakrin sinyaller yönünden eksiktirler (12). Dinamik bir organizma olan embriyo, hem otokrin hemde çevresinden gelen parakrin sinyallere yanıt verebilir. Grup halinde kültüre edilen insan embriyolarında morfolojik karakterlerinin daha iyi geliştiği ve bu durumun, embriyolardan açığa çıkan faktörler ile sağlandığı belirtilmiştir. Embriyodan çıkan parakrin sinyallerin, endometrial stromal hücreleri uyararak insülin benzeri bağlayıcı protein (insülin-like binding protein) sentezini uyardığı gösterilmiştir (40).

Monolayer ko-kültür sistemlerinde, helper hücreleri denilen farklı tipte hücreler kullanılmaktadır. Kullanılan hücrelerden biride insan endometrial

stromal hücreleridir. Bu hücrelerin in vivo ortamdaki embriyonun implantasyonunda, fizyolojik rollerinin bilinmesine rağmen, ko-kültür sistemlerindeki işlevsel mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (40,41). Ko-kültür için besleyici hücre olarak endometrium haricinde kumulus hücrelerini kullanan Cihangir ve ark., kumulus hücre destekli embriyo transferinin çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde ICSI prosedürünün başarısını artırdığını belirtmişlerdir (42).

Ko-kültür sistemleri birbirleriyle kıyaslandığında “Autolog Endometrial Co-culture” (AECC) sisteminin etik, medikal ve pratik açıdan kolaylaştırıcı özelliklerinin daha fazla olduğu söylenebilir (43). Endometrial ko-kültür hücreleri, insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini desteklemesinin yanı sıra, embriyonun parakrin salınımını da uyarmaktadır. Bu hücreler, $\beta 3$ integrin subünitleri gibi adeziv moleküllerin salınımını düzenleyerek endometrial reseptivitenin gelişimini de sağlamaktadır (44,45). IVF sırasında ko-kültür için başka bir hücre tipi kullanımı, implantasyon potansiyeli yüksek olan iyi kalite embriyolarda, canlı ve sağlıklı dünyaya gelme oranlarını olumlu etkilemektedir (46). TİB olan kadınlarda ise, bu kültür sistemi, transfer sonrası embriyo ve endometrium arasında daha iyi bir uyum oluşmasını sağlayacak embriyonik genom ekspresyonunu düzenlemektedir. Son yıllarda araştırmacılar, embriyonun endometriuma stabil olarak tutunabilmesi ve invazyonu için yeni kokültür modelleri oluşturma çabasında dırlar. Daha öncede bahsedildiği gibi bunun için fonksiyonel steroid hormon reseptörlerini eksprese ettiği düşünülen insan Ishikawa hücrelerini kullanmaktadırlar (8,47). Başka bir kokültür modeli ise insan endometrial endotelyal hücreler ve apoptotik trofoblast hücreleri arasındaki etkileşime ve endometrial endotelyal hücrelerin sitokin üretimine dayalı bir kokültürdür (48). Amaç yine endometrial reseptivite ve implantasyonda oluşabilecek başarısızlıklara yeni çözümler üretmeye çalışmaktır.

Sonuç olarak, IVF de blastosist transferi, implantasyon ve gebelik açısından, klivaj dönemi embriyo transferlerine göre daha başarılıdır. Bu nedenle özellikle çoğul gebelik riskini azaltmak ve gebelik şansını arttırmak için blastosist dönemi embriyo transfer stratejisi benimsenmektedir (47).

AECC uygulamaları blastosiste kadar embriyonun kültüre edilebilmesini sağlaması nedeniyle tercih sebebidir. Aynı zamanda iyi kalite embriyonik gelişim sağlanarak, X veya Y bağlantılı hastalıklar ve tek gen hastalıkları için embriyo biyopsisi yapılabilmesine olanak vermektedir. Birçok avantajına rağmen, IVF vakalarında endometrial reseptivite gelişiminin anlaşılması açısından, endometrial ko-kültürle ilgili bilinenler yetersizdir (43).

Kaynaklar

1. Acosta AA. Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49:467.
2. Obermair A, Obruca A, Pohl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil Steril* 1999; 72:269-275.
3. Hill JA. Maternal-embryonic cross-talk. *An N Y Acad Sci* 2001; 943:17-25.
4. Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, Clark I, Paiva P, Kovacs G, et al. Interleukin-11, IL-11 receptoralpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 2006; 69:53-64.
5. Kızılay G, Çakmak H, Arıcı A. Endometriosis ve implantasyon. *Trakya Univ Tıp Fak Derg* 2007;24:90-7.
6. Ola B, Li T. In vitro fertilizasyonu takiben implantasyon. *Current Opinion in Obstet and Gyn* 2006;1:14-20.
7. Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, et al. Cocultures of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2638-46.
8. Zhang D, Lv P, Zhang R, Luo Q, Ding G, Yin L, et al. A new model for embryo implantation: Coculture of blastocysts and Ishikawa cells. *Gynecol Endocrinol* 2012;28:288-92.
9. Urman B, Yakın K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *RBM Online* 2005; 11:371-81.
10. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu H-C, Mele C, Veeck L, Rosenwaks Z. 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; 40:377-81.
11. Barmat LI, Worrilow KC, Payton BV. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril* 1997; 67:775-9.
12. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Kowalik A, Mele C, Xu K, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:121-7.
13. Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí 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; 84:2638-46.
14. Joo BS, Kim MK, Jin Na, Moon HS, Lee KS, Kim HD. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril* 2001;75:193-9.
 15. Rubio C, Simon C, Mercader A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod* 2000;15:31-8.
 16. Kumtepe Y, Kıran H, Tokat Z, Kendirci A, Çetin T. Yardımcı üreme tekniklerinde ko-kültür kullanımı. *Arşiv.* 2007;16:235-43.
 17. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13:9-14.
 18. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Ceccani S, Nottola S. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J Assist Reprod & Genet.* 2000;17:1-12.
 19. Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandematurel Baum J, et al. Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993;8:2133-40.
 20. Spandorfer SD, Clarke R, Bovis L, Liu H-C, Neuer A, Witkin SS, et al. Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial coculture: Correlation with embryonic development and outcome for patients with a history of multiple implantation failures after IVF. *Am J Reprod Immunol* 2000;43:6-11.
 21. Feng HL, Wen XH, Amet T, Presser SC. Fertilization and early embryology: Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996;1:1525-8.
 22. Schillaci R, Ciriminna R, Cefali E. Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development: Preliminary results. *Hum Reprod* 1994;9:1131-5.
 23. Neimer KE, Hoffman DI, Maxson WS. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 1993;8:97-101.
 24. Yeung WSB, Ho PC, Lan EYL, Chan STH. Improved development of human embryos *in vitro* by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod* 1992;7:1144-9.
 25. Bongso A, Ng SC, Fong CY. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992;58:569-74.
 26. Bongso A, Fong, CY, Ng SC. Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. *Fertil Steril* 1994;61:976-8.
 27. Plachot M, Alvarez S, Merviel P. Role of endometrial cells in "*in vitro*" embryo development. *Assist Reprod Rev.* 1994;4:85-95.
 28. Jayot S, Parneix Y, Verdaguer S. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995;63:109-14.
 29. Saito H, Hirayama T, Koine K. Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril* 1994;62:555-8.
 30. Suzuki S, Kitai H, Tojo R, Seki K, Oba M, Fujiwara T, et al. Ultrastructure and some biological properties of human oocytes and granulosa cells cultured in vitro. *Fertil Steril* 1981;35:142-8.
 31. Nottola SA, Heyn R, Camboni A, Correr S, Machiarelli G. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. *Microsc Res Tech* 2006;69:508-16.
 32. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992;58:569-74.
 33. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:9-14.
 34. Fukaya T, Chida S, Murakami T, Yajima A. Is direct cell-to-cell contact needed to improve embryonic development in coculture? *Tohoku Exp Med* 1996;180:225-32.
 35. Gondolfi F, Moore RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987; 81:23-28.
 36. Barnea ER, Check JH, Grudzinski JG, Maruo T. Implantation and early pregnancy in humans. In: Liu HC, editor. *Advanced Technologies improve embryo implantation after IVF-ET.* London: The Parthenon Publish Group, 1994.
 37. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:9-14.
 38. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91-148.
 39. Tucker MJ, Morton PC, Wright G. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. *Hum Reprod* 1996;11:2434-7.
 40. Ching Liu H, Ying He Z, Mele MS, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin like growth factors and their receptors in coculture human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:361-7.
 41. Castro-Rendón WA, Castro-Álvarez JF, Guzmán-Martínez C, Bueno-Sánchez JC. Blastocyst-endometrium interaction intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1373-85.
 42. Cihangir N, Görkemli H, Özdemir S, Aktan M, Duman S. Kumulus hücre ko-kültürünün ve kumulus destekli embryo transferinin embriyonik gelişim ve gebelik oranlarına etkisi. *J Turkish-German Gynecol Assoc* 2010;11:121-6
 43. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J, et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2638-46.
 44. De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portole's E, Remohi J, Pellicer A, et al. Immunoreactive human embryonic interleukin-1 system and endometrial factors regulating their

- secretion during embryonic development. *Biol Reprod* 1996;54:563-74.
45. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohi J, Polan ML, et al. Embryonic regulation of integrins $\beta 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 1$ in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2607-16.
46. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86:839-47.
47. Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction* 2010;139:905-14.
48. Gardner D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-8.