

Fertil ve İmplantasyon Başarısızlığı Olan İnfertil Kadınlarda Endometrial Doku Ko-kültürlerinin Karşılaştırılması

Leyla BAHAR^{a1}, Semra KAHRAMAN², Tülin BAYKAL³, Bora REŞİTOĞLU⁴

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

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

³Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

⁴Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

ÖZET

Amaç: İmplantasyon başarısızlığı, in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu çalışmada, fertil kadınların ve daha önceki IVF uygulamalarında implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınların, endometrial ko-kültürlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya fertil on kadın ve Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) olan onyeddi kadın dahil edildi, endometriyumlarından biyopsi örnekleri alındı. Endometrial örnekler monolayer ko-kültür tekniği uygulandı. Fertil ve TİB grubu bireylerin endometrial ko-kültüründe gland ve stromal hücreler invert mikroskopla değerlendirildi ve istatistiksel analizi yapıldı.

Bulgular: Fertil ve TİB grubu kadınların endometrial ko-kültürleri mikroskopik olarak karşılaştırıldı. Gland ve stromal hücrelerin gelişimi açısından morfolojik farklar gözlemlendi. Fertil grupta endometrial ko-kültür hücrelerinin gelişimi TİB grubundan daha iyiydi. TİB grubu hücreler, daha az gelişmişti ve daha az sayıya sahipti. Kantitatif açıdan TİB grubu hücrelerinin gelişimi daha azdı. Fertil ve TİB grubunda gland ve stromal hücrelerin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı farklılık tesbit edildi.

Sonuç: Fertil ve TİB olan kadınların endometrial ko-kültürleri karşılaştırıldığında sadece morfolojik olarak değil ayrıca istatistiksel açıdan da anlamlı fark tesbit edilmiştir. Ancak, endometrial ko-kültür uygulamalarının, TİB hastalarında implantasyon oranlarını artırdığı belirtilmektedir. O halde, implantasyonu ve embriyo gelişim kalitesini artıran moleküler mekanizmaların açıklanmasını sağlayacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, Ko-kültür, Endometrium

ABSTRACT

Comparison of Endometrial Tissue Co-cultures in Fertile and Infertile Women with Implantation Failure

Objective: Failure of implantation is one of the most important factors affecting the success of in vitro fertilization (IVF) applications. In this study, women in fertile and infertile women with previous implantation failure in IVF applications are aimed to be compared within their endometrial co-cultures.

Materials and Methods: Ten fertile women and the seventeen women with recurrent implantation failure (RIF) were included to the study, endometrium biopsy samples were taken. Monolayer of co-culture technique was applied to the endometrial samples. In the endometrial co-culture of fertile and RIF group individuals, glands and stromal cells were evaluated by invert microscope and statistical analysis was performed.

Results: Co-cultures of the endometrium of fertile and RIF group women were compared with the microscope. Morphological differences were observed for the development of gland and stromal cells. In the fertile group, development of endometrial co-culture cells was better than RIF group. RIF group co-culture cells, less developed and had less number. Development of RIF group cells was less than quantitative terms. As a result of comparison of gland and stromal cells statistically, in fertile and RIF group, significant difference was observed.

Conclusion: When the endometrial co-cultures of fertile and RIF women were compared, the difference was found significant not only morphologically but also statistically. However, it was stated that the endometrial co-culture applications increase the implantation rates in RIF patients. So new studies are needed to explain the disclosure of molecular mechanisms of implantation and to improve the quality of the embryo development.

Key Words: Recurrent implantation failure, Co-culture, Endometrium

İn vitro fertilizasyon (IVF); laboratuvar koşullarında fertilize edilen oositten meydana gelen embriyonun, uterus içerisine yerleştirildiği bir tekniktir. IVF'da kullanılan in vitro kültür sistemleri, in vivo şartlara mümkün olduğunca benzer ortam koşulları sağlamayı amaçlayan sistemlerdir (1-3). Endometrial ko-kültür

sistemini uygulayan Barbat ve ark. (4) tarafından, bu sistemin embriyo gelişim parametrelerini iyileştirdiği ve oosit donasyonu vakalarında gebelik oranında artış sağladığı kaydedilmiştir. Simon ve ark. (1), insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini sağlayan ve kültür ortamına embriyonik

^a Yazışma Adresi: Dr. Leyla BAHAR, Mersin Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin, Türkiye
Tel: 0 324 234 77 23

e-mail: lavlabahar@gmail.com

parakrin moleküllerin salınımını indükleyen endometrial epitel hücrelerinden oluşan bir ko-kültür sistemi tanımlanmıştır. Monolayer ko-kültürlerin özelliklerinden biri medyumda ortaya çıkan embriyotrofik faktörlerdir. Aynı zamanda kültür ortamındaki zararlı elementlerin elimine edilmesi de bu hücre tiplerinin genel özellikleri arasındadır. Ko-kültür hücrelerinin asıl işlevi, embriyoların in vitro koşullarda blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini sağlamak ve yüksek implantasyon başarısını elde edebilmektir. Bu işlevini, insan embriyosunun in vitro koşullardaki metabolizmasını düzenleyerek gerçekleştirebilmektedir (5). İnaktif kümülüs hücreleriyle yapılan monolayer ko-kültür uygulamasında blastosist gelişiminin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (6). Serum destekli medyumlar ile ko-kültürün kıyaslandığı prospektif randomize çalışmalarda da somatik hücrelerle ko-kültüre edilen embriyoların blastosiste ulaşma oranlarında artış görülmüştür (7). Buna karşın, ko-kültür sistemleri ve geleneksel medyumlar arasında fark olmadığını belirten çalışmalar da vardır (8). Birçok avantajına rağmen, IVF vakalarında endometrial reseptivite gelişiminin daha iyi anlaşılması açısından endometrial ko-kültürle ilgili bilinenler yetersizdir. Diğer hücre tiplerinin varlığında da, ko-kültürle embriyoların implantasyon yeteneğinin artırılması, ko-kültür sistemlerinin ileri gelişimiyle bağlantılıdır. Özellikle implantasyonun fonksiyonel çalışmaları için ko-kültürde uygun hücre dizilerinin kullanımı önemlidir (9). Bu amaçla, insan üreme dokularından örneğin; ovidükt, endometrium, kümülüs-granüloza, nonhuman hücreler hatta ovaryan karsinoma hücreleri gibi çok sayıda hücre tipi kullanılabilir. Ko-kültürün faydalı etkileri için; besleyiciler, substratlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi embriyotrofik faktörlerin salınımı sözkonusudur (1). Erken embriyonik gelişme döneminde, sitokinler ve büyüme faktörleriyle ilgili olarak, embriyo ve anne arasında güçlü bir geçiş olduğu kanıtlanmıştır (10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için iki grup oluşturuldu. TİB grubu için, İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Genetik Tanı Merkezi'ne infertilite nedeniyle başvuran ve TİB endikasyonu konan toplam 17 birey ve çeşitli nedenlerle polikliniğe başvuran fertil 10 bireyin endometriyumlarından alınan biyopsi örnekleri toplandı. Örnekleme yapılmadan önce bireyler bilgilendirildi ve onamları alındı. İstanbul Memorial Hastanesi Etik Kurul onayı alınarak çalışmaya başlandı. IVF laboratuvarında endometrial gland epitel ve stromal hücre izolasyonu ve ko-kültür için Barmat ve ark.'nın (4, 11) kullandığı yöntemin laboratuvar koşullarına adapte edilmiş protokolü uygulandı.

Steril koşullarda, pipelle (Endocell, France) alınan endometrial biyopsi örnekleri, Early's Balanced Salt Solution (EBSS) veya %0.9 izotonik sodyum klorür

içinde IVF laboratuvarına getirilerek işleme başlandı. Tüm işlemler laminal flow altında steril koşullarda gerçekleştirildi. Endometrial dokular birkaç kez EBSS ile kan ve mukusun uzaklaştırılması için yıkandı. Yıkama sonrası doku parçaları mekanik olarak makas ile yaklaşık 1-2mm³ lük küçük parçalara bölündü ve 15ml'lik santrifuj tüplerine (Falcon 2095) transfer edildi. Enzimatik ayrıştırma için, doku parçalarının üzerine 0,25mg/ml kollajenaz Tip II ilave edildi, otomatik pastör pipeti ile birkaç kez homojenize edilip 5 dk. oda ısısında bekletildi (gravite sedimentasyon) ve bu süre sonunda çöken doku parçalarının üzerindeki süpernatant çekilerek başka bir tüpe transfer edildi. Diğer tüpe transfer edilen süpernatant 400g'de santrifuj edilerek, santrifuj sonrasında süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletinin üzerine L-Glutaminli RPMI 1640, 1% PSA (penisilin, streptomisin, amfoterisin) ve 10,1% denature maternal serum ilave edildi. İlk tüpte dibe çöken ve enzimatik yolla tamamiyle parçalanmamış olan doku parçalarının üzerine tekrar kollajenaz Tip II 0,25mg/ml konuldu ve 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk bekletildi. Aynı işlem birkaç kez daha tekrarlandı. Her seferinde süpernatant tüpten alınarak 1500g'de 5 dk santrifujlendi ve stromal hücrelerin izolasyonu sağlandı. Enzimatik yolla tamamen ayrıştırılmayan ve özellikle gland epitel hücreleri içeren dokular ise kollajenaz Tip II ile muamele edildi. Bu işlemler sonunda stromal hücreler ve tüpün dibinde kalan ve kar tanelerine benzeyen gland hücre grupları için tüplerin üzeri etiketlendi. Gland hücre grubu olarak kalan hücre peleti, 25cm²'lik hücre kültür flaskına ekildi. Stromal hücreler için etiketlenen tüplerin içerikleri tek bir tüpte toplanarak 1500g'de 5dk santrifujlendi ve doku kültür flasklarına aktarıldı. Ko-Kültür medyumlarının 3 günde bir, günlük olarak hazırlanmış olan yeni ko-kültür medyumunu ile değiştirilmesi sağlandı.

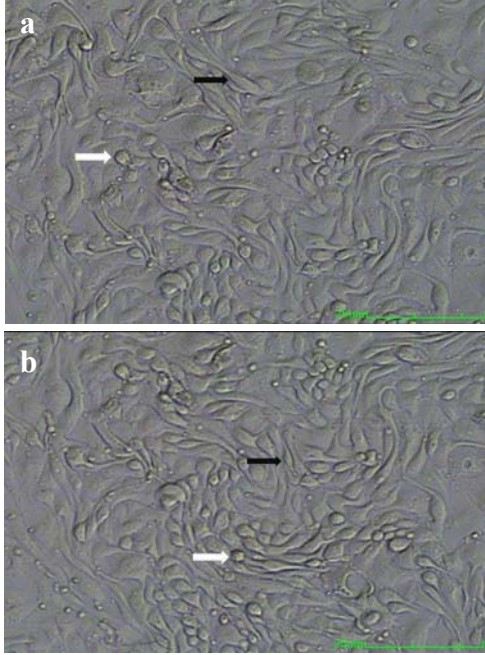
İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 11.5 paket programı kullanıldı. Fertil ve TİB grubundaki gland epitel ve stromal hücreler arasında karşılaştırma yapılabilmesi için Independent-Samples T testi uygulandı.

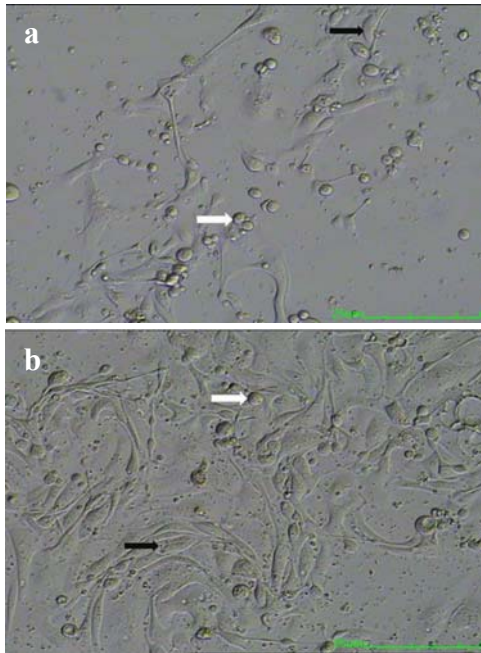
BULGULAR

Fertil ve TİB grubu bireylerin endometrial gland epiteli ve stromal hücre içeren ko-kültürlerinin invert mikroskopla görüntüleri incelendi. Şekil 1a ve 1b; fertil, Şekil 2a ve 2b'deki fotoğraflar ise TİB grubunun 7-10 gün kültüre edilen endometrial dokularından elde edildi. Fotoğraflar invert mikroskopla X40'luk büyütmelemlerde çekildi. Her iki grupta da endometrial gland epitel hücreleri ve stromal hücreler belirgin olarak izlendi. Fertil gruba ait Şekil 1a ve 1b'de, kültür kabını %90 oranında kaplayan ko-kültür hücreleri gözlemlendi. Kabın büyük kısmında gland ve stromal hücrelerin iyi konflue oldukları tesbit edildi. Gland epitel hücreleri yuvarlak ve uzantsız daha belirgin sınırlı oluşlarıyla, stromal hücrelerse çok uzantılı, iğsi biçimleri ile ka-

rakteristik görünümde izlendi. Şekil 2a ve 2b’de ise TİB grubu ko-kültür hücrelerinin fertil gruptakine benzer şekilde yer yer iyi konflue oldukları, yer yer daha az gelişim gösterdikleri tesbit edildi. Ayrıca fertil ve TİB grubunun gland ve stromal hücrelerinin karşılaştırılması yapıldığında, hem sayısal hem de kültür ortamındaki gelişimleri açısından farklılıklar olduğu gözlemlendi.



Şekil 1a, 1b. Fertil grup endometriyal doku ko-kültürlerinde gland ve stromal hücreler. Beyaz ok; gland hücresi. Siyah ok; stromal hücre.



Şekil 2a, 2b. TİB grubu endometriyal doku ko-kültürlerinde gland ve stromal hücreler. Beyaz ok; gland hücresi. Siyah ok; stromal hücre.

Fertil ve TİB grubu gland epitel hücreleri

değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan farklı olduğu bulunmuştur ($p=0.001$). Fertil ve TİB grubu stromal hücreleri karşılaştırıldığında ise, yine istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($p=0.001$), (Tablo 1).

Tablo 1. Fertil ve TİB grubundaki kadınların endometrium doku ko-kültürlerinin gland ve stroma hücreleri açısından karşılaştırılması

		n	Ortalama±SD
Gland hücreleri	Fertil	10	33,12 ± 4,85
	TİB	17	22,37 ± 4,43
Stroma hücreleri	Fertil	10	40,25 ± 5,20
	TİB	17	22,37 ± 4,43

*SD: Standart Sapma

TARTIŞMA

Ko-kültür yöntemi her ne kadar uygulaması nisbeten zor, titizlik ve tecrübe gerektiren zorlayıcı unsurlar bulundursa da, birçok araştırmada TİB olan vakalar için başarıyı artırdığı bilinmektedir. Embriyonun; eskiden beri kullanılmakta olan geleneksel medyumlardan oluşan besiyerleri yerine, anne endometriyumundan elde edilen olog endometrial dokuda kültüre edilmesinin, gebelik oranını olumlu olarak etkilediği bildirilmiş (3, 12, 13) ve olog endometrial ko-kültür birçok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir. Ko-kültür uygulanan merkezlerde, her hastanın kendi özelliği göz önüne alınarak özel bir değerlendirme ile ko-kültür uygulaması yapılarak, konuyla ilgili belli standartların oluşturulması sağlanmıştır. Ko-kültür uygulama endikasyonlarını sıralayacak olursak; 35 yaş ve üstü hastalar, önceki Yardımcı 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 fragmantasyon, yavaş embriyo gelişimi, düzensiz klivaj) gözlenen hastalar ve 3 veya daha fazla implantasyon başarısızlığı yaşayan hastalar şeklinde sayılabilir (7). Bizim çalışmamızda da bu endikasyonlardan bir veya birkaçı nedeniyle önceki YÜT denemelerinde gebelik elde edilemeyen, üç veya daha çok sayıda implantasyon başarısızlığı olan hastalar ko-kültür uygulamasına dahil edilmiştir.

Joo ve ark' nın (14) çalışmasında endometrial ko-kültür sisteminin embriyo gelişimini desteklemesinde, embriyo ve helper (destek) hücreleri arasındaki hücreden hücreye direkt temasın varlığının etkili olduğu ifade 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. Birçok araştırmacının ko-kültür uygulamalarıyla ilgili olarak olumlu sonuçlar elde ettikleri ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, ko-kültürün etkinliğiyle ilgili karşıt görüşlerde vardır. Fabbri ve arkadaşları ko-

kültüre alınan embriyoların uterusu transferinden sonra gebelik oranlarının gerçek artışıyla, sonuçların çelişebileceğini belirtmişlerdir (15). Plachot ve ark. (16) ko-kültür sonucunda, granülosa hücrelerinin embriyo gelişimini olumlu etkilemesine rağmen, TİB olan bireylerde gebelik oranlarında bir gelişme sağlamadığını vurgulamışlardır. 2008'de yapılan bir meta-analizin detaylarında, ko-kültür çalışmaları arasında tutarsızlıklar ortaya çıktığı tesbit edilmiştir. Ancak insan veya insandan farklı çeşitli hücre dizilerinin kullanılmış olması, hücre tipi spesifikliği gibi durumlardan dolayı randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (17, 18).

Bu çalışmada, fertil ve TİB olan kadınların endometrial ko-kültürleri incelendiğinde, fertil grup ko-kültürlerinde, gland epitel hücreleri ve stromal hücrelerin hem morfolojik hemde sayısal açıdan oldukça iyi gelişim gösterdikleri sonucuna varılmıştır. (Şekil 1a,1b). Bu durum fertil bireylerde endometriyumun implantasyon için gerekli morfoloji ve moleküler alt yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir. TİB grubunda ise gland epitel hücreleri ve stromal hücrelerin gelişim ve sayısal olarak farklılık gösterdikleri ortaya çıkmıştır (Şekil 2a, 2b). Ancak endometrial ko-kültür uygulamalarının bu grup için ne oldukça faydalı sonuçlar doğurduğu bilinmektedir. Rubio ve arkadaşları (19) implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda endometrial ko-kültür uygulamaları ile daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları elde ettiklerini belirtmişlerdir. Kumtepe ve ark. 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 gözlemlendiğini bildirmişlerdir (20). Bizim çalışmamıza alınan TİB grubu örneklerde de ko-kültür uygulamalarında başarılı sonuçlar elde edildiği sonucu doğrulanmaktadır.

Bazı araştırmacılar ko-kültür uygulamalarının başarısını ortaya koymak üzere ko-kültür hücreleri arasında ortaya çıkan etkileşimin morfolojik yansımalarını değerlendirmişlerdir (3, 19, 21). Endometriyumun gland epitel hücreleri ve stromal hücreleri ile salınan sitokinler yoluyla Otolog endometrial ko-kültür (AECC), embriyo kalitesini geliştirir ve implantasyonda önemli bir rol oynar (13, 22). Embriyo gelişiminde rol oynayan çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerinin yanı sıra özellikle LIF salınımının başarılı endometrial implantasyonda anahtar rol oynadığı farelerde tesbit edilmiştir (23). Endometrial hücrelerin gelişiminde yavaşlama, embriyo gelişiminde eksiklik olarak fark edilecektir. Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalar-

da; endometriyumun rolünü belirlemek ve geliştirmek için ileri çalışmalar planlanmalıdır. AECC uygulamalarında, endometriyumun histolojik açıdan değerlendirmek faydalı bir bakış açısı getirebilir (24).

Son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından embriyonun implantasyon başarısının artırılması için alternatif olarak yeni yöntemler denenmektedir. Desai ve arkadaşları, AECC uygulamalarının potansiyel dezavantajları olmaksızın, yeni bir non-kontakt insan endometrial ko-kültür sistemi elde ettiklerini bildirmişlerdir (25). Başka bir araştırmacı grubu da, embriyonun endometrial hücrelere tutunma ve invasyon aşamalarını açıklayabilmek için yeni bir in vitro implantasyon modeli geliştirdiklerini belirtmişlerdir (26). İmplantasyon boyunca endometriyum ovaryan steroidlerin ve spesifik zamanlı çok sayıda sitokin salınımının etkisi altındadır. Endometriyum kaynaklı sinyaller, uyumlu bir şekilde blastosist gelişiminden ve embriyonik sinyallerin aktivasyonundan sorumludur (27). Yine son çalışmalarda endometrial ko-kültür sisteminde, IL-6 gibi endometrial epitel hücreleri tarafından salgılanan önemli faktörlerin katkısı göz önüne alınarak, blastosist gelişimi ve implantasyon oranlarında artış gösterilmiştir (28).

Bizim çalışmamızda, TİB grubunun endometrial ko-kültür gelişimi incelendiğinde, fertil gruba göre daha az hücre içerdiği gözlemlenmiş olup, istatistiksel analizle de doğrulanmıştır (Tablo 1). Bu durum TİB grubu ko-kültür hücrelerinin, embriyonun gelişimini olumlu yönde etkileyen, fragmantasyonu azaltan ve implantasyonda oluşan başarısızlıkları çözen bazı faydalı yollar içerdiğini düşündürmektedir. Endometrial ko-kültür sistemlerinin blastosist gelişimi ve implantasyon üzerine olumlu etkisinin, endometrial epitelyal hücrelerin sekrete ettiği faktörlere bağlı olduğu belirtilmektedir. AECC, TİB grubu hastalarda faydalı sonuçlar vermektedir. Bu sistemdeki hücrelerin morfolojik ve moleküler özelliklerinin iyi bilinmesi için yapılacak yeni çalışmalarla, invivo ortamda implantasyon için endometriyumun yetersiz yapısının tamamlanmasına çözüm bulunmalıdır (18,29). Ancak implantasyon boyunca meydana gelen sinyaller ve bu sinyallerin embriyo ve endometrium arasındaki diyalogta ne şekilde etkili olduğunun yorumuna dair hala birçok bilinmeyen vardır. Sonuç olarak embriyo endometriyum arası etkileşimlerle ilgili olarak bilinmeyen yolların ortaya konulabilmesi için morfolojik, fizyolojik, ve moleküler açıdan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. 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: 2638-46.
2. 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.

3. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu HC, 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: 377-81.
4. Barmat LI, Liu HC, 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: 121-7.
5. Barnea ER, Check JH, Grudzinskas JG, Maruo T. Implantation and early pregnancy in humans. In: Liu HC (editor). *Advanced Technologies improve embryo implantation after IVF-ET*. 1st edition, London: The Parthenon Publishing Group, 1994.
6. Ju S, Rui R. Effects of Cumulus Cells on In Vitro Maturation of Oocytes and Development of Cloned Embryos in the Pig. *Reprod in Domestic Animals*. <http://Onlinelibrary.Wiley.com/doi/21> Oct 2011.
7. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with super numerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 9-14.
8. 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.
9. Hannan NJ, Pavia P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines? *Biol of Reprod* 2010; 82: 235-45.
10. Desai N, Goldfarb J. Cocultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments; pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the coculture interval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1600-5.
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. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expression during human implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 101: 104-8.
13. Spandorfer SD, Clarke R, Bovis L, 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.
14. Joo BS, Kim MK, Jin NA, et al. 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. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, et al. Human Embryo Development and Pregnancies in an Homologous Granulosa Cell Coculture System. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 622-9.
16. Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, et al. Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8: 2133-40.
17. Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of co-culture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 1069-76.
18. Zeyneloğlu H, Kahraman S, Pirkevi C. Co-culture techniques in assisted reproduction: history, advances and the future. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2011; 2: 29-40.
19. Rubio C, Simon C, Mercader A, et al. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 6: 31-8.
20. Kumtepe Y, Kıran H, Tokat Z, Kendirci A, Çetin T. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ko-Kültür Kullanımı. *Arşiv* 2007; 16: 235-43.
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. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 613-30.
23. Fouladi-Nastha AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, et al. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol* 2005; 281: 1-21.
24. 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: 185-9.
25. Desai N, Abdelhafez F, Bedaiwy MA, Goldferb J. Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *RBM Online* 2008; 16: 869-74.
26. Zhang D, Lv P, Zhang R, et al. A new model for embryo implantation: coculture of blastocysts and Ishikawacells. *Gynecol Endocrinol* 2011 Nov.22 <http://informahealthcare.com>.
27. Armant DR. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic-developmental program of trophoblast-cells. *Dev Biol* 2005; 280: 260-80.
28. Dominquez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simon C. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 2010; 93: 774-82.
29. Bahar L. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınlar ve fertil kadınların olog endometrial doku ko-kültürlerinin ince yapı düzeyinde karşılaştırılması. *Doktora Tezi*. Mersin 2008.

Gönderilme Tarihi: 06.03.2012