

Konu 8

Otolog Endometrial
Kokültür Uygulaması

Biolog Semra SERTYEL

GİRİŞ

Günümüzde yardımcı üreme teknikleri ile sağlanan başarı oranlarının embriyo transferi başına %35-40 oranında olduğu gözlenmektedir. Bununla beraber, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) gözlenen alt hasta grubunun, infertilite problemi somut olarak ortaya konulamamış olmakla beraber embriyo gelişim kalitesinin artırılması yönünde yoğun çalışmalar gösterilmektedir. Başarılı bir implantasyonun oluşumuna engel olan henüz tanımlanmamış birçok etken öne sürülmesine rağmen bazı fizyolojik, immünolojik, genetik ve endokrinolojik faktörlerin bu başarısızlığa neden olduğu kanıtlanmıştır. Tüm faktörlerin laboratuvar şartları ve manüplasyon tekniklerinin optimize edildiği şartlarda, ideal embriyo gelişimi şartlarına göre kurgulanmış hazır kültür ortamları bazı hastalarda yetersiz kalabilmektedir. Embriyonun beslenme ve gelişimini sağlayan reseptörlerin aktivasyonu sağlamaması nedeni ile gelişim duraksaması, yavaşlaması, kalitesinin bozulması veya embriyo ile gelişim ortamı arasında uyum sağlanamaması genetik veya fizyolojik problem olmamasına rağmen negatif sonuçlara sebep olabilmektedir (2). Genel olarak bu grup hastalarda yavaş ya da düşük kalitede embriyo gelişimi gözlenmiştir. Embriyo kültür ortamlarının optimize edilmesinin yanında, hergün yeni gelişimler gösteren konversiyonel kültür ortamı modellerinin

kullanımı, laboratuvar ortamlarının çok daha in-vivo şartlara yaklaştırılıp kontrol altına alınabilmesi gündeme gelmiştir. Bunlarla birlikte bu grup hastalarda çalışılan bazı deneysel kokültür modellerindeki hücre grupları ile (feeder cells) ile daha yüksek kalitede embriyo eldesi ile kazanılmış çok değerli gebelikler sağlanmıştır (1-5).

Özellikle tek düzlemli otolog endometrial kokültür (OEK) hücreleri (autologous endometrial coculture) ile umut verici birçok sonuç rapor edilmiştir (6-8). Bu yaklaşım başka bir hastanın hücrelerinden olası bir kontaminasyon olasılığında ortadan kaldırmaktadır. Bu konudaki sonuçlarda, araştırmacıların sonuçlarında sıkça vurgulanan yüksek oranda ve daha fazla blastomer sayısına sahip blastosist eldesinin yanı sıra daha düşük oranda fragmentasyon ve blastomer büyüklüklerindeki eşitlik, bunların doğal sonucu olarak sağlanan yüksek gebelik ve implantasyon oranlarıdır (9-11). Embriyo gelişimi hakkında bilgimiz her geçen gün artmasına rağmen, gelişen bir embriyo için gerekli olan tüm ihtiyaçların gerekli konfigürasyonlarda sağlanabilmesi bir embriyo kültür ortamı henüz tanımlanabilmiş değildir. Bu nedenle anne ortamına en yakın ve otolog bir sisteme duyulan ihtiyaç sonrası destekleyici bir sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Basal olarak hazır kültür ortamı kullanılırken aynı ortamda destekleyici ve besleyici bir hücre yapısında bu kültür ile embriyo arasında tampon olarak yer almaktadır. Döllenmiş gamet hücrelerinin embriyo transfer işlemine kadar olan süre içerisinde tek bir düzlemde çoğaltılarak kültüre edilen özel somatik hücreler ile aynı ortamda geliştirilmesi kokültür embriyo gelişim sistemi olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte sonuçlar halen tartışmalı bulunmakta ve OEK tekniği halen IVF uygulamalarında yaygın olarak kullanılmamakla beraber bu sistem sonuçlara göre artık tanımlanmış endikasyonlar çerçevesinde yer almaktadır.

- En az iki başarısız tüp bebek denemesi
- Gelişen embriyolarda belirgin yavaş gelişim izlenmesi (3.günde <6 blastomer)
- Kötü Morfolojide embriyo gelişimi (düzensiz klivaj, uneven blastomer, yüksek fragmentasyon)

konudaki etkilerini ve embriyo gelişim kalitesini nasıl arttırdığını çalışmaları ile göstermiştir (20,21,22,24,25,26,27,32,33,43,35). Tüm bu çalışmalar özellikle bazı büyüme faktörlerinin (TGF- α , TGF- β 1, PDGF- α , ILGF I-II, GMCSF) ortama düzenli olarak salgılanması sonucu embriyo gelişiminin farklılaşması üzerine yapılandırılmıştır.

Başarılı bir endometrial kültür düzlemi için, stromal ve glandular hücrelerin bir arada ve eşit oranlarda varlığının gerekliliği gene birçok çalışmada belirtilmiştir (38). Bu hücreler tarafından birlikte yönlendirilen parakrine düzenlemeler sonrası genetik ekspirasyonlar, hücresel gelişim ve büyüme faktörlerinin ortamda bulunmasının embriyo gelişimi üzerine etkileri gözlenmiştir. Bu parakrin etkilerde rol oynayan glykodelin (placental protein-14 veya α 2-PEG olarak bilinir) arttığı ortamlarda bu iki hücre tipinin varlığı, çalışma mekanizmaları ortaya konmuş, embriyo gelişimi, gebelik ve implantasyon oranları üzerine etkileri yayınlanmıştır (36-38). Sonuç olarak yapılan tüm vaka sonuçlarının tartışıldığı ya da bu sonuçların mekanizmasını açıklaya yönelik çalışmalar endometrial kokültürün doğru endikasyona sahip hasta grupları üzerine başarılarını ortaya koymaktadır. Zahmetli ve uzun süren bu protokoller bu seçilmiş olan hasta grubunda önemli bir alternatif oluşturmakta ve günümüz IVF laboratuvarlarında yerini almaktadır.

Teşekkür

Kokültür çalışmalarının başlaması ve sürdürülmesi sürecinde çok büyük destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Semra Kahraman'a teşekkürlerimizle.

KAYNAKLAR

1. Bongso A, Ng SC, Fong C-Y, Ratman S. Co cultures: a lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil Steril 1991;67: 120-2.
2. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek I, Damario M, Rosenwaks Z. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. Fertil Steril 1998;70:1109-13.
3. Dirnfeld M, Goldman S, Gonene Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. Fertil Steril 1997;67:120-2.
4. Feng HL, Wen XH, Amet T, Pesser SC. Effect of different coculture systems in early human embryo development. Hum Reprod 1996;11:1525-8.
5. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut A, Niccollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. Hum Reprod 1992;7(Suppl 1):101-6.
6. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patient with repeated failures of implantation. Fertil Steril 1995;63:109-14.
7. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD. 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.
8. Rubio C, Simon C, Mercader A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. Hum Reprod 2000;15(Suppl 6):31-8.
9. Mercader A, Garcia-Velazco J, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells. Fertil Steril 2003;80:1162-8.
10. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veek L, Davis OK, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with IVF failures: outcome of the first 1030 cases. J Reprod Med 2004;49:463-7.
11. Spandorfer S, Park J, Davis O, Clarke R, Rosenwaks Z. A case controlled study evaluating autologous endometrial coculture (AECC) as an effective tool for young patients (age < 36 years) with multiple failed IVF attempts and diminished ovarian reserve. Fertil Steril 2007;88(Suppl 1).
12. Gandolfi F, Brevini T, Moore RM. Co culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. Molecular reproduction and development (1989).
13. Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL, Chan STH. Improvement development of human embryos in vitro by a human oviductal cell coculture system. Human Reproduction 1992;7/8 (1144-1149).
14. Weimer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlenberg B, Fiore I et al. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following coculture on bovine oviductal epithelial cells. Human Reproduction (1993) 8:97-101.
15. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early development in vitro by co-culture on monolayers of vero cells. (1996) Biol. Reprod. (42) (301-306).
16. Lai Y.M., Lee C.L., Chang S.Y.: Mouse embryos cocultured with various generations of human ampullary cells. J. Formos Med. Assoc. (1992) Suppl.2: (139-143).
17. Plachot M, Mandelbaum J, Cohen J. Fertilization

- and early embryology: Coculture with granulosa cells does not increase the fertilization rate in couples with previous fertilization failures. *Human Reproduction*; 1993 (8) :1455-1458.
18. Quinn P, Margelit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 1996: Vol:13 No:1
 19. Barmat L, Spandorfer SD, Xu K. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertility and Sterility* 1998;70:1109-1113.
 20. Liu HC, Mele C, Rozenwaks Z. Production of insulin like-growth factor binding proteins (IGFBPs) by human endometrial stromal cells is stimulated by the presence of embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 1995: Vol:12 (78-87)
 21. Liu HC, Mele C, Veeck LL. Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility* 1999; 71(361-367).
 22. Simon C, Pellicer A. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl 1):11.
 23. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J. Coculture of human embryos with autologous human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*(1999);84 (2638-2646)
 24. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A. Embryonic regulation of integrins $\beta 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 1$ in human endometrial epithelial cells in vitro. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2000. Vol: 82 no:8 (2607-2616).
 25. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu HC. 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. *American Journal of Reproductive Immunology*(1998);40: (377-381).
 26. Spandorfer SD, Clarke R, Bovis L, Liu HC. 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. *American Journal of Reproductive Immunology* (2000);43 (6-11)
 27. Spandorfer SD, Clarke R, Liu HC. Leukemia inhibiting factor (LIF) production by autologous endometrial co-culture (AECC) is associated with outcome for patients with a history of multiple implantation failure. *American Journal of Reproductive Immunology* (2001);46 (375-380).
 28. Spandorfer SD, Barmat LI, Navvaro J, Liu HC. Importance of the biopsy date in autologous endometrial co-cultures for patients with multiple implantation failures. *Fertility and Sterility* 2002a; 77 (1209-1213).
 29. Spandorfer SD, Barmat LI, Navvaro J, Liu HC. Autologous endometrial co-culture in patients with a previous history of poor quality embryos for patients with multiple implantation failures. *of assisted reproduction and genetics*. 2002b; 19 (309-312).
 30. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and Mouse preimplantation embryo (review) ; *Journal of endocrinology* (2002) 172, (221-236).
 31. Bo Sun Joo, Mi Kyung Kim, Yong Jin NA; The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertility and sterility* (2001), vol.75(1) (193-199)
 32. Liu HC, Mele C, Catz D, Noles N, Rozenwaks Z. Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by human endometrial stromal cells is stimulated by the presence of embryos. *JARG* (1995);12 (78-87).
 33. Liu HC, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rozenwaks Z. Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. *Fertility and sterility* (1999) (71) (361-367).
 34. De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portales E, Simon C. Immunoreactive human embryonic interleukin-1 system and endometrial factors regulating their secretion during embryonic development. *Biol Reprod.*(1998) 54:563-574.
 35. Imakawa K, Chang K, Christenson R: Preimplantation conceptus and maternal uterine communications: Molecular Events Leading to Successful Implantation. *Journal of Rep And Dev.* (2004) 50:2 (Review)
 36. Nieto F, Watkins W, Lopata A. The effect of coculture with autologous cryopreserved endometrial cells on human in vitro fertilization and early embryonic morphology a randomized study. *J. Asist Rep. Gen.* (1996):13;(386-389)
 37. Eyheremendy V. Et al. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*-2008
 38. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 2001;16:836-45.