

INJEKSI MEDIA KULTUR EMBRIO SUPERNATAN DALAM UTERUS UNTUK MENINGKATKAN ANGKA IMPLANTASI EMBRIO PADA MENCIT

Injection of Embryo Culture Medium Supernatant into Uterine Cavity to Improve Embryo Implantation Rate in Mice

Diah Tri Widayati¹, Bambang Sugito², Tri Wahyu Pangestiningih³, Dwi Liliek Kusindarta³, dan Jaswadi⁴

¹Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Program Pendidikan Konsultan Infertilitas Endokrinologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: tri_widayati@ugm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh injeksi media kultur embrio supernatan ke dalam uterus mencit 2 hari sebelum transfer embrio (TE) terhadap angka implantasi, yang diindikasikan oleh adanya embrio dan *leukemia inhibitory factor* (LIF) pada uterus. Mencit jenis Swiss Albino dibagi menjadi 2 kelompok yakni kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, masing-masing terdiri atas 30 mencit. Kelompok perlakuan mendapat injeksi media kultur embrio supernatan (MKES) dalam uterus 2 hari sebelum TE sedangkan kelompok kontrol mendapat injeksi media kultur embrio (MKE) dalam uterus 2 hari sebelum TE. Dua hari setelah TE (h6 kebuntingan), mencit dipertusi dengan menggunakan larutan paraformaldehid 4% dan diambil uterusnya. Uterus diproses untuk blok parafin dan dipotong dengan mikrotom setebal 5 µm. Preparat dideparafinisasi dan diproses imunohistokimia dengan kit ABC dan antibodi LIF. Preparat diperiksa di bawah mikroskop untuk melihat implantasi embrio, distribusi LIF, dan jumlah LIF di desidua dan non-desidua. Angka implantasi antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol masing-masing adalah 52,77 dan 40,88% ($P < 0,05$). Jumlah LIF desidua pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol masing-masing adalah 12,83 dan 8,83 ($P < 0,05$) sedangkan jumlah LIF di non-desidua antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol masing-masing adalah 8,00 dan 4,50. Dapat disimpulkan bahwa injeksi media kultur embrio supernatan 2 hari sebelum TE dapat meningkatkan angka implantasi pada mencit.

Kata kunci: kultur embrio supernatan, angka implantasi, *leukemia inhibitory factor*

ABSTRACT

The research was conducted to examine the effect of supernatant embryonic media culture injection into mice uterine at 2 days prior to embryo transfer implantation rate, indicated by the presence of implanted embryos and *leukemia inhibitory factor* (LIF) in the uterine. Swiss Albino mice were divided into two experimental groups, supernatant embryonic media culture injected (MKES, 30 mice) and control (MKE, 30 mice). The medium were injected into uterine cavity 2 days prior to embryo transfer. Then, the recipients were sacrificed at 2 days after embryo transfer (day 6 of pregnancy), perfused using formaldehyde 4%. The uterine were sampled and then processed for paraffin blocking and cut for 5 µm. After deparaffinization, samples were subjected for immunohistochemistry using ABC Kit dan LIF antibody, and then observed under microscope. This research showed that implantation rate on MKES group (52.77%) was significantly higher than control/MKE (40.88%) ($P < 0.05$). Number of LIF in decidua of MKES group was higher (12.83) than control group (8.83) ($P < 0.05$). Similarly, the number of LIF in non-decidua was significant different ($P < 0.05$) between MKES group (8.00) and control (4.50). It can be concluded that injection of embryonic culture supernatant 2 days before embryo transfer improves the implantation rate in mice.

Key words: embryonic culture supernatant, implantation rate, *leukemia inhibitory factor*

PENDAHULUAN

Komunikasi antara embrio dan endometrium (*cross-talk*) memegang peranan penting dalam keberhasilan implantasi dan kebuntingan. Hal ini dimulai sejak terjadinya embrio dan perjalanan dari saluran tuba Fallopii sampai implantasi pada endometrium. Embrio menghasilkan beberapa faktor selama perkembangannya dan memberi sinyal keberadaannya kepada organ maternal. Dalam 1-2 hari setelah fertilisasi dapat dideteksi adanya *early pregnancy factor* (EPF) pada sirkulasi darah maternal yang mempunyai sifat *immunosuppressive* dan berhubungan dengan proliferasi sel dan pertumbuhan (Fan dan Zheng, 1997).

Saat terjadinya implantasi embrio, endometrium harus dalam keadaan kondusif untuk memungkinkan perlekatan, implantasi, dan pertumbuhan awal plasenta.

Salah satu sinyal dari embrio yang memodulasi reseptor endometrium adalah *human chorionic gonadotropin* (hCG). Hormon hCG diproduksi oleh blastosis pada hari ke 7-8 pasca fertilisasi. Substansi lain yang disekresi embrio sebelum implantasi adalah *platelet activating factor* (PAF) yang mungkin bagian dari aktivitas *immunosuppressive* untuk menginduksi toleransi maternal terhadap embrio (Bose, 1997). Embrio mencit dan kelinci sebelum implantasi menghasilkan prostaglandin E2 yang menstimulasi terbentuknya PAF yang berhubungan dengan kenaikan permeabilitas vaskular (Sharkey, 1998).

Endometrium menghasilkan sitokin yang berperan dalam proses implantasi, yaitu *colony-stimulating-factor-1* (CSF-1), *leukemia inhibitory factor* (LIF), dan interleukin-1 (IL-1). Ekspresi CSF-1 dan reseptor untuk CSF-1 ditemukan baik pada endometrium maupun pre-

implantasi embrio (Lessey, 2002; Speroff dan Fritz, 2005).

Leukemia inhibitory factor (LIF) merupakan salah satu sitokin yang esensial untuk suksesnya implantasi, diekspresikan pada embrio serta jaringan dewasa, ditemukan dalam kadar yang tinggi pada uterus. Pada permukaan sel, LIF reseptor β berikatan dengan glikoprotein gp-130, suatu bentuk afinitas reseptor yang tinggi yang memacu terbentuknya sinyal dan menginduksi molekul-molekul dan berkontribusi pada ekspresi sel stroma (Kimber, 2005).

Kholkute *et al.* (2000) menyatakan bahwa LIF berperan pada fungsi endometrium manusia dan spesies domestik. Selanjutnya dikemukakan LIF mRNA dan protein diekspresikan pada glandula di endometrium selama fase luteal siklus menstruasi ketika implantasi akan terjadi. Keduanya, LIF-r β dan gp-130 diekspresikan pada seluruh bagian lumen endotelium (LE) pada wanita terbukti subur, tetapi LIF mRNA dan protein juga diekspresikan pada stroma desidua dan gp-130 pada desidua, gp-130 protein di lokalisasi pada epitelium glandula pada fase sekretoris *mid* dan *late*. Bentuk *soluble* dari gp-130 dikeluarkan oleh endometrium, dibentuk oleh pecahan proteolitik dan dikeluarkan dalam kadar yang tinggi pada pertengahan fase luteal. Keadaan ini distimulasi oleh estrogen bersama progesteron dalam kultur sel epitelial endometrium. Hal ini menandakan bahwa kemungkinan tinggi rendahnya kadar potensial antagonis meregulasi aktivasi dari ikatan membran reseptor IL-6 *family*. Adanya misregulasi *soluble* gp-130 pada pasien *unexplained infertility* adalah bukti tambahan dari peranan sitokin IL-6 *family* pada fungsi endometrium kehamilan normal. Di samping itu, korelasi telah ditunjukkan antara kadar LIF dan LIF-R dan formasi LE dalam kavum uteri, utamanya sebagai tanda reseptivitas (Mikolajczyk *et al.*, 2003; Ghosh dan Sengupta, 2004).

Beberapa penelitian menunjukkan ekspresi LIF pada beberapa studi berhubungan dengan keguguran berulang dan beberapa kondisi *unexplained infertility* sesuai dengan perannya dalam awal kehamilan (Kimber, 2005). Ekspresi LIF diperlukan secara mutlak dalam proses implantasi, tanpa LIF implantasi tak akan terjadi (Cullinan *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2002).

Pada mencit, kadar LIF mRNA yang tinggi terjadi sebelum implantasi dalam glandula epitelium seiring peranan estrogen pagi hari pada hari ke-4 kebuntingan. Kadar LIF yang tinggi juga dilaporkan pada hari ke-4, terutama pada sebagian epitelium di stroma. Pada mencit yang mengalami ovariectomi, LIF mRNA meningkat 1 jam setelah estrogen dan tidak berpengaruh dengan progesteron. Protein LIF mRNA turun pada hari 6-7 kebuntingan dan perubahan yang singkat dari sinyal LIF mempunyai peran yang penting dalam proses implantasi. Pada hewan mencit LIF diproduksi oleh glandula epitel (GE) mungkin berperan sebagai faktor parakrin dalam endometrium. Protein LIF juga diperlukan untuk desidualisasi dan implantasi blastosis, sedangkan pada manusia LIF r β terbatas pada LE (Mitchell *et al.*, 2002).

Blastosis mamalia mengekspresikan LIF-R dengan *reciprocal expression* LIF oleh *trophoblast* dan reseptornya pada *inner cell mass* (ICM). Pada blastosis mencit, LIF menambah perkembangan dan diferensiasi blastosis *in vitro*. Embrio dengan LIF-*null*, gp-130-*null*, dan LIF-R-*null* semuanya dapat berkembang sampai periode pre-implantasi dan implantasi, menandakan bahwa LIF tak ada fungsinya pada embrio selama waktu itu. Akan tetapi gp-130 diperlukan untuk reaktivasi blastosis untuk implantasi (Mitchell *et al.*, 2002).

Trophoblast dari blastosis murin meng-*upregulasi* metalloproteinase 9 (MMP-9) dan *plasminogen activator* untuk merespons LIF dan MMP-9 memegang peranan dalam invasi *trophoblast* ke dalam uterus. Protein LIF menstimulasi hCG dan produksi *oncofetal fibronectin* oleh human *trophoblast* (Kimber, 2005).

Pada embrio transfer, angka implantasi tertinggi diperoleh bila siklus reproduksi dari embrio donor sinkron dengan siklus resipien. Sinkronisasi endometrium uterus dan blastosis dapat dicapai melalui pengaruh hormon ovarium progesteron dan estrogen. Progesteron akan memacu terjadinya *pre-receptive stage* yang responsif terhadap estrogen. Dalam uterus, estrogen atau estradiol akan terikat pada reseptornya dan menyebabkan terjadinya reseptivitas uterus. Hal tersebut akan menjadi pendorong uterus untuk menghasilkan *growth factor* seperti *epidermal growth factors* (EGF), *heparin-binding* EGF (HB-EGF) dan LIF. Protein-protein tersebut dengan pengaruh *hoxa* 10 akan menyebabkan ekspresi enzim-enzim *cyclo-oxygenase* (COX enzim), yaitu enzim utama yang mensintesis prostaglandin. Enzim COX-2 penting pada proses implantasi tersebut oleh karena pada percobaan tikus bila didapatkan defek enzim COX-2 maka endometrium tidak dapat menerima embrio sehingga prostaglandin (terutama *prostaglandin*) sangat penting perannya untuk mendukung kemampuan uterus menerima blastosis meskipun mekanismenya belum diketahui dengan jelas (Sharkey, 1998; Speroff dan Fritz, 2005). *Heparin-binding* EGF diduga berperan dalam poses implantasi karena hanya disekresikan oleh sel-sel pada tempat yang potensial untuk terjadinya implantasi pada mencit yaitu pada permukaan epitel rongga uterus. Selain itu, HB-EGF mampu menstimulasi pertumbuhan *trophoblast* dan daerah perlekatan blastosis (Sharkey, 1998).

Trophoblast dari blastosis menghasilkan interleukin (IL)-1 β . Jaringan uterus mengandung reseptor-reseptor untuk *growth factor* tersebut dan IL-1 diperlukan untuk memelihara uterus dalam stadium yang mampu menerima embrio. Bila tidak didapatkan reseptor IL-1 atau reseptor IL-1 tidak berfungsi maka tidak akan terjadi adhesi antara uterus dan *trophoblast*. Telah diperkirakan bahwa proses terjadinya adhesi dan dilanjutkan dengan invasi pada endometrium melibatkan adhesi molekul. Molekul adhesi pada permukaan epitel endometrium adalah α v β integrin, *ligand* osteopontin (OPN). Keduanya mempunyai peranan pada endometrium atau memfasilitasi

perlekatan ke permukaan epitel sebelum invasi. Kedua protein ini regulasinya berbeda, progesteron menstimulasi ekspresi OPN sedangkan ekspresi $\alpha v \beta 3$ distimulasi oleh HB-EGF (Lessey, 2002; Aplin, 2007).

MATERI DAN METODE

Mencit Swiss Albino betina dewasa fase luteal, dibagi ke dalam 2 kelompok. Kelompok 1, diberi media kultur embrio supernatan (MKES) sedangkan kelompok 2, diberi media kultur embrio (MKE) sebagai kontrol. Pre-implantasi embrio diperoleh dari mencit donor hari ke-2 kebuntingan.

Prosedur Penelitian

Koleksi dan transfer embrio

Mencit donor yang telah dikawinkan, pada hari ke-2 kebuntingan (H2) diambil embrionya dengan cara *flushing* pada oviduk. Mencit dibius dengan ketamin, dosis 4 mg/kg bobot badan dengan pengenceran 10 kali, disuntikkan dalam kavum abdomen. Setelah mencit tak sadar, dalam posisi telentang kemudian disayat kulit abdomen bawah dan diambil organ reproduksinya. Oviduk kanan dan kiri kemudian dipotong dengan skalpel dan diletakkan di cawan, dilakukan *flushing* dengan cairan *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS). Embrio dikoleksi dengan bantuan penggunaan mikroskop. Embrio diinkubasi dalam media TCM-199 (Sigma, USA) dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 39°C, CO₂ 5%, dan kelembaban 95% selama 48 jam atau hingga mencapai fase morula. Mencit resipien diberi stimulasi dengan 7,5 IU PMSG dan 7,5 IU hCG (Teikoku Zouki, Tokyo, Japan). Pada hari ke-5 diamati status reproduksi dengan cara *vaginal smear*. Mencit yang berada pada fase estrus, dikawinkan dengan mencit jantan vasektomi. Pada hari ke-6 mencit resipien untuk kelompok perlakuan disuntik dengan MKES sedangkan kelompok kontrol disuntik dengan MKE. Transfer embrio dilakukan pada hari ke-8.

Nekropsi dan sampling

Pada hari ke-10 (hari ke-6 kebuntingan), mencit resipien dibius dengan ketamin 4 mg/kg bobot badan, kemudian dilakukan perfusi dengan cara menyuntikkan larutan paraformaldehid 4% dalam PBS ke dalam pembuluh darah mencit. Uterus diambil dan diproses untuk blok parafin. Selanjutnya dibuat preparat dengan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m.

Immunohistokimia

Preparat 5 μ m dideparafinisasi dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia dengan kombinasi metode standar (Jackson dan Blythe, 2008) dan vectastain ABC (Vector Laboratories, USA). Sebagai antibodi primer digunakan LIF (N-18, Santa Cruz Biotechnology, USA) dengan pengenceran 1:500 dan antibodi sekunder (ABC *staining* kit) dengan pengenceran 1:200. Selanjutnya, preparat di-*counter staining* inti sel dengan Mayer hematoksin selama 30

detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Setelah dilakukan dehidrasi dalam etanol dan xilol, diamati keberadaan embrio dalam lumen endotelium (LE) dan distribusi LIF di area desidua maupun non-desidua dengan mikroskop.

Analisis Data

Data dianalisis dengan independent *t-test* untuk angka implantasi dan *two way anova* untuk jumlah sel positif LIF.

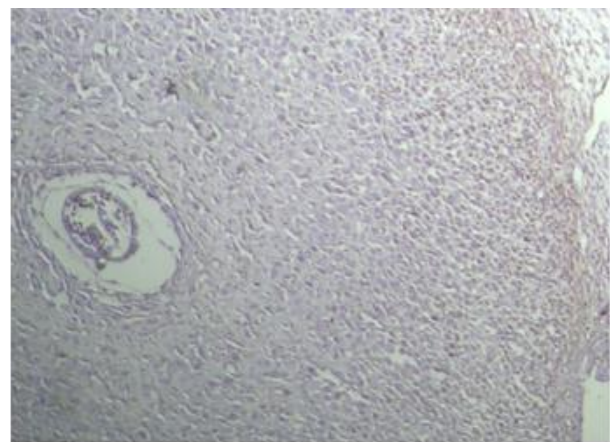
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada LE dijumpai embrio baik pada kelompok MKES ataupun MKE (Gambar 1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) angka implantasi antara kelompok MKES (52,77%) dan kelompok kontrol (40,88%) seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Angka implantasi mencit kelompok yang diberi médium embrio supernatan (MKES) dan médium kultur embrio (MKE)

Kelompok	Jumlah transfer embrio	Jumlah implantasi embrio	Angka implantasi (%)
MKES	115	64	52,78 ^a
MKE	109	46	40,89 ^b

^{a,b}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)



Gambar 1. Embrio dalam lumen endotelial (LE) mencit

Kenaikan angka implantasi pada kelompok perlakuan juga oleh Goto *et al.* (2007). Angka kebuntingan pada kelompok perlakuan meningkat dan kelompok kontrol masing-masing adalah 87 dan 48%. Peningkatan angka kebuntingan sebesar 39% sangat bermanfaat dalam bidang reproduksi.

Kejadian implantasi lebih banyak pada kelompok yang mendapat MKES dibanding yang tak mendapat MKES sebelum embrio transfer, disebabkan pada kelompok pertama reseptivitas endometriurnya lebih baik dibanding kelompok kedua. Hal ini dimungkinkan pada kelompok yang mendapat MKES mendapat *signaling* lebih awal dari pre-implantasi embrio sehingga endometrium lebih reseptif (Sharkey, 1998; Aplin, 2007). Pada penelitian ini tidak dilakukan

pemeriksaan kadar EPF, hCG, PAF pada media supernatan, namun dengan dipilihnya embrio yang berkualitas baik, maka diperkirakan jumlah EPF, hCG dan PAF yang dihasilkan mencukupi dan dapat menstimulasi endometrium menjadi reseptif.

Implantasi adalah merupakan proses yang dinamis yang melibatkan embrio, dimulai dari *hatching*, aposisi, adhesi, dan invasi ke epitel endometrium. Kesiapan endometrium dalam menerima embrio itu ditandai dengan perubahan yang terjadi pada permukaan endometrium, yaitu lapisan sel yang terluar berubah berupa *pinopodes* yang memudahkan embrio mengadakan kontak dengan permukaan endometrium. Perubahan endometrium untuk implantasi adalah suatu proses yang melibatkan beberapa faktor, dimulai dari peranan hormon steroid yang dihasilkan ovarium maternal, estrogen, progesteron, autokrin, parakrin, molekul adhesi, dan sitokin-sitokin (Lash dan Legge, 2000; Makrigiannakis, 2007).

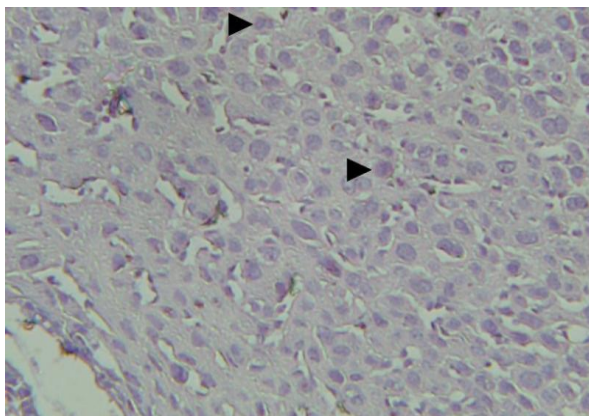
Keadaan ini juga didukung dari penyebaran LIF pada kelompok perlakuan yang lebih banyak terdapat pada endometrium khususnya daerah desidua dibandingkan dengan kontrol yakni masing-masing 12,83 dan 8,83 ($P < 0,05$) seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata jumlah *leukemia inhibitory factor* (LIF) antara kelompok yang diberi médium embrio supernatan (MKES) dan médium kultur embrio (MKE)

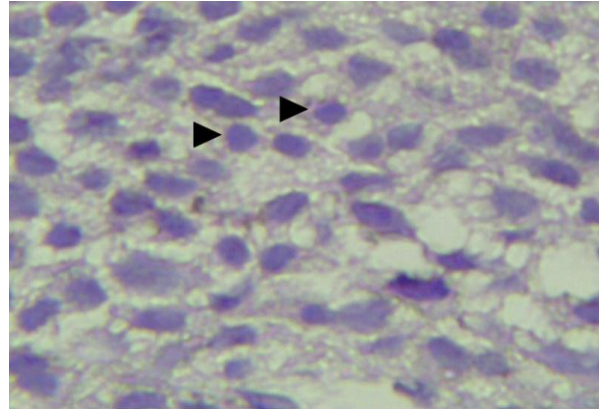
Lokasi	Kelompok	
	MKES	MKE
Desidua	12,83±2,14 ^a	8,83±1,72 ^b
Non-desidua	8,00±1,79 ^a	4,50±1,05 ^b

^{a, b}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Dilihat dari jumlah LIF atau sel positif LIF (Gambar 2 dan 3) yang terdapat pada desidua atau non-desidua per lapang pandang pada mikroskop, maka pada kelompok perlakuan ternyata lebih banyak dibanding kontrol ($P < 0,05$). *Leukemia inhibitory factor* adalah salah satu sitokin yang esensial dalam proses implantasi embrio. Hal ini dibuktikan dengan implantasi juga lebih banyak terjadi pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 2. Sel positif LIF pada area desidua mencit hari ke-6 kebuntingan (tanda panah menunjukkan LIF, LIF= *leukemia inhibitory factor*, perbesaran 100x)



Gambar 3. Sel positif LIF pada desidua pada hari ke-6 kebuntingan (tanda panah). (Inti sel berwarna ungu, LIF berwarna kecoklatan dalam sitoplasma sel, LIF= *leukemia inhibitory factor* perbesaran 400x)

Loke dan King (1995), menyatakan bahwa produksi LIF pada mencit banyak dihasilkan oleh glandula desidua bahkan sebelum implantasi, sedangkan penelitian dari Wang *et al.* (2000) pada manusia menyimpulkan bahwa ekspresi LIF pada desidua mempunyai kontribusi pada proses implantasi embrio, mempertahankan fungsi plasenta, dan pertumbuhan embrio. Pada manusia, LIF diproduksi secara aktif pada glandula desidua seperti pada mencit dan produksi ini tak tergantung adanya *feto-trophoblast* (Hambartsoumian, 1998).

Peranan LIF dalam proses implantasi adalah merespons adanya sinyal dari embrio untuk selanjutnya menginduksi molekul-molekul pada LE dan terbentuknya *pinopodes*. Di samping itu, LIF menginduksi molekul-molekul dan ekspresi stroma yang bermacam-macam termasuk ekspresi *stromal oncostatin M* (OsM) yang berperan dalam proses implantasi (Kimber, 2005).

KESIMPULAN

Pemberian media kultur embrio supernatan 2 hari sebelum transfer embrio dapat meningkatkan LIF pada endometrium sehingga meningkatkan angka implantasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aplin, J. 2007. Embryo implantation: The molecular mechanism remains elusive. *Reprod. Biomed.* 14(1):49-55.
- Bose, R. 1997. An update on the identity of early pregnancy factor and its role in early pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14(9):497-499.
- Cullinan, E.B., S.J. Abbodanzo, P.S. Anderson, J.W. Polard, B.A. Lessey, and A.C. Stewart. 1996. Leucemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggest a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implatantion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
- Fan, X.G. and Z.Q. Zheng. 1997. A study of early pregnancy factor activity in preimplantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37(5):359-364.
- Ghosh, D. and J. Sengupta. 2004. Endocrine and paracrine correlates of endometrial receptivity to blastocyst implatationi in the human. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 48(1):6-30.
- Goto, S., T. Kadowati, H. Hashimoto, S. Kokeyuchi, and M. Shiotoni. 2007. Stimulation of endometrium embryo transfer (SEET): Injection of embryo culture supernatant into the uterine cavity before blastocyst transfer can improve implantation and pregnancy rates. *Fertil. Steril.* 88(5):1339-1343.

- Hambartsoumian, L. 1998. Leukemia inhibitory factor (LIF) production by human deciduas and its relationship with pregnancy hormones. **Gynecol. Endocrinol.** 12(1):17-22.
- Jackson, P. and D. Blythe. 2008. Immunohistochemical Techniques. In **Theory and Practice of Histological Technique**. Bancroft, J.D. and M. Gamble (Eds.). 6th ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia.
- Kholkute, S.D., R.R. Katkam, T.D. Nandedkar, and C.P. Puri. 2000. Leukemia inhibitory factor in the endometrium of the common marmoset *Callithrix jacchus*: Localization, expression, and hormonal regulation. **Mol. Hum. Reprod.** 69(4):337-343.
- Kimber, S.J. 2005. Leukemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. **Reproduction** 130:131-145.
- Lash, G.E. and M. Legge. 2000. Induction of early pregnancy factor from mausemestrous ovaries and oviduct in vitro by steroid hormones. **J. Assist. Reprod. Genet.** 17(3):186-188.
- Lessey, B.D. 2002. Adhesion molecules and implantation. **J. Reprod. Immunol.** 55:101-112.
- Loke, Y.W. and A. King. 1995. Cytokines and their receptors. In **Human implantation: Cell Biology and Immunology**. 1st ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, USA.
- Makrigiannakis, A. 2007. Mechanism of implantation. **Proceeding of Sero Symposium International Foundation Conference. Italy.**
- Mikolajczyk, M., J. Skrzypezak, K. Szymanowski, and P. Wirstlein. 2003. The assessment of LIF in uterine flushing-a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. **Reprod. Biol.** 3(3):259-270.
- Mitchell, M.H., R.J. Swanson, and S. Oehninger. 2002. In vivo effect of leukemia inhibitory factor (LIF) and an anti-LIF polyclonal antibody on murine embryo and fetal development following exposure at the time of transcervical blastocyst transfer. **Biol. Reprod.** 67(2):460-464.
- Sharkey, A. 1998. Cytokines and implantation. **Rev. Reprod.** 3(1):52-61.
- Speroff, L. and M.A. Fritz. 2005. Sperm and Egg Transport, Fertilization, and Implantation. In **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 7thed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Wang, L., C. She, and C. Yu. 2000. Expression of leukemia inhibitory factor in human decidua. **Zhonghua Fu Chan KeZaZhi Apr.** 35(4):214-215.