

# İnsan Kumulus Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu

## Isolation of Human Cumulus Granulosa Cells

Murat Serkant Ünal<sup>1</sup>, Cihan Kabukçu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

### Özet

**Amaç:** Foliküller, ovaryumun temel fonksiyonel birimleridir. Overyan foliküllerin büyümesi ve gelişmesi, granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması ile karakterizedir. Oositler graaf folikül içerisinde kumulus granuloza hücreleriyle çevrili olarak bulunur. Bizim bu çalışmadaki amacımız oositin mikroçevresini oluşturan kumulus granüloza hücrelerini daha kolay ve hızlı bir şekilde izole etmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya 25-30 yaş aralığında, folikül sayısı on ve üzerinde olan ve infertilite nedeni erkek faktör olan iki kadın hasta alındı. Oosit toplama işleminden (OPU) sonra elde edilen kumulus granüloza-oosit komplekslerine birbirlerinden ayrılması için denüstasyon işlemi uygulandı. Daha sonra kumulus granüloza hücreleri Tip I kollajen ile kaplı kültür kaplarına ekilerek primer hücre kültürü oluşturuldu.

**Bulgular:** Flask kültür kaplarına ekilen kumulus granüloza hücreleri proliferasyon olarak 14. günde konflue oldular. Mikroskop altında yapılan sayımda kültür kaplarında sırasıyla  $4 \times 10^5$  ve  $5 \times 10^5$  hücrenin ürediği gözlemlendi.

**Sonuç:** Kumulus granüloza hücrelerinin geliştirilen izolasyon yöntemleri sayesinde daha kolay bir şekilde kültüre edilebilmeleri kaliteli oosit ve embriyo elde edilmesi yönündeki çalışmalara ivme kazandırabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kumulus granüloza hücreleri; ovaryum; hücre kültür teknikleri

### Abstract

**Introduction:** Follicles are the basic functional units of the ovary. It is characterized by the growth and development of ovarian follicles, proliferation and differentiation of granulosa cells. Oocytes are found in the graaf follicle surrounded by cumulus granulosa cells. Our aim in this study is to isolate the cumulus granulosa cells, which form the microenvironment of the oocyte, more easily and quickly.

**Materials and Methods:** Two female patients aged 25-30 years, with ten or more follicles and male factor infertility were included in the study. The cumulus granulosa-oocyte complexes obtained after OPU (oocyte pick-up) were denuded to separate them from each other. Then, the cumulus granulosa cells were seeded into culture dishes coated with Type I collagen and primary cell culture was established.

**Results:** Cumulus granulosa cells inoculated in flask culture dishes proliferated and became confluent on the 14th day. In the count made under the microscope, it was observed that  $4 \times 10^5$  and  $5 \times 10^5$  cells were grown in the culture dishes, respectively.

**Conclusion:** The ability to culture cumulus granulosa cells more easily thanks to the isolation methods developed can accelerate the studies on obtaining quality oocytes and embryos.

**Key Words:** Cumulus granulosa cells; ovary; cell culture techniques

### Giriş

Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik bazı alanlarda ise yassı epitel ile döşelidir. Yüzey epiteli ile korteksin arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea bulunmaktadır. Ovaryum folikülleri korteksin stromasında yerleşmiştir. Bu stroma bölgesi iğ biçiminde fibroblastlar içerir (1). Gelişim evresine göre primordial folikül, büyümekte olan (primer-sekonder) folikül ve graaf folikül olmak üzere üç tip folikül tanımlanır. Primordial folikül aşamasında yassı epitel olan granüloza hücreleri daha sonraki evrelerde kübik epitele dönüşür (2). Primordial foliküller metabolik olarak inaktif fazdadırlar. Ovaryumun her gelişim evresinde foliküller bulunur, fakat tüm sikluslar içinde primordial foliküller baskındır.

Graaf foliküller en büyük çapa sahip olgunlaşmış foliküllerdir. Ovulasyon öncesi oositler, graaf folikül içerisinde etrafı kumulus granuloza hücreleriyle çevrili olarak bulunur. Kumulus granüloza oosit kompleksi (KOK) olarak adlandırılan bu yapıda, kumulus hücreleri ile oosit arasında hem moleküler hem de hücre-hücre ilişki söz konusudur. Ovulasyonla birlikte fertilizasyon yeteneğine ulaşmış oosit ve onun çevresinde bulunan kumulus hücreleri overlerden atılmaktadır (3). Kumulus granüloza hücreleri oositin hücre membranı ile temas halindedir ve zona pellusida boyunca uzanırlar. Bu hücreler yalnızca oosite fiziki olarak desteklemekle kalmayıp aynı zamanda oositin mikroçevresini oluşturarak büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde önemli roller oynamaktadırlar. Kumulus granüloza hücreleri

\*Sorumlu Yazar: Murat Serkant Ünal Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası Kat:1 Pamukkale / Denizli E- mail: serkantunal72@gmail.com Orcid: Murat Serkant Ünal 0000-0003-1992-7909,

Cihan Kabukçu 0000-0003-3331-5714

Geliş Tarihi:13.07.2021, Kabul Tarihi:12.11.2021

hem endokrin hem de parakrin özellik göstermektedirler. Oositten uzanan mikrovilluslar ve granuloza hücrelerinden çıkan uzantılar oositi çevreleyen zona pellusidaya uzanmaktadırlar (1,3). Mural granuloza hücreleri ise bütün folikül duvarı boyunca uzanmaktadır ve steroidojenik aktiviteye sahiptir. Granuloza hücreleri arasında yaygın gap junction tipi bağlantılara rastlanır. Bu bağlantılar sayesinde granuloza hücreleri kendileri aralarında ve oositle sıkı bir ilişki içindedirler. Gap junction tipi bağlantıların temel birimleri konneksionlardır. Ovulasyondan sonra mural granuloza hücreleri progesteron salgılayarak muhtemel bir gebelik için destek sağlarlar. Granuloza hücreleri ayrıca oositin gelişimi için gerekli olan estradiol, progesteron ve inhibin-b gibi birçok hormonu salgırlarlar (2,4). Pre-antral folikül evresinde granuloza hücreleri tarafından FSH reseptörü (FSHR) eksprese edilmektedir. Fakat FSH'un granuloza hücreleri üzerindeki esas etkinliği antral dönemde meydana gelmektedir. *Anti-Mullerian Hormon* (AMH), primer folikül evresinin hemen başında granuloza hücreleri tarafından salgılanan, bir glikoproteindir. AMH parakrin etki göstererek diğer folliküllerin gelişimini inhibe eder ve dominant folikülün belirlenmesinde önemli rol oynar. FSH'ya bağlı seçim süreci başladığında bu hormonun granuloza hücreleri tarafından salgılanması azalmaktadır (5,6). LH tarafından kontrol edilen kumulus-oosit kompleksinin olgunlaşması, granuloza hücrelerinde mitojen aktive edici protein kinazın (mitogen-activated protein kinase-MAP Kinase) uyarıcı etkisiyle olmaktadır (7). Son yıllarda birçok araştırmaya konu olan granuloza hücrelerini izole etmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bizim bu çalışmadaki amacımız oositin olgunlaşması ve beslenmesinde büyük bir öneme sahip olan kumulus granuloza hücrelerini yüksek bir verimle izole etmektir.

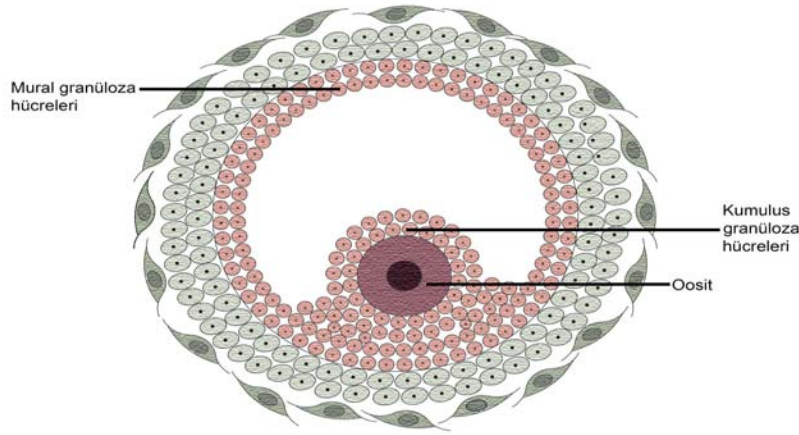
### Gereç ve Yöntem

Çalışmamız Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 09.06.2021 tarihli E.60560 sayılı kararı ile onaylandı. Çalışmamıza 25-30 yaş aralığında, folikül sayısı on ve üzerinde olan; infertilite nedeni erkek faktör olan iki kadın hasta yazılı onamları alınarak dahil edildi. Hastaların FSH, LH, AMH ve E2 hormonlarının kan seviyeleri normal aralıktaydı. Ek bir sistemik rahatsızlıkları yoktu ve ultrasonografi ile yapılan görüntüleme overlere ait primer bir patolojileri saptanmadı.

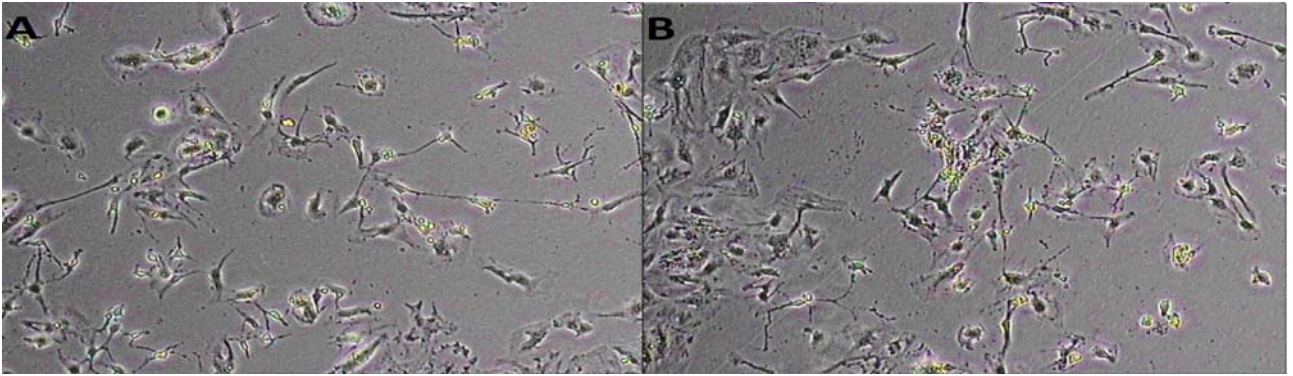
**Ovaryan stimülasyon ve oosit toplanması:** Hastalarda standard GnRH antagonist protokolü

ile kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) yapıldı. Hastaların menstruasyonunun 2. gününde transvaginal ultrasonografi ile muayenesi yapılarak, bazal FSH, LH, E2 seviyeleri ölçüldükten sonra, gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonuna başlandı. Folikül boyutu 14 mm'ye ulaştığında GnRH antagonisti başlandı. Hastaların folikül gelişim takibi transvaginal USG ile yapıldı. Takipte 18 mm'ye ulaşan en az iki adet folikül oluştuğunda oosit maturasyonu için rekombinant hCG yapılıp takip eden 36. saatte oosit toplama işlemi (OPU) yapıldı. OPU işlemi sedasyon anestezisi altında çift lümen OPU iğnesi ile yapıldı.

**Kumulus granuloza hücrelerinin izolasyonu ve kültüre edilmesi:** Toplanan kumulus granuloza oosit kompleksleri medyumun içerisinde 37°C'de %7 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %85 N<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2-3 saat bekletildi. İnkübatöre kaldırılmadan önce folikül sıvısı, epitel ve kan gibi materyallerden arındırılması için bulunduğu medyumda (GTL, Vitrolife, Sweden) ardışık yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Kumulus granuloza oosit kompleksleri 80 IU/ml hyaluronidaz enzimi ile (Hyase-10X, Vitrolife, Sweden) 30 saniye muamele edildi ve oositlere denudasyon işlemi uygulanarak inkübatöre kaldırıldı. Kumulus granuloza hücreleri enzimden etkilenmemeleri için hızlıca 10 ml Earle's Balanced Salts Solution (EEBS) (Sigma-Aldrich, Germany) ile dilue edilerek yıkandı. Daha sonra falcon tüpte 1500 RPM devirde 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstünde kalan süpernatant uzaklaştırılarak pellete 1ml komplet besiyeri eklendi. Pellet pipetaj ile homojenize hale getirildikten sonra Tip I kollajen ile kaplı 25 cm<sup>2</sup> flaklara ekilerek primer hücre kültürü meydana getirildi. Bu aşamada kumulus granuloza hücreleri filtre edilmedi ve eritrositlerin uzaklaştırılması için herhangi bir solüsyon kullanılmadı. Adherent kumulus granuloza hücreleri çoğalıp konflue olduktan (%70-80) sonra bu hücreler tripsin enzimi 0.25% (Hyclone, USA) ile kaldırıldı ve içinde komplet besiyeri olan yeni kültür kaplarına ekimleri yapıldı. Komplet besiyeri Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 (Capricorn Scientific, Germany), Fetal Bovine Serum FBS (Capricorn Scientific, Germany), Penisilin-Streptomisin (Pan Biotech, Germany) içermektedir. Kültür kaplarının iki günde bir medyumları değiştirildi ve optimal kültür şartları oluşturuldu. Çoğalan hücreler canlılıklarının değerlendirilmesi için tripan blue ile boyandı ve hücre sayıları Neubauer Improved sayım kamarasıyla tespit edildi. Tüm bu aşamalar invert



**Şekil 1.** Graaf folikülde bulunan kumulus granuloza-oosit kompleksi



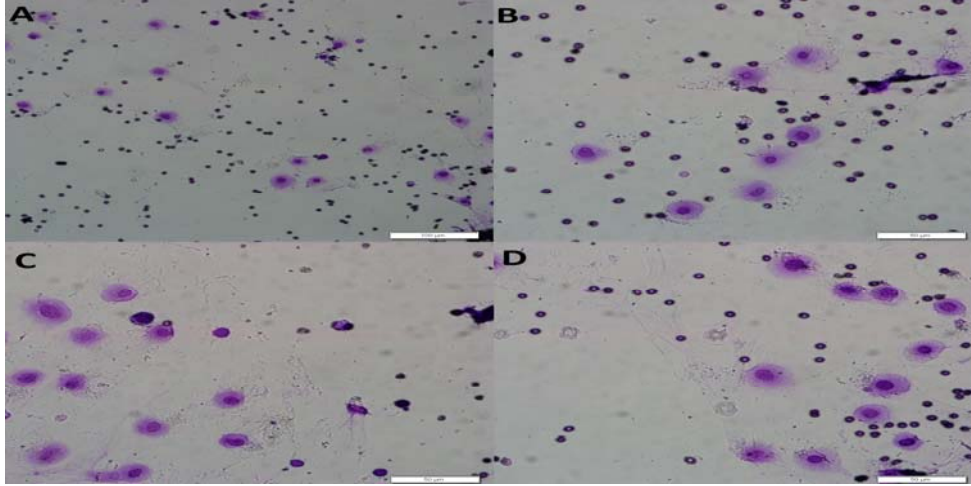
**Şekil 2.** Kültüre edilen kumulus granuloza hücrelerinin (A-B) faz kontrast mikroskopisi altındaki (x10) morfolojik görünümleri

mikroskop (CKX41 Olympus, Japan) kullanılarak gözlemlendi. Devam eden pasajlarda çoğalan hücreler araştırmalarda kullanılmak üzere kriyoprezervasyon işlemi yapılarak kriyo tüpler içinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuya kaldırıldı. Dondurma vasatı olarak Dimetilsülfoksit (DMSO) ve DMEM/F12 karışımı kullanıldı. Hücrelerin morfolojik özelliklerini göstermek için lamaların üzerine direk olarak yaymaları yapıldı. Kumulus granuloza hücrelerinin bir başka kısmı ise chamber slide içinde kültüre edildi. Her iki örnekte kurutulduktan sonra Diff Quick boyası ile boyandı.

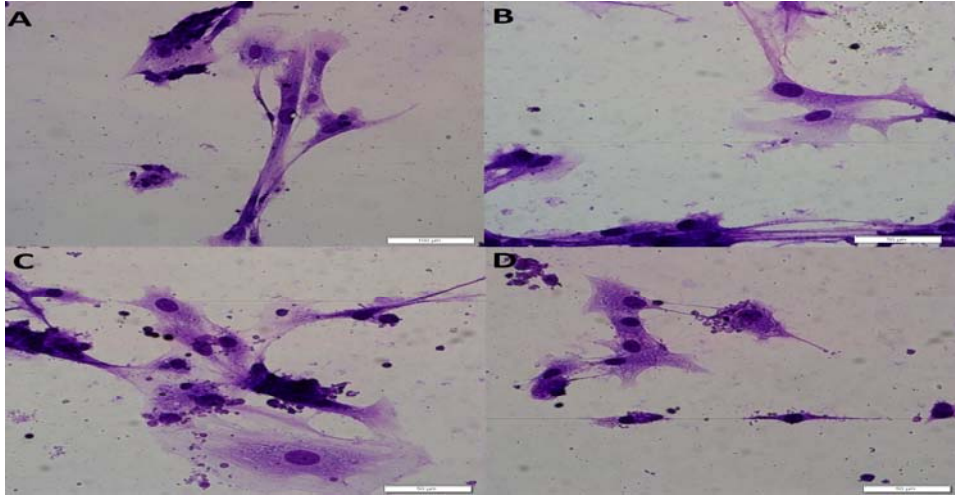
### Bulgular

Graaf folikülde bulunan kumulus granuloza oosit kompleksi (KOK) şekil-1'de resmedildi. Santrifüj sonrası yapılan sayımda yeterli sayıda hücre ( $8 \times 10^5$  ve  $9 \times 10^5$ ) olduğu gözlemlendi. Tip I kollajen ile kaplı flaklara ekilen kumulus hücrelerinin %40-45'nin kültür kaplarına yapıştığı görüldü. Adherent

hücreler proliferatif olarak 14 gün sonra kültür kaplarının yüzeyini kapladılar (şekil-2). Hücreler canlılıklarının değerlendirilmesi için tripan blue ile boyandı ve hücre sayıları Neubauer Improved sayım kamarasıyla tespit edildi. Tüm bu aşamalar invert mikroskop (CKX41 Olympus, Japan) kullanılarak gözlemlendi. Kumulus granuloza hücrelerinin kültüre edilmeden önce Dif Quick boyasıyla boyanması ve bu hücrelerin ışık mikroskopisi altındaki (x20 ve x40) görünümleri şekil-3'de verilmiştir. Kültür kaplarındaki hücreler konflue (%70-80) olduğu zaman yapılan sayımda sırasıyla  $4 \times 10^5$  ve  $5 \times 10^5$  hücrenin ürettiği gözlemlendi. Daha sonra kumulus granuloza hücreleri ikinci pasaja (P2) kadar çoğaltıldı ve çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Kumulus granuloza hücrelerinin kültüre edilmesi sonrasında Dif Quick boyasıyla boyanması ve bu hücrelerin ışık mikroskopisi altındaki (x20 ve x40) görünümleri şekil-4'de verilmiştir. Kullandığımız



**Şekil 3.** Kumulus granuloza hücrelerinin (A-B-C-D) kültüre edilmeden önce Dif Quick boyasıyla boyanması ve bu hücrelerin ışık mikroskobisi altındaki (x20 ve x40) görünüşleri



**Şekil 4.** Kumulus granuloza hücrelerinin (A-B-C-D) kültüre edilmesi sonrasında Dif Quick boyasıyla boyanması ve bu hücrelerin ışık mikroskobisi altındaki (x20 ve x40) görünüşleri

teknik modifiye eksplant yöntemidir. Çeşitli laboratuvarlarda atık materyal olarak değerlendirilen kumulus granuloza hücrelerini izole etmek için için farklı enzimler (kollajenaz gibi) kullanılmamıştır. Bu hücrelerin izolasyonunun IVF sürecini etkilemeyecek olması, ekonomik olması ve daha yüksek saflıkta elde edilmesi yöntemimizin avantajlarını göstermektedir.

### Tartışma

Granuloza hücreleri ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle folikül sıvıları toplanarak yapılmaktadır. Folikül sıvısında bulunan mural granuloza ve kumulus granuloza hücrelerin yanısıra lökosit, eritrosit, endotel, epitel gibi hücrelerin hepsi

birlikte heterojen bir yapı oluşturmaktadır. Granuloza hücrelerinin elde edilmesi sürecinde ideal bir izolasyon yöntemi (gold standard method) yoktur. Toplanan foliküler sıvılarda granuloza hücreleri değişik teknikler uygulanarak (flask tekniği, hücre süzgeci, hücre agregat, FACS ve MACS gibi) farklı oranlarda saflık ve canlılıkla izole edilmektedir (8-10). Ayrıca birçok çalışmada dansiyete-gradyent ayırıştırma metodlarını içeren percoll ve ficoll solüsyonları kullanılmaktadır. Her tekniğin avantajları ve dezavantajları vardır. Bu tekniklerle hem mural granuloza hücreleri hem de kumulus granuloza hücreleri elde edilmektedir (11-16). Bazı çalışmalarda ise kumulus-oosit kompleksleri mekanik olarak iğnelerle kesilerek kumulus granuloza hücreleri izole edilmektedir

(17-19). Granüloza hücreleriyle ilgili olarak birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmış ve granüloza hücreleri markerları olarak FOX12, AMH, FSHR ve CYP19A1'in kullanılabileceği bildirilmiştir (20). Kaliteli oosit ve embriyo seçiminde kumulus granüloza hücrelerinin genomik profili de potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir (21). Polikistik over sendromunda (PCOS) granüloza hücrelerinin salgıladığı AMH, normal overyan morfolojiye sahip hastaların AMH sekresyonundan daha fazladır. Bu durumun da PCOS hastalarının folikül gelişimlerinde yetmezliğe neden olabileceği bildirilmiştir (22). Polikistik over sendromu olan hastalarda yapılan başka bir çalışmada ise granüloza hücrelerinde önemli oranda apoptozis oranlarının düştüğü görülmüştür. Elde edilen bulguların bu hastalığın tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (11). Matur oositlerin kumulus granüloza hücrelerinde estradiol (E2) üretimini inhibe ederek steroidogenezi etkilediği ve immatür oositlerin ise antiluteal etkiye sahip olduğunu görülmüştür (13). İn vitro çalışmalarda FSH'nin IGF-1R yokluğunda granüloza hücrelerinin proliferasyonunu uyaramadığı gösterilmiştir. IGF-1R geni eksik olan knockdown farelerde ovaryumların küçük olduğu, antral foliküllerinin gelişemediği ve serum estradiol seviyesinin %90 oranında azaldığı görülmüştür. IGF-1R'nin granüloza hücrelerinde steroidogenezi sağladığı, foliküllerin sağ kalımına neden olduğu ve fertilizasyon için gerekli olduğu bildirilmiştir (23). Granüloza hücrelerindeki apoptozisin gebelik ve canlı doğum oranlarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Düşük over rezervi olan kadınların mural granüloza hücrelerinde apoptozisin önemli oranda artmış olduğu görülmüştür. Düşük over rezervi olan hastaların kumulus granüloza hücrelerinde ise normal rezervi olan hastalara göre apoptozisinde belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı mural granüloza hücrelerinin, kumulus granüloza hücrelerine göre apoptozise daha duyarlı olduğu ileri sürülmüştür (24). ICSI işleminde kumulus granüloza hücreleri ve oosit arasında daha fazla temasa izin vermek için geç denüstasyonla ilgili yapılan çalışmalarda; oositlerin en az 2,5 saat boyunca inkübe edilmesinin konvansiyonel IVF ve ICSI'de oosit maturasyon oranlarını artırdığını gösteren çalışmalarla birlikte, ICSI'de en az 2 saatlik inkübasyonun metafaz II oosit oranlarını, fertilizasyon ve implantasyon oranlarını artırdığını gösteren çalışmalar vardır (25).

## Sonuç

Kumulus granüloza hücreleri embriyo kalitesini ve IVF sonrası gebelik sonuçları tahmin etmek için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Yardımlı üreme tekniğiyle yapılan tedavilerde başarı sağlıklı gelişen embriyolara bağlıdır. Embriyoyu meydana getirecek olan oositin kalitesi kadar, oositin nişini oluşturan granüloza hücrelerinin de sağlıklı ve fonksiyonel olmaları önemlidir. Araştırmacıların bu hücreleri daha kolay bir şekilde kültüre edebilmeleri daha kaliteli oosit ve embriyo elde edilmesi yönündeki çalışmalara ivme kazandırabilir. Ayrıca polikistik over sendromu ve endometriozis gibi hastalıklarda granüloza hücrelerinin fonksiyonlarındaki değişimler incelenerek bu hastalıklarda da yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal beyan:** Herhangi bir finansal destek sağlanmamıştır.

**Yazar katkıları:** Makalenin ana fikrinin belirlenmesi, literatür taranması, makalenin yazımı ve materyallerin seçimi Murat Serkant Ünal ve Cihan Kabukçu tarafından yapıldı.

**Etik onam:** Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 09.06.2021 tarihli E.60560 sayılı kararı ile onaylandı.

## Kaynaklar

1. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th ed. Philadelphia, United States: Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
2. Tomaszczuk KK, Geyter CD. Cells with Stem Cell Characteristics in Somatic Compartments of the Ovary. *BioMed Res Int* 2013;2013:310859:1-8.
3. Russel D. L, Robker R. L. Molecular Mechanism of Ovulation: Co-ordination Through The Cumulus Complex. *Human Reproduction Update* 2007;13(3):289-312.
4. Alam H, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol* 2020;19:13-23.
5. Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E et al. The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to

- both FSH and LH. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:95-100.
6. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses *Endocr Rev* 1996;17(2):121-55.
  7. Gedikli S, Özbek E, Demirci T. Fertilizasyonun moleküler temeli *Van Med J.* 2013; 20(4): 294-301.
  8. Ferrero H, Francisco, Rosas FD, Pascual CMG, Monterde M, Zimmermann RC. et al. Efficiency and purity provided by the existing methods for the isolation of luteinized granulosa cells: a comparative study *Human Reproduction.* 2012;27(6):1781-1789.
  9. Quinn MCJ, McGregor SB, Stanton JL, Hessian PA, Gillett WR, Green DPL. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. *Reprod Fertil Dev* 2006;18:501-508.
  10. Chilvers RA, Bodenbun YH, Denner LA, Urban RJ. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:547-556.
  11. Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Sarıdoğan E, İkram M, Ghali L. et al. Granulosa cell survival and proliferation are altered in Polycystic Ovary Syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(3):881-887.
  12. Raad G, Bazzi M, Tanios J, Mourad Y, Azouri J, Azouri, J. et al. Optimization of The Cell Aggregates Method for Isolation and Purification of Human Granulosa Cells from Follicular Fluid. *International Journal of Fertility and Sterility* 2020;13(4):339-345.
  13. Lucidi P, Bernabo N, Turriani M, Barboni B, Mattioli M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte Maturation *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003;1:45.
  14. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L. et al. Vitamin D Regulates Steroidogenesis and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 (IGFBP-1) Production in Human Ovarian Cells. *Horm Metab Res* 2010;42(10):754-757.
  15. Beckmann MW, Polacek D, Seung L, Schreiber JR. Human ovarian granulosa cell culture: determination of blood cell contamination and evaluation of possible culture purification steps. *Fertil Steril* 1991;56(5):881-887.
  16. Aghadavod E, Zarghami N, Farzadi L, Zare M, Barzegari A, Movassaghpour AA. et al. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Adv Biomed Res* 2015;4:250.
  17. Enien WM, Chantler E, Seif MW, Elstein M. Human ovarian granulosa cells and follicular fluid indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1998;13(5):1303-1306.
  18. Merhi Z, Doswel A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D Alters Genes Involved in Follicular Development and Steroidogenesis in Human Cumulus Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014;99(6):1137-1145.
  19. Assou S, Pourret E, Pequignot M, Rigau V, Kalatzis V, Ahmed QA et al. Cultured Cells from the Human Oocyte Cumulus Niche Are Efficient Feeders to Propagate Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2015;24(19):2317-2327.
  20. Bharti D, Jang SJ, Lee SY, Lee SL, Rho GJ. In Vitro Generation of Oocyte Like Cells and Their In Vivo Efficacy: How Far We have been Succeeded. *Cells* 2020;9(3):1-28.
  21. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:531-538.
  22. Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S. et al. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(1):240-245.
  23. Baumgarten SC, Armouti M, Ko C, Stocco C. IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice. *Endocrinology* 2017;158(7):2309-2318.
  24. Fan Y, Chang Y, Wei L, Chen J, Li J, Goldsmith S. et al. Apoptosis of mural granulosa cells is increased in women with diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(6):1225-1235.
  25. Türkkani A. Her yönüyle in vitro fertilizasyon. İçinde: Üstün Y, editör. Oosit maturasyonu ve morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. 1. Baskı. Ankara: Deren Yayıncılık;2019.s.93-106.