



1993

**T.C. BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI  
HASTALARININ ENDOMETRİUMUNDA GRANULOSİT KOLONİ  
STİMÜLASYON FAKTÖR RESEPTÖRÜ VE SERVİKO-VAJİNAL  
LAVAJINDA GRANULOSİT KOLONİ STİMÜLASYON FAKTÖR  
DÜZEYİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Esra ÜNAL**

**ANKARA**

**2015**





1993

**T.C. BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI HASTALARININ  
ENDOMETRİUMUNDA GRANULOSİT KOLONİ STİMÜLASYON FAKTÖR  
RESEPTÖRÜ VE SERVİKO-VAJİNAL LAVAJINDA GRANULOSİT KOLONİ  
STİMÜLASYON FAKTÖR DÜZEYİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Esra ÜNAL**

**TEZ DANIŐMANI**

**Prof. Dr. Hulusi Bülent ZEYNELOĞLU**

**ANKARA**

**2015**

Bu tez Başkent Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: KA15/138

## TEŞEKKÜR

Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık tezimi sunarken, eğitimimde önemli yeri olan, tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, yenilikçi düşünceleriyle bana ışık tutan,

tez danışmanım *Prof. Dr. Hulusi Bülent Zeyneloğlu'na,*

Uzmanlık eğitimim boyunca her günümü dolu dolu bilgi, sevgi, saygı, hoşgörü, istek ve enerji ile geçirmemi sağlayan, bilgisi, tecrübesi ve en önemlisi sevgisi ile bir hekim

olmanın ne demek olduğunu öğrendiğim *Prof. Dr. Ali Ayhan'a,*

Sevgisinin sıcaklığını bildiğim ve deneyimlerinden yararlandığım bölüm başkanımız *Prof.*

*Dr. Esra Kuşcu'ya,*

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde emekleri olan *Prof. Dr. Filiz Yanık'a,* iyilik dolu

kalbiyle *Doç. Dr. Göğşen Önalın'a,* *Doç. Dr. Polat Dursun'a,* *Yrd. Doç. Dr. Çağrı*

*Gülümser'e,* *Uzm. Dr. Nihal Şahin Uysal'a,* *Uzm. Dr. Hanifi Şahin'e,*

Tez sürecinde benden yardımlarını esirgemeyen *Doç. Dr. A. Nihan Haberal'a,* Biyokimya

Ana Bilim Dalı'ndan *Doç. Dr. Nilüfer Bayraktar'a,*

Hastanemiz İnfertilite Ünitesinin tüm çalışanlarına,

Beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma,

Bölümde çalışan tüm mesai arkadaşlarıma,

Hayatımın her devresinde olduğu gibi, uzman olma yolunda ilerlediğim bu süreçte de her

zaman yanımda olan sevgili aileme ve arkadaşlarıma

en içten teşekkürlerimi sunarım.

***Dr. Esra Ünal***

## ÖZET

İmplantasyon, endometrium ile embriyo arasında büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve prostoglandinler ile oluşan karmaşık bir diyalog çerçevesinde; embriyonun desiduaaya yapışması, bazal membrana doğru inmesi ve stromaya invaze olmasıdır. Günümüz Yardımlı Üreme Teknikleri (YÜT)'ndeki en yüz güldürücü araç olan İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) uygulamalarında %80'lik fertilizasyon oranlarına ulaşılabilmesine rağmen, ortalama canlı doğum oranı %45'i geçememektedir. Bu noktada implantasyon başarısızlıkları ve endometrial reseptivite, YÜT'nin en önemli hız kısıtlayıcı basamaklarından birini oluşturmaktadır.

Granulosit-Koloni Stimulan Faktör (G-CSF) implantasyon penceresine uygun dönemde fetomaternal alandan, plasentadan, desiduanadan ve serviko-vajinal sıvılardan eksprese olmaktadır ve endometrial reseptiviteyi belirlemede önemli bir belirteçdir. Bizim bu çalışmadaki amacımız öncelikle Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan, ICSI planlanan hastaların embriyo transfer (ET) günü serviko-vajinal lavaj örneklerinden G-CSF düzeyleri ve bu hastaların endometrial biyopsi örneklerinden G-CSF reseptör bakılması ile elde edilecek gebelik oranları ilişkisinin gösterilmesidir.

Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Ankara Tüp Bebek Merkezlerimize başvuran, son 12 ay içinde ICSI yapılmasını planladığımız hastalarımızdan 19'u dahil edilmiş olup, 18-42 yaş aralığında, donma-çözme siklusu olan veya zorunlu tek embriyo transferi yapılan hastalar ise çalışmaya dahil edilmemiştir. Örnekler embriyo transfer gününde serviko-vajinal lavaj sıvılarından minimal invazif bir yaklaşımla alınmıştır. Serviko-vajinal lavaj örneklerinde Biyokimya laboratuvarımızda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile G-CSF düzeylerine bakılmıştır. Endometrium biyopsi örneklerinde G-CSF reseptörü incelenmiştir. G-CSF ve G-CSF reseptörü düzeyleri ile elde edilecek gebelik oranları ilişkisi istatistiksel olarak incelenerek klinik retrospektif bir araştırma yapılmıştır.

Embriyo transfer günü serviko-vajinal lavajdan bakılan G-CSF düzeyleri, USG'de gestasyonel kese ve fetal kalp atımı olanlar ile olmayanlar arasında,  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Endometrial örneklerdeki G-CSF reseptörünün boyamasında glandüler alanlarda tutulum olmadı.  $\beta$ -hCG pozitif olan 2 hastada,  $\beta$ -hCG negatif olan 1 hastada stromal alanlarda yaygınlığı az hücrede (%1) ve G-CSF reseptörünün boya yoğunluğu orta derecede saptandı.

Serviko-vajinal lavajda saptanılan G-CSF miktarını, klinik gebelik oranı açısından değerlendirebilmek için daha fazla hasta incelenmelidir.

G-CSF ile ilgili çalışmaların sayısı arttıkça, G-CSF'nin fertilizasyon ve implantasyondaki önemi daha iyi anlaşılacaktır. Böylelikle hem infertil çiftler için yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecek hem de fertil çiftler için yeni kontrasepsiyon teknikleri sağlanabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** G-CSF (Granulosit koloni Stimulan Faktör, CSF-3), G-CSF-R (Granulosit koloni Stimulan Faktör Reseptörü, CSF-3R, CD114), Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı, Endometrial Reseptivite

## ABSTRACT

### **Prognostic value of Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor at Endometrium and Granulocyte Colony Stimulating Factor levels in Cervicovaginal Flushing with Repeated Implantation Failure Patients**

Implantation is adhesion of embryo to decidua, burrowing through basal membrane and invasion into the stroma as part of a complex dialogue involving growth factors, hormones, adhesion molecules, extracellular matrix and prostoglandines between the endometrium and the embryo. Nowadays, the most succesfull method between assisted reproductive techniques is intra-cytoplasmic sperm enjection (ICSI). With this instrument despite the %80 fertilisation rate is achievable, average live birth rate isn't more then %45. At this point, implantation failure and the endometrial receptivity are the rate limiting steps of Assisted Reproductive Techniques.

G-CSF is an outstanding factor which is determining the endometrial receptivity, produced at the implantation period from fetomaternal place, placenta, decidua and cervico-vaginal secretions. Our goal with this study is to show the relationship between the pregnancy rate and G-CSF level at the cervico-vaginal lavage sample at the day of implantation, also G-CSF-R expression which is gained from endometrial biopsy at the patients who is suffering from recurrent implantation failure and scheduled for ICSI.

We transcluded 19 patient to our study who is reffered to our University of Başkent, department of Gynecology and Oncology IVF clinic for ICSI at last 12 month. But we excluded the patients from the study whose age between 18-42 years, patients for thaw cycles or underwent mandatory single embriyo transfers. The samples were collected in the embriyo transfer (ET) day, with a minimal invasive procedure, from the servico-vaginal flushings and assesed in the biochemistry laboratory for G-CSF levels by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method. G-CSF receptors are examined at the endometrial biopsy samples. A clinical retrospective research has done by the statistical investigation of relationship between the G-CSF ligand, G-CSF receptor levels and the pregnancy rate.

There is no significant difference for  $p < 0,05$  confidence interval between G-CSF level, which is assessed from cervico-vaginal flushings at the day of embryo transfer, and patients, who has or hasn't gestasional sacs and fetal heart beat at the ultrasonography.

There is no livery painting of the G-CSF receptors at the glandular areas of the endometrial biopsy samples. At 2 patients with  $\beta$ -hCG positive and 1 patient who is  $\beta$ -hCG negative, G-CSF receptor painting intensity was middle level at low diffusiveness cells which are in the stromal areas.

To evaluate the clinical pregnancy rate with the G-CSF level, which is measured at the cervico-vaginal flushings, it is necessary to examine more patients.

The importance of G-CSF for the fertilisation and the implantation will be understand better while the researches about it increase. Thus both will be possible to develop new treatment methods for the infertile couples and the new contraception techniques will appear for fertile couples.

**Keywords:** G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor, CSF-3), G-CSF-R (Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor, CSF-3R, CD114), Recurrent Implantation Failure, Endometrial Receptivity

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.1.1. Kadın İnfertilitesi	4
2.1.2. Kadın İnfertilitesi Nedenleri	6
2.2. İmplantasyon ve Endometrial Reseptivite	16
2.2.1. Preovulatar Dönem ve İmplantasyona Hazırlık	16
2.2.2. İmplantasyon	23
2.2.3. Endometrial Reseptivite Penceresi Ve Reseptivite (İmplantasyon) Belirteçleri	26
2.3. Yardımlı Üreme Tekniklerinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı	32
2.4. Granulosit Koloni Stimülasyon Faktörü (G-Csf) Ve Reseptörü	39
3. MATERYAL ve METOD	43
3.1. Hasta Seçimi	43
3.2. Uygulanan IVF Prosedürü	43
3.3. Serviko-Vajinal Lavaj Örneği Alınması	45
3.4. Endometriyal Biyopsi Örneği Alınması	46
3.5. Biyokimyasal Analiz	46
3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	46
3.7. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	57

## KISALTMALAR

AC	: Amniotik Kavite
ACOG	: Amerikan Obstetrisyenler ve Jinekologlar Derneği
AFC	: Antral Folikül Sayımı
AH	: Asisted Hatching
AMH	: Anti Müllarian Hormon
AOR	: Azalmış Over Rezervi
APO	: Apolipoprotein
ART	: YÜT (Yardımlı Üreme Teknikleri)
ASRM	: Amerikan Üreme Sağlığı Derneği
AUC	: ROC Eğrisi Altında Kalan Alan
BC	: Blastokist Kavitesi
BV	: Kan Damarı
BVS	: Bazal Vücut Sıcaklığı
CC	: Klomifen Sitrat
CCCT	: Klomifen Sitrat Challenge Test
CD	: Kompleman
CFTR geni	: Kistik Fibrozis Transmembran iletim Regülatör geni
CGH	: Komperatif Genomik Hibridizasyon
CLDN	: Klaudin
COMP	: Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteinini
CP	: Serüloplazmin
CRABP	: Hücresel Retinoik Asid Bağlayıcı Protein
CRH	: Kortikotropin Serbestleştirici Hornon
CRHR1	: CRH Reseptör tip-1
CSF	: Koloni Stimulan Faktör
CSRP	: Sistein ve Glisinden Zengin Protein
C4BPA	: Komplamen Komponent-4 Bağlayıcı Protein
DAB	: Diaminobenzidin
DAF	: Kompleman bozucu faktör
DC	: Desidual Hücre
DES	: Dietilstilbestrol
DKK	: Dickkopf homoloğu



DNA	: Deoksiribonükleik Asid
DS	: Desidualize Stroma
DYNLT	: Dynein hafif zincirli Tctex-tipi
D <sub>3</sub>	: Erken Folliküler Faz, adetın 3.günü
ED	: Embriyonik Disk
EFORT	: Eksojen FSH Overyan Rezerv Testi
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EFN	: Ephrin
EPF	: Erken Gebelik Faktörü
ESM	: Ekstraselüler Matrix
ET	: Embriyo Transferi
EVT	: İnvazif Ekstravillöz Trofoblast
E <sub>2</sub>	: Estradiol
FasL	: Proapoptotik Fas Ligandı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	: Folliküler Stimülan Hormon
GADD45A	: Büyüme Durması ve DNA-hasar-indükleyicisi- $\alpha$
GAG	: Glikozaminoglikan
GAST	: Gastrin
GBP	: Guanilat Bağlayıcı Protein
G-CSF	: Granulosit Koloni Stimülan Faktörü, CSF-3 (Koloni Stimülan Faktör-3)
G-CSF-R	: Granulosit Koloni Stimülan Faktörü Reseptörü
GGTL	: Gamma-glutamilttransferaz-benzeri protein
GIFT	: Gamet İnter-fallopian Transfer
GLUT	: membran Glukoz Taşıyıcıları
GM-CSF	: Granulosit-Makrofaj Koloni Stimülan Faktörü, CSF-2 (Koloni Stimülan Faktör-2)
GNLY	: Granülizin
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
Gp	: Glikoprotein
GZMA	: Granzim-A
HBEGF	: Heparin bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin

HER	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HIV	: Human Immun-deficiency Virus
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HMG	: Human Menapozal Gonadotropin
HRP	: Horseradish Peroksidaz
HSG	: Histerosalpingografi
ICAM	: İnterselüler Adezyon Molekülleri
ICSI	: Intra-sitoplazmik Sperm İnjesiyonu
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IL	: İnterlökin
İnf	: İnterferon
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
IVM	: İn Vitro Matürasyon
KDa	: Kilodalton
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
KIR	: Katil Hücre İmmunoglobulin benzeri Reseptör
KOH	: Kontrollü Ovaryen Hiperstimülasyon
Konj	.: Konjenital
LAM	: Laminin
LH	: Luteinizan Hormon
LIF	: Lökemi İnhibitör Faktör
LOD	: Laparoskopik Ovaryen Drilling
M-CSF	: Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör, CSF-1 (Koloni Stimulan Faktör-1)
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MSX	: Msh homeobox
NK	: Naturel Killer Hücreleri
OLFM	: Olfaktomedin
ORT	: Over Rezerv Testleri
P	: Progesteron
PAF	: Platelet Aktive edici Faktör
PAI	: Plasminojen Aktivatörü İnhibitörü
PBS	: Fosfat Buffer Salin

PKOS	: Polikistik Over Sendromu
PDGF	: Platelet-kaynaklı Büyüme Faktörü
PG	: Prostaglandin
PGD	: Preimplantasyon Genetik Tanı
PID	: Pelvik İnflamatuvar Hastalık
PLA2G2A	: Fosfolipaz A2 grup IIA
RNA	: Ribonükleik Asid
RIF	: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
ROC	: Receiver Operative Characteristic
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1
PRL	: Prolaktin
Send	.: Sendrom
SFRP	: Salgılanmış Kıvrılma-ilişkili Protein
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SPP	: Salgılanmış Fosfoprotein
S100P	: S100 kalsiyum bağlayıcı Protein
TCN	: Transkobalamin
TGF	: Transforme-edici Büyüme Faktörü
Th-2	: T helper 2
TIMP	: Metalloproteinaz doku inhibitörü
TMB	: 3,3' 5,5' Tetrametilbenzidin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TSH	: Tiroid Stimulan Faktor
TV-USG	: Transvajinal Ultrasonografi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XCL	: Kemokin (C motif) ligand
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
VKI	: Vücut-Kütle İndeksi
YÜT	: Yardımlı Üreme Teknikleri
ZIFT	: Zigot İntra-fallopian Transfer
ZP-3	: Zona Pellusida-3
$\alpha$	: alfa
$\beta$	: beta
$\gamma$	: gamma

n : sayı no  
μ : mikro

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Spermin oosite bağlanması ve zona tabakasının penetrasyonu	18
Şekil 2.2.	Fertilizasyon	19
Şekil 2.3.	Zigot	20
Şekil 2.4.	Morula	21
Şekil 2.5.	Blastokist	21
Şekil 2.6.	Blastokist hatching, 5-5,5. gün	22
Şekil 2.7.	İmplantasyon	23
Şekil 2.8.	İmplantasyon aşamaları	24
Şekil 2.9.	İmplantasyon embriyo-endometrium diyalogu	25
Şekil 2.10.	Embriyo skorlaması	34
Şekil 2.11.	Assisted Hatching	36
Şekil 2.12.	Defragmentasyon	37
Şekil 2.13.	PGD	37
Şekil 2.14.	Ribbon Diyagrama göre 3 adet insan G-CSF gösterimi	39
Şekil 2.15.	G-CSF reseptörü gösterimi	39
Şekil 2.16.	Ovulasyon mekanizmasında G-CSF	40
Şekil 4.1.	Lavaj G-CSF ve Gebelik kesesi var/yok, ROC eğrileri	52
Şekil 4.2.	A) G-CSF-R belirteci ile zayıf boyama paterni B) G-CSF-R belirteci ile zayıf boyama paterni (x40 HPF), ok ile gösterilenler boyanan hücreler.	53 53
Şekil 4.3.	G-CSF-R belirteci ile boyama paterninin olmadığı	53

## TABLULAR

<b>Tablo 2.1.</b>	Overv Rezerv Testleri	9
<b>Tablo 2.2.</b>	Anovulasyon Sınıflandırılması	10
<b>Tablo 2.3.</b>	İmplantasyon Belirteçleri	28
<b>Tablo 2.4.</b>	IVF’de İmplantasyon başarısızlığında etiyolojik faktörler ve yönetimi	33
<b>Tablo 2.5.</b>	Bölünme aşamasındaki embriyolarda ESHRE tarafından 2011’de embriyo skorlama sistemi oluşturulmuştur	34
<b>Tablo 4.1.1.</b>	Hastaların Lavaj G-CSF değeriyle $\beta$ -hCG oranları ilişkisi	49
<b>Tablo 4.1.2.</b>	Hastaların Lavaj G-CSF değeriyle gestasyonel kese oranlarının ilişkisi	49
<b>Tablo 4.1.3.</b>	Hastaların Lavaj G-CSF değerleriyle USG’de görülen FKA pozitifliği ilişkisi	50
<b>Tablo 4.2.</b>	Lavaj G-CSF değerlerinin USG’de gebelik kesesi sayılarına göre değerlendirilmesi	51

# 1. GİRİŞ

İmplantasyon, zigotun blastokist haline gelerek uterus kavitesine ulaşması ve endometrium lüminal epiteli ile karşı karşıya gelmesi, tutunması ve desidualize endometrium stromasını invaze ederek, maternal damar sistemine ulaşıp yerleşmesi süreci olarak tanımlanır [1]. Bu diyalogu sağlayanlar büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks proteinleri, sitokinler, prostoglandinler ve immunolojik faktörlerini kapsayan komplike bir sistemdir [2]. Bu kompleks sistemde meydana gelen herhangi bir aksaklık, implantasyonu engellemektedir.

İnfertilite tedavisinde son aşamayı Yardımlı Üreme Teknikleri (YÜT); in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyon (ICSI) oluşturmaktadır. Tedavide temel düşünce ovarian foliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi yollarla elde edilen spermelerin laboratuvar ortamında bir araya getirilmesi, fertilizasyonu ve in-vitro kültür şartlarında geliştirilen embriyoların intrauterin kaviteye yerleştirilmesidir.

YÜT'nin gelişmesiyle infertilite tedavisindeki başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bir bebeğe sahip olabilmesi sağlanmıştır.

ICSI uygulamalarında %80'lik fertilizasyon oranlarına ulaşılabilmesine rağmen, ortalama canlı doğum oranı %45'i geçememektedir [3]. İmplantasyon başarısızlıkları IVF'in en önemli hız kısıtlayıcı basamaklarından biridir [4].

İmplantasyon mekanizmaları aydınlatılmadıkça, endometrial uygunluğun kesin bir tanımını yapmak zorlaşmaktadır.

Son zamanlarda implantasyon başarısızlığında önemli etkenlerden biri olan endometrial reseptivite üzerine pek çok moleküler belirteç araştırılmaktadır. CSF ailesinin anne ve embriyo arasındaki iletişimde çok önemli bir rolü olduğu insan ve hayvan modellerinde oldukça ikna edici bir biçimde gösterilmiştir [5].

Glikoprotein olarak sekrete edilen bu CSF'ler reseptör proteinlerine bağlanarak hücre farklılaşması ve bölünmesiyle ilgili olan hücre içi sinyal yollarının aktive olmasını sağlamaktadır [6, 7]. G-CSF ekspresyonu ve G-CSF reseptörleri insan endometriumunda (desidua), preimplantasyonda embriyoda ve de plasentada bulunmaktadırlar. G-CSF başarılı IVF/ICSI sikluslarında, ovulasyondan 10 gün sonra serumda artışı saptanmıştır[8].

Bizim bu çalışmadaki amacımız öncelikle tekrarlayan implantasyon bozukluğu olan ve ICSI planlanan hastaların embriyo transfer günü serviko-vajinal lavajdan G-CSF ve endometrium örneklerinden G-CSF reseptör düzeyleri bakılması ile elde edilecek gebelik oranları ilişkisinin gösterilmesidir.

Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Ankara Tüp Bebek Merkezlerimize başvuran, son 12 ay içinde ICSI yapılmasını planladığımız hastalarımızdan 19'u dahil edilmiş olup; 18-42 yaş aralığında, donma-çözme siklusu olan veya zorunlu tek embriyo transferi yapılan hastalar ise çalışmaya dahil edilmemiştir. Örnekler embriyo transfer gününde serviko-vajinal lavaj sıvılarından minimal invazif bir yaklaşımla alınmıştır. Serviko-vajinal lavaj örneklerinden Biyokimya laboratuvarımızda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile G-CSF düzeylerine bakılmıştır. Endometrium biyopsi yapılmış olan hastalarımızın endometrial biyopsi örneklerinde G-CSF reseptör incelenmiştir. G-CSF ve G-CSF reseptörü düzeyleri ile elde edilecek gebelik oranları ilişkisi istatistiksel olarak incelenerek, klinik retrospektif bir araştırma yapılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnfertilite

İnfertilite psikolojik, ekonomik, demografik ve tıbbi etkileri olan sık görülen önemli bir durumdur [9]. 35 yaş altında olan kadınlarda korunmasız bir yıl boyunca, 35 yaş üstünde korunmasız 6 ay düzenli ilişkiye rağmen gebe kalınmaması infertilite olarak tanımlanır [10].

Fekundabilite, tek bir menstrüel siklusta gebelik elde etme olasılığıdır [10]. Genel popülasyonda fekundabilite oranı %20'dir. Korunma yöntemi kullanmayan fertil çiftlerin %57'si ilk 3 ayda, %72'si 6 ayda, %85'i 1 yılda, %93'ü ise 2 yılın sonunda gebe kalmaktadır [9, 10].

Son yıllarda çeşitli nedenlerden dolayı (kadınlarda kariyer ve eğitim sahibi olma düzeyindeki artış, evlilik yaşının artması, boşanma oranındaki artış, aile planlama ve doğum kontrolü alanındaki gelişmeler, gecikmiş doğum yaşı, azalmış aile sayısı..) fertilitate ve doğum alanları azaltılmaktadır [9].

Her iki partnerin değerlendirilmesi eş zamanlı yapılmalıdır. İnfertilitenin ilk değerlendirme zamanı, çiftin geçmiş risk faktörleri yanı sıra kadın partnerin yaşına bağlıdır. Özellikle 30 yaşından sonra, overler yaşla birlikte fekunditede bir düşüş başlar [11]. Tedavisiz canlı doğum elde etme olasılığı artan yaş ve artmış infertilite riski ile azalmaktadır [9].

Bir yıl veya daha fazla süredir korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamayan bütün çiftlere değerlendirme yapılması önerilmelidir, ama bir yıllık infertilite değerlendirme için bir önkoşul değildir. Düzensiz veya seyrek adet gören, pelvik enfeksiyon, endometriyozis öyküsü olan, pelvik cerrahi geçiren, erken menapoz aile öyküsü olan, sitotoksik ilaçlar veya pelvik radyasyon tedavisi alan, sigara kullanımı olan hastalarda değerlendirme hemen başlatılmalıdır [12].

Erkek faktörü de, erkek partnerin erken değerlendirilmesine başlatmak için bir nedendir. Sperm kalitesi kötü olan veya kötü olmasından şüphe edilen, testiküler travma, tedavi gerektiren yetişkin kabakulak, iktidarsızlık ya da diğer cinsel işlev bozukluğu, kemoterapi ve/veya radyasyon tedavisi almış olması sayılabilir [12].

Amerikan Kadın Hastalıkları ve Jinekologlar Derneği (ACOG) ve Amerikan Üreme Sağlığı Derneği (ASRM) tarafından, 35 yaşından büyük kadınların klinik endikasyonu veya 6 aydır başarısız girişimleri varsa, tedavi geciktirilmeksizin infertilite

değerlendirmesine alınması önerilir. 40 yaşından büyük kadınlarda, daha acil değerlendirme ve tedavi önerilir [13].

İnfertilitenin ana nedenlerini ovulatuvar işlev bozuklukları (%20-40), tubal ve peritoneal patolojiler (%30-40) ve erkek faktörüdür (%30-40), uterin patoloji göreceli olarak nadirdir ve kalanların nedeni açıklanamamaktadır [9].

### **2.1.1. Kadın İnfertilitesi**

Kadın faktörünün değerlendirilmesi kapsamlı bir hikaye, fizik muayene, endokrin testler, görüntüleme yöntemleri ve genetikten oluşur.

Hikayede;

- İnfertilite süresi, önceki değerlendirme ve tedavinin sonuçları.
- Menstrüel Öykü (döngü uzunluğu ve özellikleri) ovulatuvar durumunu belirlemede yardımcıdır. Örneğin, düzenli aylık döngüleri olan kadında molimina (göğüslerde hassasiyet, yumurtlama ağrısı, şişkinlik) olması ovulasyon varlığı, şiddetli dismenorede endometriozis akla gelir. Menoraji ve dismenore uterin myomlarla ilişkili olabilir. Yaşla birlikte benign uterus patolojilerinde (leiomyom, endometrial polip, adenomyozis) de artış olmakla beraber; bunların fertiliteye etkisini gösteren çok az kanıt vardır [14].
- Tıbbi, cerrahi ve jinekolojik geçmişi (cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, pelvik inflamatuvar hastalık, anormal Pap smear, kemoterapi veya radyoterapi alımı, geçirilmiş batın cerrahisi (apendektomi, kistektomi vb) adezyon oluşumunu ve tubal disfonksiyonu predispoze edebilir.)
- Obstetrik öyküsü
- Cinsel öykü (cinsel işlev bozukluğu ve cinsel birleşme sıklığı)
- Aile öyküsü (İnfertil aile üyeleri, doğum kusurları, genetik mutasyonlar, örneğin Frajil X de erkeklerde zeka geriliği, öğrenme problemleri, gelişme geriliği ya da otistik özelliklere sahip olurken, ön mutasyon olan kadınlarda prematür over yetmezliği gelişebilir.)
- Yaşam tarzı geçmişi (meslek, egzersiz, stres, diyet, kilo, sigara ve alkol kullanımı)
- Yaş tek başına önemli bir etkidir. Özellikle oosit sayısı ve kalitesinde düşmeden ötürü 19-26 yaş arasındaki kadınlarda, 35-39 yaş arası kadınlara göre 2 kat daha fazla spontan gebe kalma oranı vardır. YÜT başarı oranları

raporlarında da, başarıyı etkileyen en önemli faktörün yaş olduğu bildirilmiştir. 35 yaş altında embriyo transfer başına canlı doğum oranı %43.4, 35-37 yaşlarında %35.9, 41-42 yaşlarında %14.9, 42 yaş ve üzerinde %5.8'dir[15]. Spontan gebeliklerde olduğu gibi YÜT ile elde edilen gebelik kayıpları 35 yaş öncesi %20 altında iken, 40 yaşında %30 ve 44 yaş ve üzerinde %60'ın üzerinde rapor edilmiştir [16]. Yaşa bağlı fertilité azalması ve spontan gebelik kayıp oranlarının artması, ilerleyici follüküler kayıp ve yaşlı oositlerdeki anormalliklere (artmış anöploidi, mayotik iğne formasyon ve fonksiyonundaki düzenleyici mekanizmalardaki bozukluk) bağlanmaktadır [17]. Anormal kromozomlu abortus olasılığı 20 yaşında %35'in altında iken, 42 yaş üzerinde %80'e çıkmaktadır [18]. En sık gözlenen kromozomal anormallik trizomilerdir; bunları poliploidiler ve monozomi X (45, X) izler [18].

Fizik muayenede, hastanın vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplanmalıdır. Abdominal obezite, insülin direnci açısından değerlendirilmesi için yardımcıdır. İkincil cinsiyet özelliklerinin gelişiminin tamamlanmamış olması hipogonadotropik hipogonadizm için bir işaret olabilir. Kare şekilli göğüs ile kısa ve tıknaz olan bir vücut yapısı, Turner sendromunu göstermektedir. Pelvik anatomi mülleryen anomaliler ve çeşitli patolojiler açısından incelenmelidir. Tiroid bezi, galaktore veya androjen fazlalığına ilişkin (hirsutizm, akne, erkek tipi kellik, virilizasyon) belirtiler bir endokrinopati (örneğin, hiper veya hipotiroidi, hiperprolaktinemi, polikistik over sendromu, adrenal bozukluk) varlığını düşündürmektedir [12].

Adnekte veya douglasta hassasiyet veya kitleler kronik pelvik inflamatuvar hastalık ya da endometriozisi akla getirmelidir. Posterior Culdesac, uterosakral ligamanlar veya rektovajinal septumda nodüller endometriozisin göstergesidir [12, 19, 20].

Vajinal/servikal yapısal anormallikler veya akıntı bir anomali, enfeksiyon veya servikal faktör varlığını düşündürmektedir [19].

Uterusun büyümesi veya hareketliliğinin olmaması leiomyom, endometriozis, pelvik veya adeziv bir hastalık akla gelmelidir [20].

Tanısal testlerde başlangıç değerlendirmemizde semen analizi, uterin kavite ve tubal açıklığın değerlendirilmesinde HSG (histerosalpingografi), ovalutuar fonksiyonların değerlendirilmesi, over rezervinin değerlendirilmesi (adetin 3.günü FSH seviyesi, antral folikül sayısı, Anti Mülleryan Hormon seviyesi), klamidya antikor testi, karyotip genetik analizi, ultrasonografi, histereskopi ve tanısal laparoskopidir [21-23].

Kadınlarda infertiliteye sebep olan faktörler: %25 ovulatuvar disfonksiyon, %15 endometriozis, %12 pelvik adezyonlar, %11 tubal blokaj, %11 diğer tubal anomaliler, %7 hiperprolaktinemi, %15 açıklanamayan nedenler ve geriye kalan da yaygın olmayan problemler (uterin, anatomik, enfeksiyöz, servikal ve endokrin patolojiler) olarak bilinmektedir [14]

## **2.1.2. Kadın İnfertilitesi Nedenleri**

### **Ovulatuvar Faktör**

İnfertil çiftlerin %15'inde ovulasyon bozukluğu vardır; kadına bağlı infertilitenin %40'ında ovulatuvar faktör vardır [12]. Ovulasyon olup olmadığı menstrüel öyküsü, bazal vücut sıcaklığı eğrisi, üriner LH bakılması, luteal fazda kan progesteron düzeyi ölçümleri, endometrial biyopsi ve seri TV-USG ölçümleri ile anlaşılabilir.

Bozukluk gebeliğe engel olacak şekilde ağır (anovulasyon) veya hafif (oligoovulasyon) olabilir.

Üreme çağındaki kadınlarda normal menstrüel siklus uzunluğu 24 ile 38 gün arasında değişmektedir [24]. Aylık regüler siklusu olan, premenstrüel dönemde meme hassasiyeti, dismenore gibi semptomu olan kadınlar tipik olarak ovulatuvardır [25]. Ovulasyon bozuklukları genelde irregüler mens periyotları (oligomenore) veya adet görememe (amenore) ile karakterizedir [24].

Tiroid hastalıkları, hiperprolaktinemi, adrenal hastalıklar, hipofizer ve ovaryen tümörler, yeme bozuklukları, aşırı kilo kayıpları, aşırı egzersiz, polikistik over sendromu (PKOS) ve obezite anovulasyon ile ilişkili sık karşılaştığımız durumlardır [24, 26].

Seri bazal vücut sıcaklığı (BVS) ölçümleri over fonksiyonunu değerlendirmek için basit ve ucuz bir yöntem sağlar. BVS ile izlenen sikluslarda doğurganlığın en yüksek olduğu aralık, BVS'nın siklus ortasındaki artıştan hemen önceki 7 günü kapsamaktadır. Cinsel ilişkinin zamanlaması, ilişkinin BVS'da gözlenen en erken artıştan 7 gün önce başlanacak ve en geç görüldüğü günde sonlanacak şekilde gün aşırı önerilmesi ile optimize edilebilmektedir. İdeal BVS kayıtları belirgin olarak bifaziktir, 25 ile 35 gün arasında değişen bir siklus varlığını göstermektedir. Isı artışından 12 veya daha fazla gün sonra adet başlamaktadır. Ovulasyonla ilgili işlev bozukluğunu değerlendirmede daha güvenli yöntemler olmasına rağmen, BVS yine de yararlı olabilmektedir ve daha formel ve pahalı değerlendirmeleri yapmayı istemeyen veya yapamayan çiftleri için en iyi yöntem olabilmektedir [12].

Serum Progesteron ölçümü uygun zamanda yapıldığında en basit, en sık kullanılan, objektif ve güvenilir ovulatuvar işlev testidir. Progesteron LH yükselmesinden 1 hafta sonra en yüksek değerine ulaşır. 3 ng/mL'nin altındaki progesteron düzeyi doğal olarak daha düşük düzeylerin beklendiği ovulasyondan hemen sonra veya adet başlamadan hemen önce alınması haricinde anovulasyonu göstermektedir [27]. İdeal olarak serum progesteron düzeyine beklenen adet tarihinden yaklaşık 1 hafta önce düzeyinin en yüksek veya buna en yakın olduğunda bakılmalıdır. Genel inanın ve uygulamanın aksine, siklusun 21. günü bakılan serum progesteron düzeyi her zaman en uygun zaman değildir. Bu uygulama siklusu 28 gün süren kadınlarda iyi bir seçenektir. Ancak siklusu 35 gün süren kadınlar için kötü bir zamanlamadır. Testin yapılacağı en iyi zaman beklenen adet tarihinden 1 hafta önce yapılması hedeflenecek şekilde olmalıdır [9].

Üriner LH atılımı, çeşitli ticari 'ovulasyon belirleyicisi kitleri' kullanarak idrar luteinizan hormon (LH) belirlemeleri ovulasyonu 1 ile 2 gün öncesinde LH artışını tespit edebilirsiniz. İdrar LH kitleri ile ovulasyona dolaylı kanıt sağlar ve en büyük doğurganlık aralığını tanımlamak için yardımcı olur: LH artışının günü ve ertesi gün [28]. Test genellikle öğle veya akşam idrar örneklerinde gerçekleştirilir. Ancak, doğruluk, kullanım kolaylığı, güvenilirlik ve ürünler arasında değişir ve test yanlış-pozitif ve yanlış-negatif sonuçlar doğurabilir [29].

Endometrial biyopsi, progesteronun oluşturduğu tipik histolojik değişikliklere dayanarak bir ovulasyon testi olarak kullanılabilir. Ekzojen progesteron veya sentetik bir progesteron yokluğunda sekretuar endometriyumun saptanması, yakın zamanda olmuş ovulasyonu göstermektedir. Uzun süreli kronik anovulasyonu olan kadınlardaki biyopsi özel tedavi gerektiren endometrial hiperplazinin saptanmasını ya da dışlanmasını sağlayabilmektedir. Kronik endometriti olduğu düşünülen az sayıdaki kadında biyopsi tanısaldır. Luteal Faz yetmezliği tanısında endometrial biyopsi ve histolojik tarihlenmenin standart uygulamasının geçersiz olduğu 2004'te doğrulanmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda özet olarak endometrial tarihlendirme üreme başarısızlığı olan kadınlara klinik yaklaşımı yönlendirememekte ve infertilitenin tanısall değerlendirilmesinde yeri yoktur [30, 31].

Seri TV-USG ile ovulasyon öncesi foliküllerin boyutu ve sayısı ile ilgili ayrıntılı bilgi ve ovulasyonun ne zaman olacağını tahminini sağlamaktadır; ama hala ovulasyonun gerçekten oluştuğuna ilişkin pozitif kanıt sağlayamaz.

Fetal hayatta hızla çoğalan germ hücreleri 16-20. gebelik haftalarında yaklaşık 6-7 milyon oogoniaya ulaşır. Sonra gen ile ilişkili apoptozis başlar. 1. mayoz bölünme sonrası

oluşan oositler doğumda 1-2 milyona, puberte başlangıcında 300-500bine düşer. Yaşam boyu 400-500 adet oosit ovule olur, geri kalanı ise atreziye uğrar. Üreme çağı boyunca follüküler kayıp 35-38 yaşlarına kadar sabit iken, sonraki 10-15 yıl hızlanacak ve 1000'den az sayıda follükül kalması ile menapoza girilecektir. Ortalama kadınlarda follüküler kayıpta hızlanma ve fertilitede azalma 30'dan sonra başlar, 35 yaşında hızlanır ve 38 yaşında belirgin hale gelir ve yaklaşık 13 yıl sonra menapoza girilir (ortalama 51 yaş). Kadınların %10'u ise 45 yaş ve öncesinde menapoza girer; bunun nedeni genetik özellikleri açısından daha az follükül havuzuyla doğmaları olduğu belirtilmektedir [32].

Yaştan bağımsız olarak menstrüel düzensizlik ile menapoz arası süre 5 yıldır [33]. Erken menapoz (40-45 yaş) ve erken ovaryen yetmezlik genetik özellikleri benzerdir [34]. Yaştan bağımsız eksojen gonadotropinlere kötü yanıt veren kadınların siklus özellikleri, yaşlı veya erken menapoza giren kadınların siklus özelliklerine benzerler [35]. İlerleyen yaşla birlikte follüküler kayıp hızı artıp, menstrüel düzensizliğin başlamadığı dönemlerde serum Follüküler Stimulan Hormon (FSH) artmaya başlar (adetin 2-3.günü FSH:11-15 IU/L üzerinde olması anormal kabul edilir). Yükselen FSH düzeyleri kadınlarda üremeye ilgili yaşlanmanın en erken göstergelerinden birisidir ve en sık kullanılan over rezerv testidir [21]. Azalan follüküller ve ovaryen hormonlarla (inhibin-B azalır, inhibin-A azalır, aktivin-A artar) FSH salınımının baskılanmasının azalmasından kaynaklanmaktadır [36]. Yaşla birlikte 42 yaşına kadar FSH arttıkça follüküler faz kısalır. Sonraki 8-10 yılda ortalama siklus uzunluk ve değişkenliği, ovulasyondaki azalma ile artmaktadır. Erken dönemlerdeki artmış estradiol (E<sub>2</sub>) yükselmeleri siklus başındaki ilerlemiş follükül gelişimi ve dominant follükülün erken seçilmesinden kaynaklanmaktadır. FSH arttıktan birkaç yıl sonra E<sub>2</sub> düzeylerinde azalma olacaktır [37]. Yaşla birlikte ilerleyici follükül azalmasına bağlı menstrüel siklus özelliklerindeki değişiklikler; over hacminde azalma ve erken follüküler fazda (D3) transvajinal ultrasonografi (TV-USG) ile gözlenen antral follükül sayısındaki azalma ile ilişkilidir [38]. Kalan follükül sayısı en önemli faktördür.

Over rezervi, overin fonksiyonel potansiyelini, oositlerin sayı ve kalitesini ve buna bağlı kadının reproduktif potansiyelini tanımlayabilmek için kullanılan bir terimdir. Artan yaşla oosit sayısı ve kalitesi azalmasına rağmen aynı yaş kadınlar arasında doğurganlık anlamlı olarak değişkenlik göstermektedir. Over rezerv testlerini kullanmadaki amaç Azalmış Over Rezervi (AOR) olan hastaların tanısını koymak değil, gonadostimulasyona cevabın zayıf olacağı ve gebelik şansının düşük olabileceği hastaların tespit edilebilmesidir [39]. Bu durum göz önüne alınarak infertil kadınlarda başarılı tedavi olasılığı ile ilgili prognostik bilgi sağlamak için birkaç yöntem tanımlanmıştır. Yalnız testlerin azalmış over

rezervi tanısını kesin olarak koyamayacağını bilmek gerekir. ORT( over rezerv testleri) biyokimyasal ve ultrasonografik belirteçlerden oluşur. Testler Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Overv Rezerv Testleri

<p><b>Biyokimyasal Testler</b></p> <p>a) Statik Testler</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Bazal Serum FSH</li><li>• Bazal Serum E2</li><li>• Anti Mülleryen Hormon (AMH)</li></ul> <p>b) Dinamik Testler</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Klomifen Sitrat Challenge Testi (CCCT)</li><li>• GnRH-a Stimulasyon Testi (GAST)</li><li>• Eksojen FSH Overyan Rezerv Testi (EFORT)</li></ul> <p><b>Ultrasonografik Belirteçler</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Antral Folikül Sayısı (AFC)</li><li>• Over Volümü</li><li>• Ovaryan Stromal Kan Akımı</li></ul>
--

Serum bazal FSH (siklusun erken foliküler fazında, 2.-3. günü), bazal östradiol (E<sub>2</sub>), bazal inhibin-B, Anti-Mülleryen Hormon (AMH) düzeyleri, CCCT (Klomifen Sitrat Challenge Test: bazal FSH değeri ile siklusun 5. gününden itibaren 5 gün 1x100 mg CC aldıktan sonraki 10. gün FSH değeri toplamıdır) ile bazal USG’de antral follikül sayısı ve over hacmi ile değerlendirilebilir [4, 40, 41]. FSH<sub>≥</sub>15 mIU/mL [42], E<sub>2</sub><sub>≥</sub>80 pg/ml [43], İnhibin-B<45 pg/ml [44], AMH<1 ng/ml [45], CCCT<sub>≥</sub>26 mIU/mL [46], bazal over ortalama hacmi <3 cm<sup>3</sup> [47], <10 mm total antral follikül sayısı<sub>≤</sub>3 [48] ise azalmış over rezervi anlamına gelmektedir.

Günümüzde korpus luteumdan düşük düzeyde progesteron üretimi veya kısa luteal faz ile olarak bilinen luteal faz yetersizliğinin de ovulatuvar fonksiyonun bir bozukluğu olduğu düşünülmektedir. İmplantasyon aralığı (penceresi) ovulasyon sonrası 5.-9. günler arasında 3-6 gün süren kısıtlı bir dönemdir. Luteal faz yetmezliği olan kadınlardaki düşük progesteron düzeylerinin endometrial matürasyonda gecikme yaparak implantasyon aralığını olumsuz yönde etkilediği ve de erken gebelik kayıplarına neden olduğu düşünülmektedir [49].

Anovulasyon sebeplerine göre genel değerlendirme yapıldıktan sonra hastalar WHO tanı kriterlerine göre ayrılırlar. WHO sınıflaması kan gonadotropin ve östrojen düzeyine göre yapılmakta olup hastalar temel olarak üç grupta değerlendirilir.

Hiperprolaktinematik anovulasyon ise dördüncü ve kendine has bir durum olarak değerlendirilmektedir. Anovulasyon Sınıflandırılması Tablo 2.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 2.2.** Anovulasyon Sınıflandırılması

<p><b>Grup1: HİPOGONADOTROPİK HİPOGONADİZM</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm</li><li>• Kallmann Sendromu (İzole Gonadotropin yetersizliği ve anozmi)</li><li>• Fonksiyonel Hipotalamik disfonksiyon (Anoreksia nervroza, ağır egzersiz, stress, ilaçlar...)</li><li>• Hipofiz tümörü ve Hipofiz nekrozu (Sheehan Sendromu)</li></ul> <p><b>Grup2: NORMOGONADOTROPİK HİPOGONADİZM</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• PCOS</li></ul> <p><b>Grup3: HİPERGONADOTROPİK HİPOGONADİZM</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• İdiyopatik</li><li>• İatrojenik (Cerrahi, menapoz, radyoterapi, kemoterapi)</li><li>• Genetik (Turner Sendromu)</li><li>• Otoimmün Nedenler</li><li>• Enfeksiyonlar (kabakulak ooforiti)</li></ul> <p><b>DİĞER ENDOKRİNOPATİLER</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hiperprolaktinemi</li><li>• Tiroid bozuklukları</li><li>• Konjenital Adrenal Hiperplazi</li><li>• Hormon salgılayan over tümörleri</li></ul>
---

**A. WHO Grup 1 (Hipogonadotropik Hipogonadizm):**

Bu gruptaki olgular anovulatuvar infertilitenin %5-10’unu oluştururlar. Östrojen seviyeleri düşüktür, progesteron çekilme kanaması görülmez ve genellikle amenoreiktirler. Prolaktin seviyeleri normaldir. FSH normal veya düşük olabilir. Hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımının azalması veya hipofizin GnRH’a cevapsızlığı veya hipofizin hasar görmesi söz konusudur. Başlıca nedenleri; Fonksiyonel hipotalamik disfonksiyon (stres, kilo kaybı, aşırı egzersiz, anoreksia nervroza), izole GnRH salınım defekti (Kallman Sendromu), İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm, Hipofiz Tümörü ve Hipofiz İnfarktı (Sheehan Sendromu) dır. Neden tedavi edilebilir ise, tedavi nedene yönelik olarak yapılmalıdır. Neden olarak herhangi bir şeyin bulunamaması durumunda ise ilk seçenek tedavi cilt altına yerleştirilen GnRH pompasıdır. GnRH pompasının mevcut olmaması durumunda, hem LH hem de FSH içeren gonadotropin preparatları ile ovulasyon indüksiyonu yapılmalıdır. Bu şekilde elde edilen kümülatif gebelik oranları normal fertil popülasyondaki gebelik oranlarına eşit ve hatta daha



yüksektir. Altı siklus Human Menapozal Gonadotropin (HMG) ile %90'lara varan gebelik oranları bildirilmiştir [50].

### **B. WHO Grup 2 (Normogonadotropik Normoöstrojenik):**

Anovulatuvar olguların %70-85'ini oluşturur. Serum FSH ve östrojen düzeyleri normaldir, serum LH düzeyleri ise normal veya yüksek olabilir. Progesteron çekilme kanaması vardır. Bu hastaların nerdeyse hepsi, değişik formlarda olmak üzere PKOS olgularıdır. Reprodüktif yaştaki kadınların %4-6'sını etkiler [51]. Özellikle oligomenoreik olan PKOS olguları nadiren ovulasyon gösterirler [52]. Tedavide obez hastalarda zayıflama ovulasyon indüksiyonundan önce yapılır. İnsülin reseptör duyarlılaştırıcı ajanlar, klomifen sitrat, letrezol birinci basamak tedavisidir [53].

### **C. WHO Grup 3 (Hipergonadotropik Hipoöstrojenik):**

Anovulasyon olguların %10-30'unu oluşturur. Gonadotropin düzeyleri yüksek, serum östrojen seviyeleri düşüktür. Primer nedenleri prematür ovaryen yetmezlik (idiopatik, radyoterapi/kemoterapiye sekonder, cerrahiye sekonder, genetik veya otoimmün yetmezlik sonucu olabilir) veya ovaryen rezistans sendromudur (folliküler form). Folliküler formun nedenleri; intraovaryen modülatör bozukluğu, azalmış gonadotropin reseptör aktivitesi, follikül uyarıcı hormon reseptör geninde defekt olabilir. Bunun yanında Turner Sendromu (45,X) ve androjen duyarsızlığı sendromu (46,XY) neden olabilir. Çoğu olgu amenoreik olup genellikle anovulasyon tedavisine cevap vermez. Bu olgulardaki tek tedavi yaklaşımı oosit bağışdır [52].

### **D. Diğer ENDOKRİNOPATİLER**

Hiperprolaktinemi santral problemlerden kaynaklanan anovulasyonlardan birisidir. Artan prolaktin salımı ile gonadotropinlerin salınımında bozulma ve anovulatuvar sikluslar, oligomenore - amenore ve hipotalamik hipogonadizm gözlenir.

#### **2.1.2.1. Tubal anormaliler ve Pelvik Adezyonlar**

Tubal ve peritoneal faktörler infertil çiftlerin %30-35'inde görülmekte olup; kadın infertilitesinin de yaklaşık %40'ından sorumludur. Nedenleri geçirilmiş rüptüre apandisit, ektopik gebelik, septik abortus, pelvik tüberküloz, pelvik veya tubal cerrahi, pelvik inflamatuvar hastalık (PID) veya endometriozis sonrası gelişen peritubal-periovaryen

adezyonlar; tubal harabiyet ve obstrüksiyonlardır. PID atağı sonrasında tubal infertilitenin ortaya çıkma olasılığı %10-12, iki atak sonrası %23-35 ve üç atak sonrası da %54-75 olarak bilinmektedir [19, 54]. Tubo-peritoneal faktörü olanların bazılarında PID öyküsü bulunmazken; bunlarda en sık nedenin sessiz asendan enfeksiyonlar olduğu ve bu kadınların çoğunda, klamidya antikorları olduğu gösterilmiştir [55].

Tubal faktörde sperm ile ovumun karşılaşmasına engel olan anatomik problemler vardır. Proksimal tubal tıkanıklıklarda spermin fertilizasyonun gerçekleşeceği tubanın ampulla bölgesine geçişinde; distal tıkanıklıklarda ise ovumun fimbria tarafından tutulması veya ampullaya transportunda problem vardır. Orta kısmında tıkanıklık olması çok nadirdir. Distal obstrüksiyon hafif (fimbrial aglutinasyon), orta (fimbrial fimozis) veya ağır (tam tıkanıklık) olabilir. Şiddetli distal tubal obstrüksiyonlarda tubal sekresyonların lümende birikip tubal distansiyon oluşması ile hidrosalpenks gelişir ve tubal epitelde silya hasarı oluşur. Hidrosalpenks sıvısının geriye kaçarak, embriyoya ve endometriuma toksik etkileri ile veya sıvının mekanik etkisi ile implantasyonu etkilediği düşünülmektedir. Zeyneloğlu ve arkadaşlarının retrospektif çalışmaları inceleyerek yaptığı meta-analizde gebelik oranlarının hidrosalpenks varlığında %50 azaldığı, spontan abortus oranının ise iki kat arttığı gösterilmiştir [56]. Ayrıca hidrosalpenksi olan infertil kadınların endometriumunda reseptivite belirteçlerinden LIF ekspresyonu düşük bulunmuştur [57]. Hidrosalpenksi olan infertil çiftlere ICSI uygulamaları gün geçtikçe artmaktadır. Hidrosalpenks varlığında IVF sonuçları da düşük olmaktadır [58]. ICSI planlanmış hastalarda salpenjektomi sonrası endometrial LIF ve HOXA10 ekspresyonu ile IVF implantasyon oranlarında da önemli ölçüde artış saptanmıştır [59].

Endometriozis fertil kadınlarda %3-10 oranlarında ve infertil kadınlarda da %25-40 oranlarında mevcuttur [60]. Hastalığın şiddeti, evresi önemlidir. Overleri tutan endometriomaların ve ilerlemiş endometriozisin infertiliteye etkisi kesinken; orta-hafif düzeyde hastalığın etkisi tartışmalıdır. Endometriotik lezyonların, gelişen in situ menstürasyonun adezyon formasyonu, fibrozis ve proksimal tubal obstrüksiyon oluşturması ile ovulasyon sonrası ovum yakalanmasını inhibe eden bozulmuş bir adneksiyal anatomiye neden olduğu düşünülmektedir [32, 61]. Yine bu lezyonlara yakın bölgelerde gelişen inflamatuvar yanıt sperm transportunu [62], tubal motiliteyi [63], oosit gelişimini [64] veya erken embriyogenezi [32] bozar. Endometriozisli kadınların endometriumlarında azalan endometrial reseptiviteyle ilişkili immun hücre infiltrasyonunda artış gösterilmiştir [65].

İnfertil kadınlarda tubo-peritoneal yeterliliğin değerlendirilmesinde histerosalpingografi (HSG), selektif salpingografi, falloposkopi, sonohisterografi, transvajinal hidrolaparoskopi (fertiloskopi), klamidy antikor testi ve laparoskopi yer alır [32, 66]. Tubal faktörlerin tedavisi cerrahidir. Tanı konulduğunda tedavi olanağını da sağlayan laparoskopi en uygun seçenektir. YÜT'ndeki başarı oranlarının giderek artmasıyla, tubal faktör infertilitesindeki cerrahi yaklaşım endikasyonları giderek azalmaktadır [67]; fakat bazı hastalarda ise transvajinal ultrasonografik oosit toplanmasına [68] kolaylık sağlanabilmesi için IVF uygulaması öncesinde, laparoskopi ile hidrosalpenksi olan tüplerin alınması ve de adezyolizis yapılması gerekmektedir [69].

### **2.1.2.3. Servikal Faktör**

Servikte bulunan östrojene duyarlı bezler tarafından foliküler dönemde miktarı ve akışkanlığı artan servikal mukus, vajina ve ejakulattan spermleri yakalayıp, diğer seminal proteinleri ayırır ve anormal morfolojik spermleri, mikroorganizmaları filtre eder. Aynı zamanda spermler için rezervuar görevi (72 saat) yapar ve spermleri biyokimyasal olarak hazır hale getirir (Kapasitasyon spermin servikal mukus ile temasıyla başlar).

Servikal faktör nadiren ve olduğu zamanda ana infertilite nedenidir. Spekulum muayenesi ile kronik servisit, konizasyon veya servikal problemler nedeniyle operasyon geçirmiş ve stenoz oluşmuş durumlar saptanabilir. Muayenede aynı zamanda servikal kültür ve mikroskopik incelemeler ile serviste yönelik tedaviler verilebilmektedir. Mukusun reseptivitesi, spermin bu mukus içine penetre olup olmadığı ve canlılık yeteneğini değerlendiren postkoital test (Sims-Huhner testi) bakılabilir. Testte bozulmuş, hareketsiz veya pıhtılaşmış spermlerin gözlemlenmesi sonrası antisperm antikorlar araştırılabilir. Standart yöntemi veya yorumu olmayan postkoital testin kanıtlanmış tanısal bir değeri olmamakla birlikte, tedavi seçimini etkilemez. Aynı zamanda hasta için planlı ilişki sonrası rahatsız edici ve utandırıcı, stresli bir müdahaledir. Bunun için artık kullanılmamaktadır. Tanısı konulamamış servikal faktör nedenli infertilitenin tedavisinde ovulasyon indüksiyonu, IUI veya IVF ile başarılı sonuçlar alınmaktadır [32].

### **2.1.2.4. Uterin Faktör**

Kadına ait infertilite nedenlerinden %2-5'ini oluşturmaktadır. Uterin patolojiler doğumsal uterin malformasyonlar, leiomyomlar, adenomyozis, intrauterin adezyonlar, kronik endometrit ve poliplerdir. Embriyonun implantasyonunu engellemeleri dışında, 1.-2.

trimester spontan gebelik kayıpları, preterm doğum, servikal yetersizlik, prezentasyon anomalileri ve intrauterin gelişme geriliği de gözlenir. Tespit edilmeden IVF yapılan hastaların gebelik sonuçlarını olumsuz etkileyebilir. Bu anomalilerden bazılarının düzeltilmesiyle gebelik oranlarında artış gösterilmiştir [67].

Konjenital defektler (Mülleryan anomaliler) uterus, fallop tüpler, serviks ve üst vajenin anatomik yapısını üstlenen müllerien kanalların komplet (Rokitansky-Küstner-Hauser-Mayer Sendromu) veya parsiyel agenezisi, hipoplazileri, vajinal septum, unikornu uterus, uterin didelfis, bikornu uterus, septat uterus, arkuat uterus ve dietilstilbestrol (DES) ilaç ilişkili uterin anomalileri şeklinde olabilmektedir [70]. Bu anomaliler genellikle gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidirler, gebe kalma potansiyelini genelde etkilememektedirler. Bütün doğumsal uterin anormallikler arasında septat uterus en sık görülendir, infertilite ve obstetrik komplikasyonlarla en sık ilişkili olan durumdur (%80 gebelik kaybı, %10 preterm doğum, %10 term doğum). Sıklığı infertil ve fertil kadınlarda benzer oranlarda iken (%3) [71], tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda (%5-10) [72] ve geç abortus ile immatür doğum yapanlarda ise (>%25) daha yüksektir [73]. Septum tedavisi günümüzde histeroskopi ile yapılmaktadır. Tedavisiyle septumun giderilmesi gebelik prognozunu %75'lere kadar olumlu yönde etkilemektedir (%80 term doğum, %5 preterm doğum, %15 gebelik kaybı) [32, 74]. Uterus agenezi veya hipoplazisinde hastalara IVF ile kendi oositleri kullanılarak oluşan embriyonun taşıyıcı anne uterusuna transferi yapılabilir. Uterus bikornusta Strassman operasyonu ile deformasyon düzeltilebilir. Uterus arkuatus, fundustaki minimal bikornus oluşumudur, gebelik prognozunu etkilememektedir [75].

Edinsel nedenler arasında myoma uteri, endometrial polipler, uterin sineşiler ve endometrit yer almaktadır. Gebelik ve implantasyon oranları submuköz myomlarda düşükken [76]; endometrial kaviteye bası yapmayan ve orta düzeyde büyüklüğü olan ( $\leq 4$ cm) intramural myomlarda [77] ve subseröz myomlarda da normaldir [78]. Endometrial kavitede myom varlığında bir implantasyon belirteci olan HBEGF (heparin binding epidermal büyüme faktörü) düşük bulunmuştur [79]. Zeyneloğlu ve arkadaşlarının yayınladıkları bir makalede IVF tedavisi sırasında myomların büyüdüğü ve proliferatif büyüme faktörleri salgıladığı gösterilmiş, bunun da implantasyonu olumsuz etkilediğini öne sürmüşlerdir [80]. İnfertil kadınlarda %3-5 sıklıkta karşılaşılan endometrial poliplerin asemptomatik ve iyi tanımlanmış küçük çaplı olanlarının tedavi edilmesi konusunda henüz elde kanıt yoktur. Semptomatik olan (anormal kanama), geniş çaplı poliplere ise histeroskopi uygulanmalıdır [81]. Genellikle iyatrojenik travma sonrası oluşan, bazen de

kronik inflamasyon sonrasında endometriyal damarlanma ve fonksiyonunda bozulma ile oluşan intrauterin adezyonların (Asherman Sendromu) tedavisinde histeroskopi uygun bir yaklaşımdır [82]. Prognoz lezyon şiddeti ile orantılı olup, tedavi sonrası başarılı gebelik ve doğum oranları %25-70 arasındadır [32]. Kronik endometrit, reproduktif yetersizliğin nadir nedenlerinden birisi olup; klinik servisit, kronik veya rekürren bakteriyel vajinozis veya pelvik enfeksiyonu düşündüren kadınlarda ayrıntılı inceleme ve tedavi yöntemleri uygulanmalıdır.

Bir diğer uterin faktör ise açıklanamayan infertilitede de kısmen bahsedilen, endometrial faktör içinde yer alan implantasyon yetersizliği ve endometrial reseptivite anormallikleridir [83].

#### **2.1.2.5. Açıklanamayan infertilite**

İnfertilite nedenlerinin %15'ini oluşturur. Korunmasız düzenli ilişkide bulunulmasına rağmen, 1 yıl içinde gebelik elde edememiş (kadın yaşı 35 ve üzerinde 6 ayda), çiftlere yapılan temel fertilitate testleri normal sınırlar arasında saptandığında açıklanamayan infertilite olarak değerlendirilir [10]. Bu testler semen analizi, düzenli ovulasyonun gösterilmesi, normal uterin kavitenin tespiti ve bilateral tubal açıklığın olduğunun gösterilmesidir. Nedeni belirlenemeyen hastalarda etiyolojisinde endokrinolojik, immünolojik, genetik ve üreme fizyolojisiyle ilgisi olan tespit edilemeyen birçok nedenin yer aldığı düşünülür.

Açıklanamayan infertilitede tedavi ampiriktir, neden olmadığı için aynı zamanda tek bir tedavi protokolü de bulunmamaktadır. Tedavinin değerlendirilmesi ayrıca çok zordur, en çok kısa süreli infertilitede görülen spontan gebelik hızları çok yüksektir. Açıklanamayan infertilite grubuna dahil edilen hastalar sadece şansa bağlı olarak gebe kalamayan fertil çiftlerle birlikte, günümüzün geçerli yöntemleri ile problemin tespit edilemediği hastaları da içerir. İlk gruptaki çiftlerin çoğunluğu zaman içinde tedavi almadan kendiliğinden de gebe kalabilir. Kümülatif gebelik oranları ilk 2 yıl içinde, %60'a varabilir, fakat 3 yıllık süreden daha uzun infertilitesi olan çiftlerde ve özellikle 35 yaş üzerinde olan olgularda aylık fekundite hızları %1-3'e kadar inebilmektedir. Sağlıklı popülasyon grubunda spontan olarak 3-6 ay içinde gebelik elde eden çiftlerde fekundite hızı %25-30'dur [84]. Üç yıldan daha fazla infertilite süresi olan hastalarda her yaşla birlikte %2 düşüş göstermektedir. 2 yıl ve uzun süredir infertil olan ve kadın yaşı 35 ve üzeri olan çiftlerde agresif tedavi endikedir [85].

Açıklanamayan infertilite tanısı almış hastalarda ampirik tedaviler (Ovulasyon İndüksiyonu, IUI, IVF) uygulanır. Bu hastalarda 2-3 follikül geliştirecek şekilde kontrollü ovaryen hiperstimulasyon yapılması ve IUI'nin eklenmesi gebelik oranlarını, beklentisel olan %1-2'den %8-15 aralığına çıkarmaktadır [86]. Klomifen sitratın ve IUI'nin tek başına kullanımının yakın zamanda 580 hasta içeren çalışmada beklentisel tedaviye üstünlüğü gösterilememiştir [87]. 932 siklus içeren 8 çalışmayı sistematik olarak değerlendirmede, siklus başına fekdite oranları CC ile %5.6 ve CC/IUI ile %8.3 olarak bulunmuştur [88]. Başlangıç aktif tedavide ilk seçenek olarak kullanabileceğimiz CC/IUI veya letrozol/IUI 3-4 siklus uygulama ile kümülatif gebelik oranları yaklaşık %25 civarındadır [89]. Bu tedaviye cevap alınamayan olgularda IVF seçeneği gebelik oranları, maliyet yarar-zarar oranları ve gebeliğe daha kısa zaman ulaşılması yönünden daha etkili olduğu gösterilmiştir [89].

## **2.2. İmplantasyon ve Endometrial Reseptivite**

Zigotun blastokist haline gelerek uterus kavitesine ulaşması ve endometrium lüminal epiteli ile karşı karşıya gelmesi, tutunması ve desidualize endometrium stromasını invaze ederek maternal damar sistemine ulaşıp yerleşmesi sürecine implantasyon denir [90]. Bu diyalogu sağlayanlar büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks proteinleri, sitokinler, prostoglandinler ve immunolojik faktörlerini kapsayan komplike bir sistemdir [90]. Bu kompleks sistemde meydana gelen bir aksaklık, implantasyonu engellemektedir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda, endometrial genlerde disregülasyon olduğu, gen ekspresyon araştırmalarıyla gösterilmiştir [64]. Normal durumlarda siklus başına en fazla implantasyon şansı yaklaşık olarak %40'tır [91]. İmplantasyon mekanizmaları aydınlatılmadıkça endometrial uygunluğun kesin bir tanımını yapmak zorlaşmaktadır.

### **2.2.1. Preovulatuvar Dönem ve İmplantasyona Hazırlık**

Kadın üreme siklusunda yer alan endokrin sistem üyeleri hipotalamus, hipofiz, overler, tuba uterinalar, endometrium ve alt genital yollardır. Hipotalamus arkuat çekirdeğinde sentezlenen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ön hipofizden iki önemli gonadotropin hormonunun sentez ve salgılanmasını uyarır. Bunlar foliküler stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) dur [90].

FSH, overdeki foliküllerin gelişimini ve bu foliküllerden östrojen salgılanmasını uyarır. LH, FSH etkisi ile gelişmiş folikülden oositin atılmasını (ovulasyonu) tetikler ve ovulasyon sonrası geride kalan korpus luteumdan progesteron salınımını uyarır. Overlerin bu hipofizer hormonlar ile stimülasyonu sonucunda salgılanan östrojen ve progesteron endometriumu yaklaşmakta olan blastokistin implantasyonu için hazırlar [92].

Folikülogenez, folikülü oluşturan oosit çevresindeki hücrelerin, ovulasyona giden süreçte siklik olarak gösterdikleri değişim ve gelişim sürecidir. Latent fazdaki primordial folikül, mayotik profazın diploten evresinde durdurulmuş primer oosit ve bunun çevresindeki tek katlı yassı granüloza hücrelerinden oluşur. Aktifleşen primordial foliküller tek katlı primer folikül halini alır ve içindeki oosit dominant folikül olma yolunda ilerler ve çevresindeki granüloza hücreleri kübikleşir. Latent primordial foliküllerin aktifleşmesinde intraovaryon faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. FSH reseptörlerinin sentezi primordial folikül büyümesi başladıktan sonra tespit edilir [93]. Primer folikülde küboidal granüloza hücreleri çoğalır [94]. Çevresindeki stromal hücreler, teka interna ve teka eksterna olarak tabakaları olarak ayrılır. Granüloza hücre tabakası çok katlı hale gelir ve bu hücrelerden sentezlenen glikoprotein yapıdaki zona pellusida adı verilen bir membran ile çevrelenir. Zona pellusidanın görevi oositin birden fazla sperm tarafından döllenmesini engellemektir.

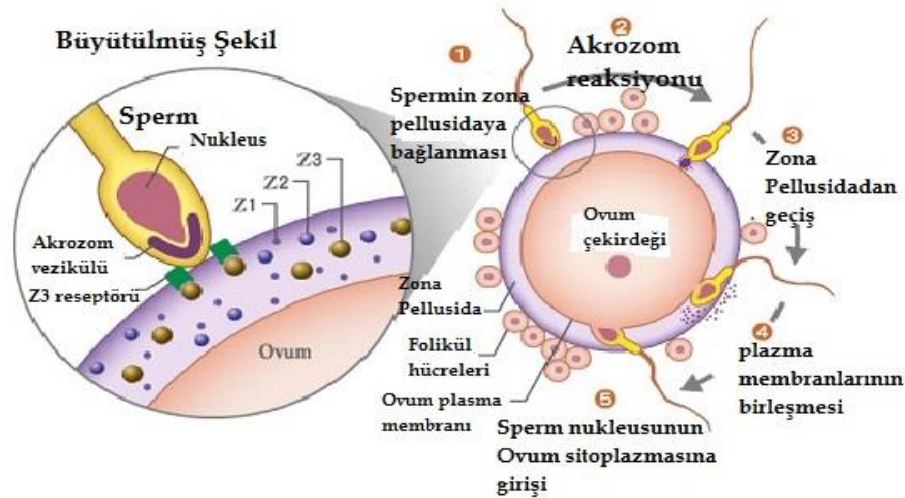
Her siklusta yaklaşık 15-20 primer folikül (preantral folikül) FSH etkisi ile uyarılır. Normal koşullarda bunlardan sadece bir tanesi tam olgunluğa erişebilir ve diğerleri dejenere olarak atrezik hale gelir. Dominant folikül seçimindeki en büyük rol östrojenin iki etkisindedir: 1) Folikül içindeki östrojen ve FSH'nın lokal etkileşimi ve 2) FSH'nın hipofizer sekresyonuna etkisidir. Atrezi sürecindeki ilk olay, granüloza hücrelerindeki FSH reseptör sayısındaki azalmadır.

FSH granüloza hücrelerindeki steroidogenezi (östrojen yapımı) başlatmakta ve granüloza hücrelerinin büyümesini uymaktadır [96, 97]. Östrojen ve FSH'nın sinerjistik etkisi ile granülozanın interselüler boşluklarında biriken folikül sıvısı artar ve kavite (antrum) oluşumu gözlenir. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri artık kumulus ooforusu oluşturur. FSH, büyük antral foliküllerin granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin gelişimini artırır. Ovulatuar tepe değerine yanıt verebilmek ve etkili korpus luteuma dönüşebilmek için, granüloza hücrelerinin LH reseptörlerine sahip olması gerekmektedir [98]. Geç foliküller fazda gerekli olan fazla miktardaki östrojenin sağlanması, LH'ın androjen üretimini uyarması ve FSH'ın aromatisasyonu uyarması ile olur [99, 100]. Preovulatuar konuma gelebilmek için gerekli olan toplam süre yaklaşık 85 gündür [93].

Oositin mayozu yeniden başlar ve redüksiyon bölünmesini tamamlamaya yönelir. Geç foliküler faz boyunca östrojenler önce yavaş yavaş, sonra da hızlı bir artış gösterir ve ovulasyondan yaklaşık 24-36 saat önce en üst düzeye ulaşır [101]. LH'nin ani artışının başlangıcı, östradiolun tepe seviyelerine ulaştığında ortaya çıkar [102]. LH kendi reseptörleri üzerinden etki göstererek, granüloza hücrelerinde luteinizasyonu ve foliküldeki progesteron ve prostoglandinlerin sentezini başlatır [103, 104]. Progesteronun preovulatar artışı östrojenin pozitif geriye dönük etkisini kolaylaştırmakta ve bu midsiklustaki FSH tepe noktasına ulaşmasını başlatmakta gerekli olabilir [105]. Progesteron, prostoglandinlerle birlikte, foliküler duvarın sindirim ve rüptüründen sorumlu proteolitik enzimlerin aktivitesini artırır [106]. Midsiklusta progesteron duyarlı FSH artışı, oositin foliküler elemanlardan serbestleşmesine, plazminojenin proteolitik enzim olan plazmine dönüşmesine ve yeterli sayıda LH reseptörlerinin luteal faz oluşturmasına katkı sağlamaktadır [107].

Midsiklus LH pikinden 10-12 saat sonra ovulasyon oluşur. Oosit ve onu çevreleyen kumulus 15-20 dakikada oosit fallop tüpünün ampullasına ulaşır. Oosit salınımindan sonra yaklaşık 8-24 saat fertilize olabilme yeteneğine sahiptir [108], sperm için ise bu süre 3-5 gündür.

Spermin oositi fertilize edeceği zamana dek geçeceği işlemler sırasıyla; motilitesindeki değişim, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, zona pellusidaya penetrasyonu, oolemmaya bağlanma, membran füzyonu ve sperm nukleusunun ovum plazmasına girişidir (Şekil 2.1).

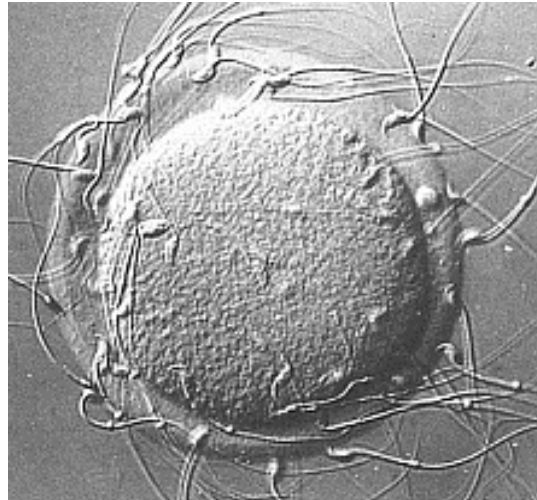


Şekil 2.1. Spermin oosite bağlanması ve zona tabakasının penetrasyonu [109]



Testis içinde immotil olan sperm, epididimde motilite kazansalar da, tam motil duruma ejakulasyon ve kapasitasyondan sonra ulaşırlar [110, 111]. Ejekulasyon sonrası 6 saat sürecek kapasitasyon, sperm serviksten geçerken başlar. İn vitro olarak kapasitasyon yaklaşık 2 saat kadar sürer [111].

Sperm ve oositin bir araya gelmesi, genellikle tuba uterinanın ampulla bölgesinde olur. Fertilizasyon sahasına 300-500 spermten 1 tanesi ulaşır. Bu sperm önce kumulus ooforusa penetre olur, sonra akrozomundan sekrete edilen hyaluronidaz, tubal mukozal enzimler ve sperm kuyruk hareketlerinin yarattığı güç ile oositi çevreleyen korona radiata aşılır ve zona pellusidaya ulaşılır [112]. Zonada bulunan, Zona Pellusida-3 (ZP-3) glikoproteini kapasite olmuş spermatozoanın reseptörlerini bağlar ve akrozom reaksiyonuna yol açan olayları indükler [112]. Bir veya daha çok spermatozoa zona pellusidayı deler. Ancak tek bir spermatozoa kendi kuyruğunu kaybederek oolemma ile kendi membranı füzyona uğrar. Bu milisaniyelerle olan olay sırasında oolemmadan kalsiyum akışı olmasıyla oolemma geçirgenliğini kaybeder (zona reaksiyonu) ve böylece polispermi önlenir [113] (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Fertilizasyon

Spermatozoanın oosit sitoplazması içine girmesiyle lizozomal enzimler içeren kortikal oosit granülleri serbest kalır. Spermatozoa için özgül olan reseptörler yok edilir. Bu arada ovulasyon ile atılan sekonder oosit, birinci polar cisimciğini atmış durumda olarak II. mayozun metafazında duraklamış haldedir. Penetrasyonla birlikte II. mayoz tamamlanır ve ikinci polar cisimcik atılır. Döllenmenin 16-20. saatinde dişi ve erkek

pronükleuslar karşı karşıya gelir (pronükleer oosit) 18-24 saatlerde birleşir (singami) ve daha sonrasında da crossing over ile zigot oluşur [114] (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Zigot

Mayoz bölünmesini tamamlayan zigotta, fertilizasyondan yaklaşık 30 saat sonra mitoz bölünme başlar. Her bölünme ile oluşan hücelere blastomer denir. Başlangıçta zigot iki blastomere ayrılır, daha sonra yarıklanmalar ardarda devam eder. 26-42. saatte 2 hücreye, 45. saatte 4 hücre, 66-72. saatte 8 hücre olur. Böylece 12-16 hücre evresine fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra ulaşılır [115]. Erken embriyo yarıklanması yoğun DNA replikasyonu ve blastomer oluşumu ile birliktedir, ancak blastomerlerin gittikçe küçülmesi ile embriyo boyutu sabit kalır [116]. 8-30 blastomerli morula evresine (Şekil 2.4) ulaşınca; ovaryan steroidler, otonom sinir sistemi, ve embriyonun kendi gelişimi sayesinde uterusu giriş (gonadotropin pikinden 4 gün, ovulasyondan 3 gün sonra) yapar [117].



**Şekil 2.4.** Morula (4.gün)

Blastomerler arasında elektriksel iletilerin, metabolitler ve ikincil mesajcılar gibi küçük moleküllerin transferine izin verecek gap junctionlar oluşur. Birbirine bağlantılar ile sıkıca tutunmuş, sınırları silikleşmiş, çok sayıda blastomerlerin görünümü yoğun ve sıkı bir hal almıştır. Bu sürece kompaktlaşma denir. Kompaktlaşma farklılaşmaya ait ilk olaydır. Kompaktlaşma sonrası gelişen çevresi kalın zona pellusida ile sarılı embriyo morula olarak tanımlanır ve insanda fertilizasyondan sonra 4.gün gözlenir. Embriyo 32 hücreli evreye ulaştığında kavitasyon gözlenmeye başlar. Sonrasında osmotik olarak sürdürülen suyun pasif transportu ve bazı iyonların birikimiyle, giderek genişleyen hücrelerarası boşlukların birleşmesiyle blastosel oluşur. 4-5. günde 30-200 hücreli embriyoya ulaşır ve blastokist (preimplantasyon embriyosu) adı verilir. Blastokistte, uyuyan 500 üzerinde gen eksprese olup transkripsiyon başlar [115]. Blastokist yapısının dış kısmını, ince, plasental yapıların kaynağını oluşturan trofoblastlar (trofoektoderm) ve iç kısmını da embriyonik yapıların kaynağını oluşturan embriyoblastlar oluşturur [68, 117] (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Blastokist (4.-5.gün)

Fertilizasyondan sonraki yaklaşık 5.gün veya 5.günün sonunda aktive blastokistin zona pellusidası, blastokistten salınan sytripsin ve endometriumdan salınan triptaz ve benzeri proteolitik enzimler ile genellikle anembriyonik polden lizise uğrayarak yırtılır ve blastokist hatching (kabuğundan çıkma) oluşur, ovulasyon sonrası 5.-7. günler arasında implantasyondan hemen önce gerçekleşir [68] (Şekil 2.6). Sonrasında embriyo implantasyona hazır hale gelir. Bazen de hatching öncesinde veya sırasında trofoblastların zonal penetrasyonları ile stoplazmik projeksiyonlar ortaya çıkabilir [68].



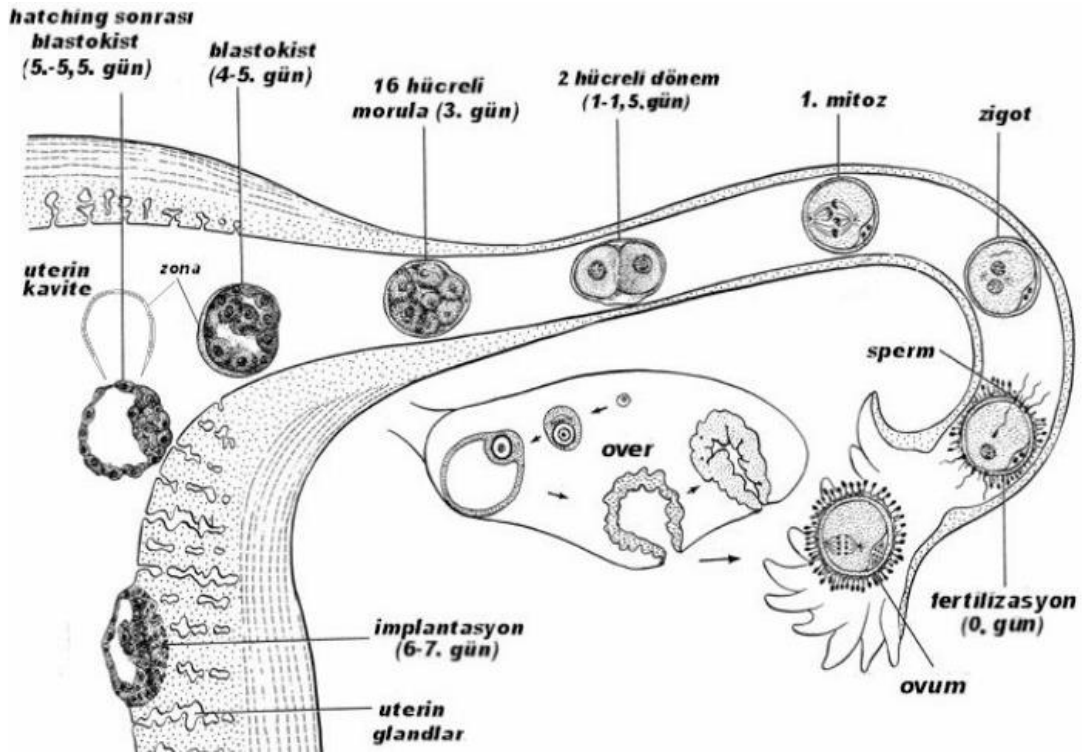
**Şekil 2.6.** Blastokist hatching, 5-5,5. gün

Reseptif bir endometrium oluşması için, endometrium kendini implantasyona hazır hale getirir. Öncesinde östrojene maruz kalmış proliferatif endometrium, ovulasyon sonrası korpus luteumdan salınan progesterona bağlı olarak epitel hücrelerince glandüler sekretuar transformasyonuna değişir. Sekretuar transformasyon, midluteal fazda alınan biyopsinin histolojik olarak incelenmesiyle de gösterilebilir. Ancak histolojik olarak normal olan endometrial biyopsi, fonksiyonel ve reseptivitenin normal olup olmadığını göstermemektedir. Devamlı östrojen varlığına rağmen preovulatar dönemde sabit olan (5-6 mm) endometrial kalınlık, progesteron etkisiyle birlikte ovulasyondan 3 gün sonra epitelyal proliferasyonu durur. Karakteristik endometrial hücre farklılaşması ve immün hücre infiltrasyonu olur [118]. Stromal elemanlar ise büyümeye devam eder. Böylece bezlerde ve spiral damarlarda intussepsiyon ve sıkı-sarmal yapılanmalar ile anjiogenez ve vasküler remodeling; kıvrılmalar ve ödem oluşur [119]. Glandüler hücrelerden kaviteye sekresyon (glikoprotein ve peptidlerin) başlar. Siklusun 17-18. günlerinde glikojen ve lipid vakuolleri intraselüler alanda oluşur ve intralümineral alana ilerler. Postovulatar 6-7.günde stromal ödem ve sekresyon en tepe noktaya gelir ve endometrium 10-14 mm kalınlığına

ulaşır. Siklusun yaklaşık 20-24.günleri arasındaki döneme implantasyon penceresi adı verilir [120, 121]. Blastokist implantasyonu ile aynı zamana denk düşmektedir [32].

### 2.2.2. İmplantasyon

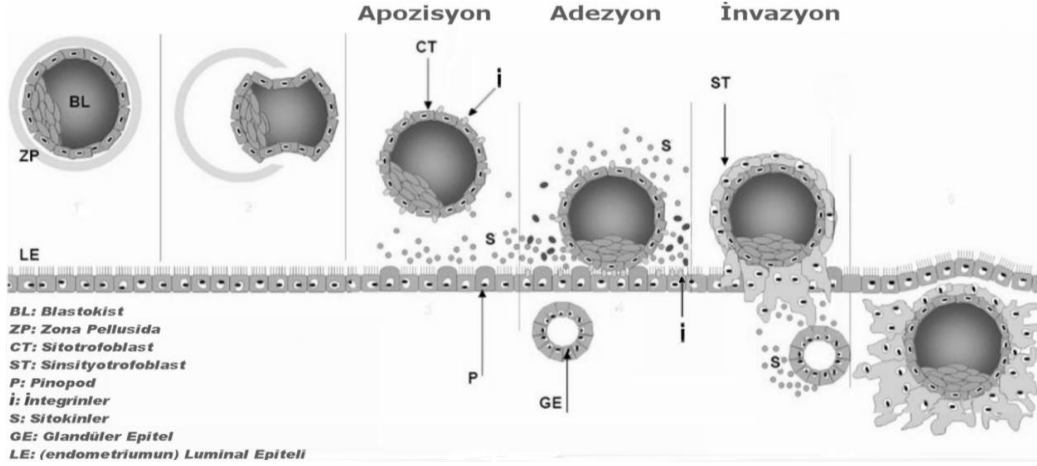
İmplantasyon, gebeliği başlatmak için düzenli bir şekilde birçok morfolojik ve moleküler değişimle birlikte oluşan reseptivite kazanmış endometrium ile blastokist durumuna ulaşmış embriyo arasındaki iletişim ile sağlanır. Endometrium ve blastokist arasındaki etkileşim henüz çok az anlaşılabilmiştir. Ovulasyondan 3-4 gün sonra, siklusun 18. veya 19.günü, döllenmiş oosit uterusu girdikten 2-3 gün, fertilizasyondan 7-8 gün sonra başlar [122] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İmplantasyon

Genellikle implantasyon sahası olan endometrial kavitenin üst-arka duvarına parakrin sinyallerle gelen blastokist; embriyonik kutbundan (embriyoblastlara yakın bölgesi) desidual (orta-geç sekretuar endometrial) epitele tutunur. Embriyonik kutup üzerindeki trofoblastlar, salgıladıkları proteolitik enzimlerle desidual epitel hücreler arasından penetre olmaya başlarlar. Sonrasında embriyo bazal membrana doğru inerek, stromaya invaze olur [121]. İmplantasyon 3 aşamada gerçekleşir [122] (Şekil 2.8);

- 1) **Apozisyon** (hazırlık): Blastokistin embriyonik kutbuyla endometriuma teması
- 2) **Adezyon**: Blastokistin endometriuma yapışması
- 3) **İnvazyon**: Gömülme süreci



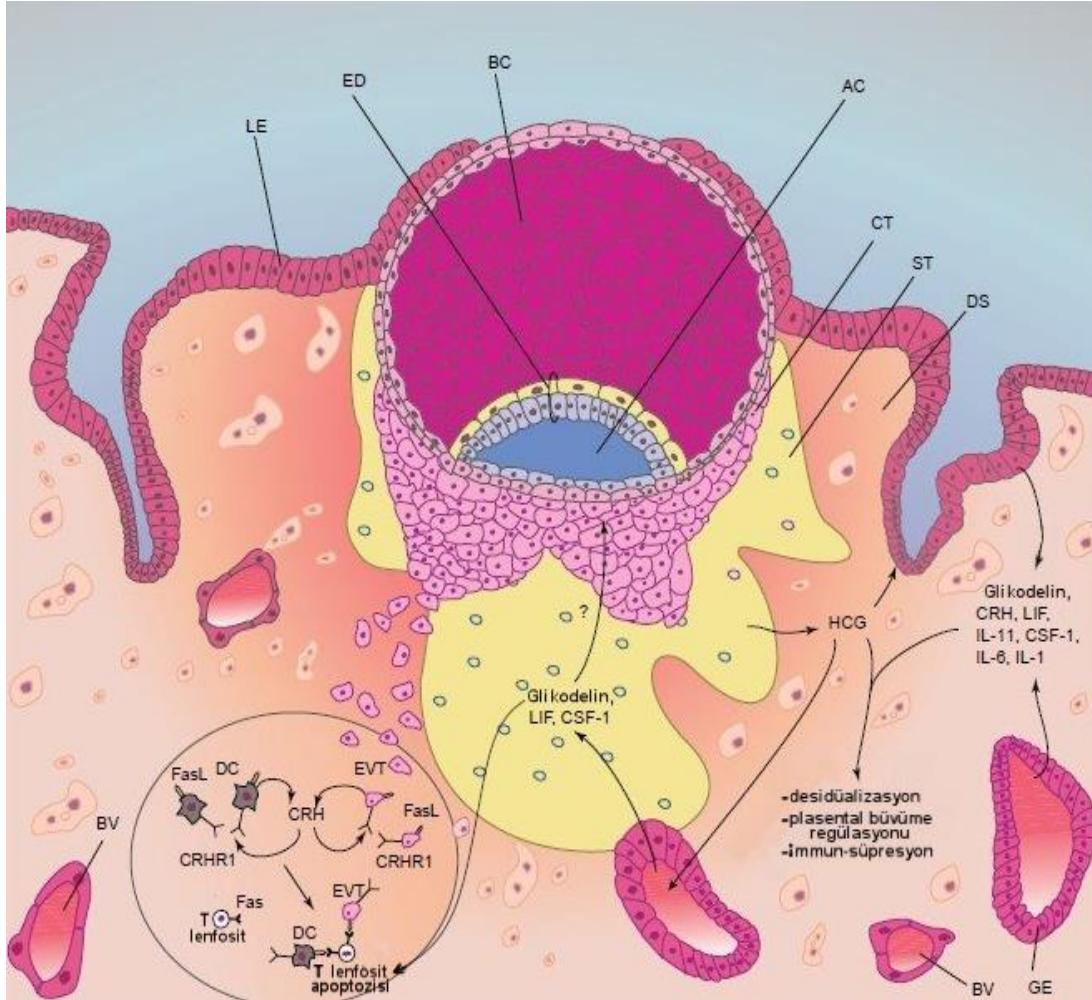
**Şekil 2.8.** İmplantasyon aşamaları

İmplantasyon morula uterin kaviteden girdikten 2-4 gün sonra, blastokistin uterin epitele apozisyonu ve adezyonu ile başlar. Bu süreç ekstraselüler bileşenlerle etkileşen sitokinler ve adezyon molekülleri (integrinler), özellikle laminin ve fibronektin ile düzenlenir.

İmplantasyon için embriyo yüzeyinin matürasyonunun olması gerektiği gibi uterin sıvı hormonal-protein içeriğinin de uygun olması ve doğru sinyallerin de üretilmesi gerekir. Sitokinler, büyüme faktörleri ve reseptörleri ilişkili blastokist trofoblastlarının desidual hücrelere teması sonrası membranlar arasında junctional kompleksler oluşur. Sonra integrinler ve selektinler gibi adezyon molekülleri, salgılanan enzimler ve ekstraselüler-interselüler matriks komponentleri üzerinden blastokistin adezyonu ve invazyonu başlar.

Trofoblastlar sinsityo ve sito-trofoblastlara farklılaşırken, embriyoblastlar da epi ve hipoblastlara farklılaşır. Trofoblastlar enzimlerin desteğiyle ve hareketleriyle, yer yer epitel altına ve bazal membran arasına girerek, yer yer epitel hücrelerine füzyon ile; bazen de fagositoz ile invaze olmaya başlar. Ayrıca desidual hücreler kontak inhibisyonla da trofoblastlardan uzaklaşırlar [32]. Maternal damar invazyonu spiral arter duvarları yıkılarak endovasküler trofoblastlar ile sinüzoidal sak oluşması şeklinde sağlanarak; ovulasyonun 14.gününde plasenta oluşmaya başlar [123]. Büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimlerin teşvik edici ve kısıtlayıcı etkilerinin dengelenmesiyle de; trofoblastik invazyon sınırlandırılarak kontrol altında tutulmuş olur [124].

Bütün bu implantasyon öncesi ve implantasyon aşamaları, desidua ile embriyo arasında, çözünür büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, reseptörler, hormonlar, adezyon molekülleri, enzimler, ekstraselüler matriks proteinleri, peptidler, lipidler, prostoglandinler ve immunolojik faktörleri kapsayan ve endometrial reseptiviteyi oluşturan çok hassas bir denge ve kompleks bir diyalog [125] çerçevesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.9).



AC: Amniotik Kavite, BC: Blastokist Kavitesi, BV: Kan Damarı, CRH: Kortikotropin Serbestleştirici Hormon, CRHR1: CRH Reseptör tip-1, DC: Desidual Hücre, DS: Desidualize Stroma, ED: Embriyonik Disk, EVT: İnvazif Ekstravillöz Trofoblast, FasL: Proapoptotik Fas Ligandı

**Şekil 2.9.** İmplantasyon embriyo-endometrium diyalogu [126]

### 2.2.3. Endometrial Reseptivite Penceresi Ve Reseptivite (İmplantasyon) Belirteçleri

Endometrial reseptivite penceresi 28 günlük normal bir siklusun 19-24. günleri arasındadır [120, 127]. Ovulasyondan 6 gün sonra endometriyum implantasyon için reseptif hale gelir ve yaklaşık 4 gün reseptif kalır [128].

Allen ve arkadaşlarının bir çalışmasında ovulasyon sonrası 8.,9. ve 10.günlerde idrarda hCG (İnsan Koryonik Gonadotropini) saptanması ile implantasyonların %84'ünün gerçekleştiği bir reseptif fazın varlığı (implantasyon penceresi) gösterilmiştir. Bu çalışmada idrar hCG'si en erken 6. ve en geç de 12. günlerde saptanmış olup; daha geç saptanan hastaların erken gebelik kayıplarında anlamlı bir artış olduğu belirtilmiştir [128].

Endometrial reseptivite, progesteron etkisi altındaki luminal epitel hücrelerinin apikal mikrovillilerinin düzleşerek, reseptivite penceresi boyunca oluşup sonra kaybolan küçük çıkıntılar olan pinopodlar tarafından sağlanmaktadır [129]. Doğal menstruel siklusun 20-21. günlerinden sonra ovulasyon sonrası 5.-7. günlerde sadece 2-3 gün gözlenir. Pinopodlar trofoblast hücrelerinin endometriyumun reseptif lüminal epiteline yapıştığı yerden, yani implantasyon sahasında gözlenirler ve implantasyon penceresinin açıldığının morfolojik olarak belirteçidir [130]. Progesteron ve HOXA10 geni ekspresyonu pinopod oluşumundan sorumludur. Pinopodların, implantasyonda kritik bir öneme sahip olan LIF salınımını sağladıkları düşünülmektedir [83]. Pinopodlar, implantasyon bölgesindeki endometrial kavitenin sıvı konsantrasyonunu etkiler, gerekirse bir miktar absorbe ederek blastokistin adezyon ve invazyon süreçlerine yardımcı olur [131].

İmplantasyon penceresi boyunca temel hormon olan progesteron, genellikle stromal komponentte bulunan PR-B (progesteron reseptör-B) üzerinden etki gösterir [118]. Aynı zamanda pinopod oluşumu uyarır, desidua oluşumunu sağlar, endometrial glandların sekreter etkisini oluşturur, immun sistem üzerine etkisi vardır [132]. Proliferatif fazda integrinler üzerine negatif etkili  $\beta$ -östrojen reseptörleri, luteal faz progesteron artışı ile azaltılmış olur [133].

Desidualizasyon sırasında yassı stromal fibroblastlar genişler ve farklılaşır. Desidualize stromal hücreler, fibronektin yapar. Ekstraselüler matrikste Tip 4 kollajen, heparan proteoglikan, fibronektin ve laminin oluşur. Stromal hücre desidualizasyonu ile birlikte prolaktin (PRL), doku faktörü ve IGFBP-1 (insulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1) gibi desidual proteinlerin salgılanması ve sentezi de olur [134]. Uterin glandlarda sekreter değişiklikler, vasküler permeabilitede artış ve uterin NK hücre akını gözlenir. Desidualizasyon aynı zamanda trofoblast invazyonunu sınırlandırır. Bunu,



trofoblastların invazivleşmesini fiziksel bariyer olmuş olarak, aynı zamanda lokal sitokin üretimi ile engeller. Desidual reaksiyonla embriyo için maternal antikordardan koruyan bir ortam oluşturulmuş olur.

Desidualizasyonun ilk morfolojik bulgusu en erken menstruel siklusun 23.gününde, LH pikinden 10 gün sonra, blastokistin implante olduğu alanda stromal vasküler permeabilitede lokalize artıştır [135].

Fertilizasyon sonrası endometriumda midluteal fazda implantasyon öncesi olan değişim; fekdasyon olmayan sikluslarda olmamaktadır [136, 137]. Hormonal gereksinim açısından primatlarla yapılan çalışmalarda implantasyon için östrojen gerekmemekte; sadece progesteron yeterli olmaktadır [138]. İnsanda ise desidualizasyon için fertilizasyon sonrası overlerden salınan östrojen ve progesteron kombinasyonu kritiktir.

Gebeliğin devamı için maternal immun sistemin endometriuma implante olacak olan embriyoya tolerans göstermesi gerekmektedir. Blastokist implante olabilmek için endometriumda hasar oluşturur. Trofoblastlar endotelin ve maternal kan damarlarının yerini alır ve salgıladıkları kemokinler ile immun hücrelerin implantasyon alanına gelmesini sağlarlar. İmplantasyon alanında lökositlerin %70'ni NK (doğal katil), %10-20'sini makrofaj ve %2-4'ünü dentritik hücreler oluşturulur ve ayrıca az miktarda T hücreleri de bulunmaktadır [135]. İmmun modülasyonla CD4/CD8 oranı tersine döner, B hücre fonksiyonlarını, T hücrelerinin antikor bağımlı hücrel sitotoksitelerini ve greft reaksiyonunu baskılar [139]. HLA-G proteinin ekspresyonun fazla olduğu embriyolarda bölünme hızının fazla olduğu, implantasyon ve başarılı gebelik şansını arttırdığı gösterilmiştir [140]. Desiduadaki NK hücrelerde yer alan KIR (Katil Hücre İmmunoglobulin benzeri Reseptör) ve CD94/NK62 reseptörleri trofoblastlardaki HLA-G'yi tanıma yeteneğine sahiptir. Trofoblastlardaki HLA-G molekülü, NK hücrelerinin ve T lenfositlerinin sitotoksik fonksiyonlarını azaltır, sitokin ekspresyonunu regüle eder, ayrıca CD4+ T-helper hücrelerin aktivasyonunda rol alır [141].

Uterin NK hücreleri implantasyon için kritik olan LIF, G-CSF ve GM-CSF salgılanmasıyla görevlidir. NK hücreleri salgıladıkları anjiogenik faktörler ile desidualizasyonda ve spiral arterlerin yeniden yapılanmasında rol oynar [142]. Uterin dentritik hücrelerin görevi tam olarak açığa kavuşturulamamıştır, fakat gebeliğin sonuna kadar desiduada bulunur [143].

Morfolojik değişikliklerden ayrı olarak, son zamanlarda luteal fazın değişik evrelerini gösteren pek çok moleküler belirteç tanımlanmıştır, bu implantasyon

penceresinde salgılanan faktörlere reseptivite (implantasyon) belirteçleri denilmektedir (Tablo 2.3) [118, 144-146].

**Tablo 2.3.** İmplantasyon Belirteçleri [118, 144-146]

Glikoproteinler, Proteinler, Lipidler	Sitokinler, Hormonlar, GAG	Büyüme Faktör-leri	Adezyon molekülleri, Reseptörler	Pinopodlar, Enzimler	Genler (up-regüle olanlar, down-regüle olanlar)
Glikodelin	M-CSF (CSF-1)	HB-EGF	İntegrinler $\alpha\beta3$ , $\alpha\beta1$ , $\alpha4\beta1$	Pinopodlar	PAEP geni
MUC-1	LIF	TGF- $\alpha,\beta$	L-selektin		HOXA10,11 geni
Laminin (LAM)	IL-1 $\alpha,\beta,6,11,15$	IGFBP-1	E-kaderin	MMP-2,9	DKK1 geni
Fibronektin	TNF- $\alpha$	IGF-1,2	ICAM-1 (CD54)	TIMP-1	DAF CD55 geni
GLUT-1	İnterferon- $\gamma$ (inf- $\gamma$ )	VEGF		Histon deasetilaz inhibitörü	Osteopontin (SPP1) geni
Amphiregülin	PAF	EGF	Osteopontin	COX-1,2	GADD45 geni
Galektin-1,3,9	Progesteron	PDGF	HER -1,4	Katepsin	APO-D,E genleri
O-glikozile proteinler	Prolaktin	FGF	CXCR-1 reseptörü	Glutaredoksin	MAOA geni
Ephrin peptidleri	CRH	KGF	Progesteron reseptörü-B	PAI	MAP3K5 geni
$\alpha$ -SMA	hCG	EPF	LIF reseptörü		IL-15 geni
Doku Faktörü	Kalsitonin		Gp-130 reseptörü		C4PBA geni
Prostaglandin E2	Leptinler		Fibronektin reseptörü		EFNA1 (Ephrin A1) geni
Tromboksanlar	Hyaluronan		LAM-2,4 reseptörü		CLDN4 geni
			IL-1Rt1		TCN1 geni
			CRHR-1 reseptörü		LAM $\beta3$ geni
					COMP geni
					S100P geni
					GAST geni
					CP geni
					PLA2G2A geni
					GZMA geni
					GNYL geni
					GGTL2 geni
					XCL2 geni
					KIAA0367 geni
					DYNLT3 geni
					CRSP2 geni
					CRABP2 geni
					MSX2 geni
					SFRP4geni
					MMP7 geni
					OLFM1 geni

APO: Apolipoprotein, CD: Kompleman, CLDN4: Klaudin 4, (CPE reseptörü), COMP: Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini, CP: Serüloplazmin (ferroksidaz), CRABP2: Hücrel Retinoik Asid Bağlayıcı Protein-2, CSRP: Sistein ve Glisinden Zengin Protein-2, C4BPA: Kompleman Komponent-4 Bağlayıcı Protein, DAF: Kompleman bozucu faktör, DKK1: Dickkopf homologu-1(Xenopus laevis), DYNLT3: Dynein hafif zincirli Tctex-tip 3, EPF: Erken Gebelik Faktörü, FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü, GADD45A: Büyüme Durması ve DNA-hasar-indükleyicisi- $\alpha$ , GAG: Glikozaminoglikan, GAST: Gastrin, GBP2: Guanilat Bağlayıcı Protein-2 (interferonla-indüklenebilen), GGTL2: Gamma-glutamilttransferaz-benzeri protein-2, GLUT: membran Glukoz Taşıyıcıları, GNYL: Granülizin, GZMA: Granzim A(1) (sitotoksik T-lenfosit-ilişkili serin esteraz-3), hCG: human Koryonik Gonadotropin, HER: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, ICAM: İnterselüler Adezyon Molekülleri, IL1-Rt1: İnterlökin-1 Reseptör tip-1, KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü, MMP: Matriks Metalloproteinaz, MMP7: Matrilysin, MSX2: Msh homeobox 2, OLFM1: Olfaktomedin-1, PAEP: Progesteron-ilişkili Endometrial Protein (PP-14, Glikodelin), PAF: Platelet Aktive-edici Faktör, PAI: Plazminojen Aktivatörü İnhibitörü, PDGF: Platelet-kaynaklı Büyüme Faktörü, PG: Prostaglandin, PLA2G2A: Fosfolipaz A2 grup IIA, SFRP4: Salgılanmış Kıvrılma-ilişkili Protein 4, SPP1: Salgılanmış Fosfoprotein 1 (osteopontin), S100P: S100 kalsiyum bağlayıcı Protein, TCN1: Transkobalamin-I, TGF: Transforme-edici Büyüme Faktörü, TIMP: Metalloproteinaz Doku İnhibitörü, TNF: Tümör Nekroz Faktör, VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, XCL2: Kemokin (C motif) ligand 2,  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin.

Fertilizasyon sonrası ilk 6-24 saat içinde maternal serumda, bir otokrin büyüme faktörü ve immunsupresan olan Erken Gebelik Faktörü (EPF) (chaperonin-10 homologu) saptanmıştır [147]. İmplantasyon öncesi overlerden, muhtemelen embriyo kaynaklı bir sinyale sekonder olarak üretilirken, implantasyondan sonra ise embriyo tarafından üretilmektedir. Blastokist üzerinde büyümeyi ve zona hatchingi başlatan EGF için de reseptörler bulunur.

hCG trofoblastlar tarafından üretilir, embriyodan en erken salınan moleküldür. Embriyonun lüminal epitelyal hücrelere implantasyonu sonrası 3.günde, postovuluar 9-12.günde maternal dolaşımında saptanabilir [148]. 6-8 hücreli embriyolarda fertilizasyondan 2 gün sonra  $\beta$ -hCG RNA transkripsiyonu tespit edilmiştir [149]. Fertilizasyonun 8. gününde de in vitro hCG saptanmıştır [150]. Korpus luteumun varlığının devamında, progesteron üretiminin stimülasyonunda, embriyo implantasyonda, anjiogenezde, trofoblast diferansiasyonunda, desidualizasyon ve maternal-fetal immün ilişkide görev alır [151]. Primatlarda anti-hCG serumu ile erken haftalarda abortus gözlenmiştir [152]. hCG artışı ile birlikte matriks yıkımında anahtar rolü olan MMP-9'un (matriks metalloproteinaz-9), LIF, M-CSF gibi implantasyon markerlarının artışı, VEGF ve siklooksijenaz-2 yapımına, IL-6 yapımının azalmasına neden olur [153]. Myometrial düz kas hücrelerinin proliferasyonu, kontraktibilitesi, gap junctionların ve intraselüler kalsiyumun regülasyonu progesteron artımı yoluyla hCG tarafından azaltılır [148]. Aynı zamanda hCG'nin, invazyonun sınırlandırılması amacıyla proteaz inhibisyonu özelliği de vardır [154].

LIF tüm uterusu, östrojen etkisi altında salgılanır [155, 156]. Menstruasyonun sekretuar fazında LIF mRNA üretimi çok fazla olması nedeniyle endometrial reseptivite ile ilişkili olduğu düşünülür. Progesteron birçok sitokin regüle ettiği gibi, LIF sekresyonunu da regüle eder. Blastokistin büyümesi, viabilitesi ve hatching sürecini kontrol eder [155]. Reseptif lüminal epitelyal hücrelerde polarite kaybında rol alır. Aynı zamanda desidual lökositlerle trofoblastlar arasındaki ilişkide de görevlidir. Endometriumdan salınan diğer bazı sitokinlerden M-CSF veya LIF gen mutasyonuna sahip farelerde de implantasyon başarısızlığı gösterilmiştir [157].

HBEGF, transmembran proteinidir ve endometriumun stromal ve epitelyal hücrelerinde sentezlenir. Blastokistten gelen sinyallere karşılık, yüzey epitelinin HBEGF ekspresyonu ile blastokist etrafındaki kapiller permeabilite artar [158]. Aynı zamanda endometrial hücre artışı, apoptozun engellenmesi, trofoblast invazyonunun indüksiyonu, desidual transformasyonun regülasyonundan sorumludur [159].

IGF-1 ve 2, kendi reseptörleri üzerinden mitojeni ve diferansiasyonu yürüten büyüme faktörleridir. Embriyonun iç ve dış katmanlarındaki hücre sayılarını, gelişimi ve kalitesini artırır. İmplantasyonda ekstravillöz trofoblastik hücrelerin migrasyonunu artırır [159].

Progesteron tarafından CRH üretimi indüklenir ve endometrial glandlar özellikle sekretuar fazda yüksek kontrasyonda CRH içerir. CRH stromal desidualizasyonu uyarır [160]. CRH, invaziv ekstravillöz trofoblastlar (EVT) ve desidual hücrelerde proapoptotik Fas ligand (FasL) ekspresyonunu indükler ve maternal T hücrelerinin apoptozini artırır [126]. İnflamatuar cevabın benzeri şekilde, implantasyona eşlik eden doku cevabı tarafından implantasyon bölgesinde blastokistler ve sekretuar endometrium tarafından salgılanan özellikle immunsupresif etkileri de olan PGE<sub>2</sub> düzeylerinde de artış saptanmıştır [161, 162].

Endometrial reseptivitede rol alan transkripsiyon faktörlerinden HOXA10 ve 11 endometrial epitelyal ve stromal hücrelerinden salınır [163]. Farelerde uterin stromal hücrelerde HOXA10 yetmezliğinde desidualizasyon defekti gözlenir [164]. İmplantasyon penceresinde görev alan çok sayıda molekül ve yapıları (pinopodlar, LIF, integrinler, IGFBP1 gibi) regüle eder.

MUC-1 blastokistten salınan selektinler için ligand görevi görür. İnsan blastokisti apozisyon fazında östrojen ve progesteron hormonların da etkisiyle endometrial MUC-1'i artırırken; adezyon fazında ise endometrial anti-adhezif gibi etki gösteren MUC-1'i implantasyon bölgesinden temizlemesi gerekir [165].

Endometriumdan ve blastokistlerden salınan bir sitokin olan IL-1 ile endometriumdan pek çok molekülün salınımı düzenlenir. Bunlar IL-6 ve 8, LIF, TNF- $\alpha$ , COX-2, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , EP1, MMP-1 ve 9, TIMP-1 ve 3 sayılabilir [157]. IL-1, implantasyon markerı olan endometrial  $\beta$ 3-integrin up regülasyonu meydana geldiği in-vitro olarak gösterilmiştir [166]. Farelerde IL-1 blokajı implantasyonu engellemektedir [167].

Lateral lüminal epitelyum membranları adezyon moleküllerinden zengindir. Elektron mikroskop araştırmalarıyla membran-membran etkileşiminin trofoektoderm ile endometrial hücrelerin lateral yüzeyleri arasında olduğunu göstermiştir [168]. Hücre-hücre, hücre-matrix bağlantıları hücre yüzey adezyon molekülleri tarafından olur. Desidualize endometrium ve embriyo, adezyon moleküllerine (kadherinler, selektinler, integrinler, immunglobulinler) aracılık eden laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini eksprese eder [123]. Laminin ve fibronektinlerin integrinlere

bağlanmasıyla hücrel sinyal yolları aktive olur, enzimleri aktive eder, hücrel gen transkripsiyonuyla birlikte adezyon başlar. Bu aşamada integrinler blastokist klivaj gelişimi ve embriyonik adezyonun başlatılmasında rol alır [168]. Özellikle implantasyon penceresinde pik yapan  $\alpha4\beta1$  ve  $\alpha v\beta3$  endometrial integrinleri [169] ve trofoblast yüzeyinden eksprese olan integrinler çok önemlidir [170]. Fertil kadınlarda  $\beta3$  alt ünitesi 19.günden önce artış göstermez, bundan dolayı blastokistin endometrial reseptörü olduğu düşünülür [171].

Desidual büyüme uyarımı, proliferasyonu veya inhibisyonu, trofoblast invazyonu aktivasyonu veya engellenmesi aşamaları integrinlerin farklı subgrupları ekspresyonları ile sağlanır [172]. İnvazyon aşamasındaki integrin ekspresyonu trofoblastik IGF-2 ve desidual IGFBP-1 ile aktive olurken; desidual TGF- $\beta$  ile de inhibe edilir [173]. TGF- $\beta$  ayrıca sitotrofoblastların non-invazif sınırsız trofoblastlara farklılaşmasına da etki eder. IGFBP-1 integrin reseptörleri ve aktive kinaz yoluyla invazyonu uyarır [174]. İmplantasyon penceresi sırasında integrin ekspresyonu noksanlığı infertiliteye neden olabilir [175]. Trofoblast invazyonu sırasında bağlayıcı laminin 2 ve 4 izoformları içeren reseptörlerin desiduada arttığı gösterilmiştir [176].

Trofoblastlardan ekspere olan integrin, endometrium ESM'de (ekstraselüler matriks) fibronektini, laminin ve kollajene bağlanır ve trofoblastlar fibronektinden zengin ESM içinde ilerler [177]. Desidual hücreler laminin üretirler ve trofoblastların invazyonunda trofoblast-desidual hücre etkileşimi, laminin-laminin reseptör bağlanması ile ilişkilidir [177]. İnvazyon evresinde, ESM'yi parçalayacak olan proteazlar, adezyon sonrası integrin aracılı olarak aktive olur ve salınır. Bunlar serin proteaz, katapsin ve matriks metalloproteinazlardan kollajenaz, jelatinaz ve stromelizinlerdir [178].

MMP'lar, metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) tarafından inhibe edilirler [179]. İnsan implantasyonunda ekstravillöz trofoblasttan, maternal dokuların degradasyonunu sağlamak için MMP sentezlenir [180]. MMP ve TIMP arasında hassas bir denge vardır. Trofoblastik invazyonu sınırlayan desidual moleküllerden birisi de TGF- $\beta$  dır. TIMP yapımını arttırarak trofoblastların kendisini invazyonunu kontrol altında tutar. Progesteron ve hCG MMP-9'u baskılar ve invazyonun düzenlenmesinde görev alır [181]. Böylece invazyon myometriumun 1/3' ünü geçemez. Sitokinler ve büyüme faktörleri ile düzenlenen desidual major ürün PAI-1 (Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1) ile de trofoblastik invazyon kısıtlanır. Trofoblast göçünü takiben maternal vasküler invazyon serin proteazlar, MMP ile ve sitokinleri de içeren inflamatuvar sinyallerle uyarılan selektinler sayesinde olur [123]. Yüzey molekülleri olan selektinler, sadece implantasyon alanındaki desidual

vasküler endotel hücrelerde görülürler. Fertilizasyon ve implantasyon basamaklarında daha henüz açıklığa kavuşmamış çok fazla karmaşık, yalnız uyum içinde çalışan birçok faktör vardır.

### **2.3. Yardımlı Üreme Tekniklerinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı**

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının tanımı 40 yaşın altında, 4'ten az sayıda kaliteli embriyo transferi yapılmış en az 3 fresh veya frozen siklusta başarısızlıktır [83]. Bu konuyla ilgili birçok yayın olmasına rağmen henüz kesin olarak kabul edilmiş bir tanım yoktur. Klinik açıdan bakıldığında implantasyon başarısızlığı iki farklı durumda değerlendirilir. İmplantasyon olduğuna dair herhangi bir kanıt (hCG üretimi) yoktur veya saptanabilir hCG vardır, fakat ultrasonografik olarak gebelik kesesi gözlenmez.

İmplantasyon başarısızlığı, embriyo veya endometriumda bulunan faktörlerin bir sonucu olabilir. Bunlar; maternal yaş, oosit ve embriyo kalitesi, immunolojik faktörler, endometrial reseptivite, luteal faz defektleri, uterin, tubal, peritoneal faktörler, uygulanan stimülasyon protokolü ve embriyo kültür medyumları [4] şeklindedir (Tablo 2.4).

Etyolojik faktörlere ve yönetimine yönelik araştırmalar yapılmaya devam edilmektedir. Her ne kadar bazı tedavilerin yararlı olduğu bildirildiyse de, diğer bazı tedaviler için henüz yeterli kanıt ve fikir birliği yoktur (Tablo 2.4).

**Tablo 2.4.** IVF’de İmplantasyon başarısızlığında etiyolojik faktörler ve yönetimi [4]

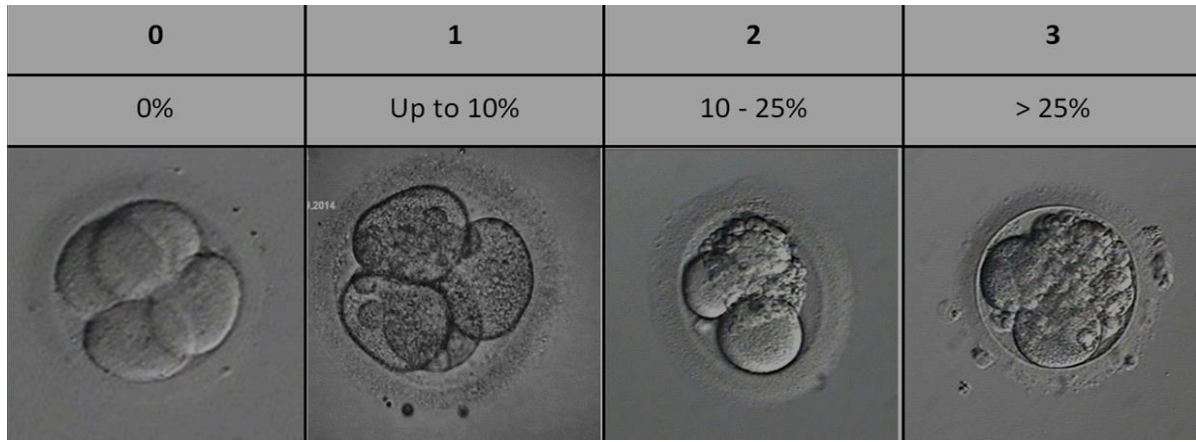
Etyoloji	Faktörler	Tedavi
Maternal yaş, oosit ve embriyo kalitesi	Kötü ovaryen rezerv ve yaş ile ilişkili kromozomal anöplidiler Parental dengeli mutasyon  PKOS	İleri yaşta yumurta ya da embriyo bağıışı (i) KOH protokolü modifikasyonları Preimplantasyon anöplid taraması ve blastokist transferi (ii) Preimplantasyon anöplid taraması olmaksızın blastokist kültürü (ii) Asiste hatching (iii) İnsülin direnci olan PKOS’lu hastalarda Metformin tedavisi (i)
İmmunolojik faktörler	Antifosfolipid antikorlar, Trombofili Otoimmün hastalıklar Endometrial sitokinlerin ve NK lenfositlerin anormal ekspresyonu Paylaşılmış parental HLA	Heparin ya da aspirin tedavisi (iii) Steroid tedavisi (iii)  İntravenöz immunoterapi (iii)
Endometrial reseptivite	Endometrial östrojen ve progesteron reseptörlerinin anormal ekspresyonu Endometrial markerların (integrin, pinopod v.s) anormal ekspresyonu Luteal faz defektleri	KOH protokolü modifikasyonları (i)
Uterin, tubal ve peritoneal faktörler	Endometrial polipler ve submüköz myomlar İntramural myomlar  Hidrosalpinks Endometriozis  Enfeksiyon	Histeroskopik polipektomi (ii) Histeroskopik submüköz myomektomi (ii) İntramural myomektomi (5 cm’den küçük olsa bile) (ii) Unilateral ya da bilateral salpenjektomi (i) Minimal ve orta derecede endometriozisin cerrahi tedavisi (ii) Uterin sineşilerin histeroskopik adezyolizisi (ii) Tekrarlayan IVF başarısızlığı sonrası rutin diagnostik histeroskopi (ii)
Stimülasyon protokolleri ve kültür ortamı		KOH protokolü modifikasyonları Ko-kültür Asiste hatching (iii)

(i): Kanıtlanmış yararı olan müdahaleler, (ii): Olası yararları olan müdahaleler, (iii): Yararı kanıtlanamamış müdahaleler, KOH: Kontrollü Ovaryen Stimülasyon

Embriyonik faktörler, implantasyonun ve gebeliğin meydana gelip gelmeyeceğini belirleyen temel faktörlerdendir [182]. Embriyo transferi için embriyoları seçerken mikroskopik olarak değerlendirilmiş morfolojik kriterler yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.5).

**Tablo 2.5.** Bölünme aşamasındaki embriyolarda ESHRE tarafından 2011’de embriyo skorlama sistemi oluşturulmuştur [183].

Grade	Blastomer	Fragmantasyon	Multinükleasyon
Grade 1 embriyo	2.günde 4, 3.günde 8 blastomerli ve boyutları eşit	%10’nun altında	Yok
Grade 2 embriyo	2.günde 4, 3.günde 8 blastomerli ve boyutları eşit	% 10-25	Yok
Grade 3 embriyo	Blastomer sayısı az	%25’in üzerinde	Var



**Şekil 2.10.** Embriyo skorlaması

IVF’de başarı şansını arttırmak için, implantasyon potansiyeli yüksek yani gelişmesi devam eden, eşit büyüklükte düzenli blastomerlere sahip ve fragman içermeyen embriyoları transfer etmek gerekir.

İnce endometrium tedavisinde uterin kan akımını artırarak, endometrium gelişiminde düşük doz aspirin [184] ve vajinal sildenafil [185] önerilir. İnce endometriumu olan vakalarda vajinal mikronize östrojen [186], antifibrotik pentoksifillin veya yüksek doz vitamin E [187] tedavisiyle gebelik oranlarının arttığı gösterilmiştir.

Tekrarlayan IVF başarısızlıklarında, önceki siklusun luteal fazında yapılan endometriyal uyarı veya histeroskopik biyopsiyle oluşan lokal travma ile psödo-desidual reaksiyona neden olarak implantasyonu geliştirilir. Aynı zamanda büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile endometriyal reseptivitenin arttığı düşüncesiyle yapılan çalışmalarda gebelik ve implantasyon oranlarında anlamlı bir yükselme bildirilmiştir [188, 189].



Antifosfolipid sendromu persistan negatif yüklü fosfolipid ve fosfolipid-protein komplekslerine karşı anti-kardiyolipin IgM, IgG, lupus antikoagulanı gibi antikolar gelişimi ile oluştuğu düşünülen ve arteriovenöz tromboemboliler, tekrarlayan düşüklerle karakterize otoimmün sistemik bir hastalıktır [32]. Birçok klinisyen, Antifosfolipid antikolar ve trombofililer ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında net bir ilişki mevcut olduğunu ve düşük doz aspirin, düşük moleküllü heparin tedavisi ile gebelik kayıplarını azaltılabileceğini düşünür [190-192]. Yalnız implantasyon başarısızlıkları konusunda ise heparin ve aspirin uygulamasının sonucu iyileştireceğine dair yeterli kanıt bulunamamıştır [193].

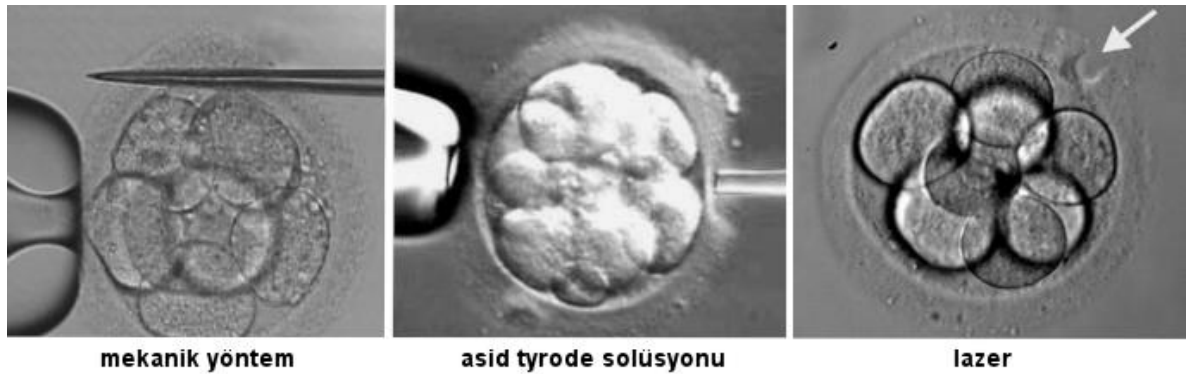
Fakat heparinin non-antikoagulan etkileriyle implantasyonu arttırabileceği ve 14 gün üzerinde kullanıldığında da gebelik oranlarını arttırabileceği öne sürülmüştür [194]. Bir başka çalışmada, trombofili ve tekrarlayan IVF başarısızlığı ile ilgisi araştırılmış. Faktör 5 Leiden, metiltetrahidrofolat redüktaz mutasyonu ve protrombin gen mutasyonları IVF'te embriyo transferinde implantasyon başarısızlığında önemli bir rolü olmadığı sonucuna varılmıştır [195].

Blastokist transferi, tekrarlayan implantasyon başarısızlığında kullanılabilecek bir yöntemdir. Günümüzde kullanılan ardışık seri mediumlarla embriyolar 5.güne kadar laboratuvar koşullarında takip edilerek yeterli sayıda blastokist elde edilebilmektedir [196]. Elde edilen embriyolar pronükleer fazdan blastokist aşamasına kadar herhangi bir dönemde transfer edilebilir. En sık tercih edilen transfer zamanı embriyo gelişiminin 3.günüdür. Transfer günü ile klinik gebelik oranları açısından anlamlı bir fark bulunamamasına karşın, geç dönemde transferin faydası yaşayabilir olması muhtemel embriyoların seçilmesidir. Bazı araştırmacılar 3. ve 5.gün transferi arasında anlamlı bir farkın olmadığını savunurken, diğerleri implantasyon oranlarının arttığını ileri sürmektedir [197]. İyi kalitede embriyo ve tekrarlayan IVF başarısızlıkları olan hastalarda 2. gün ile 4-5. gün ardışık double embriyo transferi yapıldığında %60'lara varan gebelik oranları bildirilmiştir [198]. Blastokist transferiyle az sayıda embriyo transfer edilmesiyle yardımcı üreme tekniklerinin en önemli komplikasyonlardan biri olan çoğul gebelik ihtimali de azalmış olmaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığının Mart 2010 tarihinden itibaren geçerli olan talimatnamesi uyarınca; 35 yaşından genç olgularda tek, 35 yaş üzeri olgularda ise iki embriyo transferi yapılmalıdır [199].

Embriyonun, otolog endometrial veya granüloza hücreleri gibi bazı yardımcı hücreler ile birlikte kültüre edilmesine ko-kültür denir. Ko-kültür kullanım sonuçları ile ilgili 17 prospektif randomize çalışmanın meta-analizinde blastomer sayıları, implantasyon,

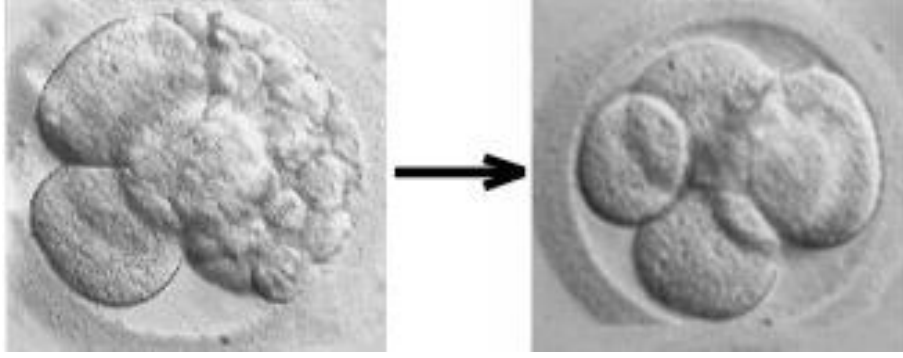
klirik ve süren gebelik oranlarının ko-kültür yapılan hasta grubunda belirgin olarak daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır [200]. Tekrarlayan IVF başarısızlığı için alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır [201]. Yalnız oosit donasyonu olan vakalar dışında gebelik ve implantasyon oranlarında henüz anlamlı bir artış ortaya koyamamıştır [202]. Ayrıca ko-kültürden biyopsi sırasında yapılan endometrial hasar ve uyarının bir sonraki siklusda yapılan IVF başarısını artırdığı tespit edilmiştir [203].

Blastokistin hatchingi, implantasyon sürecinde çok önemli bir rolü vardır; fakat zonası kalın olan embriyoların zona pellucidadan çıkmakta zorluk çektiği ve implantasyon oranlarının düştüğü gözlenmiştir [204]. Bu problemi aşmak için Assisted Hatching (AH) geliştirilerek mekanik yöntemler (asit tyrode solüsyonu, lazer yardımıyla parsiyel zona diseksiyonu) kullanılmıştır (şekil 2.11). Yalnız AH komplikasyonsuz değildir, blastomer ve embriyoya zarar verebilmekte ve embriyonun yaşayabilirliğini tehdit etmektedir [205]. Yakın zamanda yapılan iki meta-analize göre AH önermek için henüz elde yeterli kanıt bulunmamaktadır [206, 207]. Üstelik çoğul ve özellikle de monozigotik ikiz gebelik oranlarında da artış gösterilmiştir [208, 209]. Yalnız seçilmiş vakalarda kullanılması önerilir [207]. ASRM önerisine göre iki veya daha fazla başarısız IVF siklusu olan, zayıf embriyo kalitesi olan ve 38 yaşından daha yaşlı olanlar kadınlarda faydalı olabilir [206].



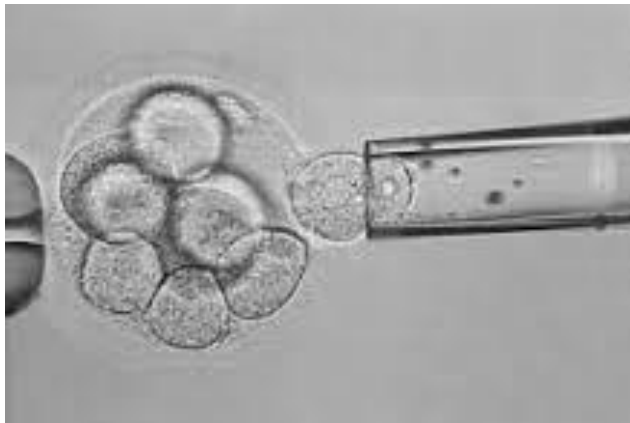
**şekil 2.11.** Assisted Hatching

Artan yaş ve düşük oosit sayısı ile ilgili olan fragmantasyon yüzdesi artıkça siklus prognozu, implantasyon ve gebelik oranları azalmaktadır [210]. Fertilizasyonun 3. gününde fragmanları fazla olan embriyolara, AH sonrası mikromanipulator yardımıyla aspirasyon ile defragmantasyon yapılabilir [211] (şekil 2.12). Düşük grade'li çok fragmanları embriyolara defragmantasyon yapıldıktan sonraki; implantasyon, klinik gebelik, canlı doğum, spontan abortus ve fetal defekt oranlarının yüksek gradeli iyi kalitede embriyolarla eşitlendiği bildirilmiştir [212].



**Şekil 2.12.** Defragmentasyon

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) değerlendirilmesi RIF'te tartışmalıdır (Şekil 2.13). RIF olan kadınlarda embriyonun anöploidi frekansı (%67) [213]. RIF olmayanlarla benzer (%64) bulunmuştur [214]. Bazı çalışmalarda PGD'nin RIF'te yararlı olduğuna ait bir kanıt bulunamamıştır [215, 216]. Kromozomal mozaisizm (blastomerler arasında kromozomal farklılık) olabirliği nedeniyle PGD'de, blastomere yapılan biyopsi sonucu geriye kalan blastomerleri temsil etmez [217]. Bazı laboratuvarlar mozaisizm nedeniyle her embriyodan iki hücre almaktadır, fakat bu iki hücrenin çıkarılması erken embriyoda yaşayabilmesini tehdit eder [218, 219]. Son yıllarda blastokistin genetik tanısında komperatif genomik hibridizasyon (CGH) ve tek nükleotid polimorfizm mikroarray yöntemleri kullanılmaktadır [220]. Fragouli ve arkadaşlarının yaptığı son çalışmaya göre, CGH ve mikroarray CGH trofoektoderm analizi ile anöploidi tespiti başarılı olmuştur [221]. RIF olan hastalarda PGD'de mikroarray CGH'nin yararlılığı için ileri araştırmalara gerek vardır.



**Şekil 2.13.** PGD

RIF bazen de, hCG günü veya embriyo transfer gününde endometrium kalınlığının 7mm'den az olması ile ilişkilidir. Altında yatan nedenler konjenital (Turner Sendromu, T-şekilli uterus) veya kazanılmış (Pelvik Radyoterapi, intrauterin cerrahi işlem, enfeksiyon) olabilir. Bu durumda intrauterin olarak incelemek için ve aynı zamanda Asherman Sendromu gibi intrauterin adezyonların tanı ve tedavisinde histeroskopi ile değerlendirilir. Çeşitli methodlarla tekrarının önlenmesi için tedavi verilir. Östrojen [222], E vitamini[223], sildenafil [224], GnRH agonisti [225] ve Granulosit Koloni Stimulan Faktör [226] ile endometrial kalınlığın arttığını bildiren çalışmalar vardır. Yeni yapılan bir çalışmada östrojen ve vazodilatörlere karşı dirençli veya yetersiz gelişimi olan hastalarda, granulosit koloni stimulan faktörün endometrial perfüzyonuyla başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Yeni bir yaklaşım olması nedeniyle daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [226].

Tekrarlayan IVF başarısızlıklarında önceki siklusun luteal fazında yapılan endometrial uyarı veya histeroskopik biyopsiyle lokal travma oluşturarak gebelik ve implantasyon oranlarında anlamlı artış bildirilmiştir. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile endometrial reseptivitenin arttığı düşünülür [188, 189].

Tekrarlayan IVF başarısızlıklarında implantasyon yetmezliği olan ve over yanıtı zayıf hastalarda doğal sikluslar ve prematür LH pikini engellemek için de GnRH antagonistlerinin kullanılması gibi farklı KOH protokolleri denenebilir [227, 228].

Transfer kateterinin endoservikal kanaldan uzun sürede, zorlanarak geçtiği, kateter ucunda kan olan, katateri değiştirmek gerektiği ve transfer sonrası kramp tarz ağrı hissedilen zor transferler gebelik oranlarının 1,7 kat azaltmaktadır [229]. Önceden deneme transferi yapmak [230], önceki denemelerinde zor transfer öyküsü olan, eksternal servikal osun ve serviks-uterus arası açının çok dar olduğu kadınlarda KOH siklusu öncesi histeroskopi ile servikal dilatasyon yapmak faydalı olabilir [231, 232].

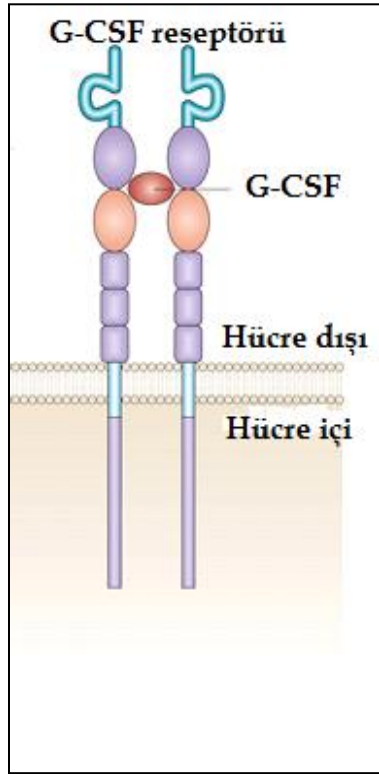
Bizim bu çalışmadaki amacımız öncelikle IVF planlanan hastaların embriyo transfer günü serviko-vajinal lavaj örneklerinden G-CSF düzeyleri bakılması ile elde edilecek gebelik oranları ilişkisinin gösterilmesidir. Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan, endometrial reseptivite problemleri nedeniyle implantasyon yetmezliği bulunan hastaların tanısında faydalı olunmasıyla, belki de IVF prognozunu önceden gösterilebilecektir.

## 2.4. Granulosit Koloni Stimülasyon Faktörü (G-CSF) Ve Reseptörü (G-CSF-R)

Koloni stimülasyon faktörü 3 (CSF-3) olarak da bilinen Granulosit Koloni Stimülasyon Faktörü (G-CSF) granulosit ve kök hücre üreten, asıl olarak kemik iliğinde bulunan bir glikoproteindir [233] (Şekil 2.14). Aktif protein, hücre dışında bulunur. 174 ve 177-aminoasit uzunluğunda, molekül ağırlığı 25kDa olan iki formu vardır. Daha verimli ve aktif olan 174-aminoasit formu rekombinant DNA teknolojisi ile üretilerek medikal ürün olarak kullanılmaktadır [234]. Kanser hastalarında nötropeni oluşumunu engellemekte ve nötropeninin tedavisinde kullanılmaktadır. Embriyo toksik olmadığı bildirilmiştir [235, 236].



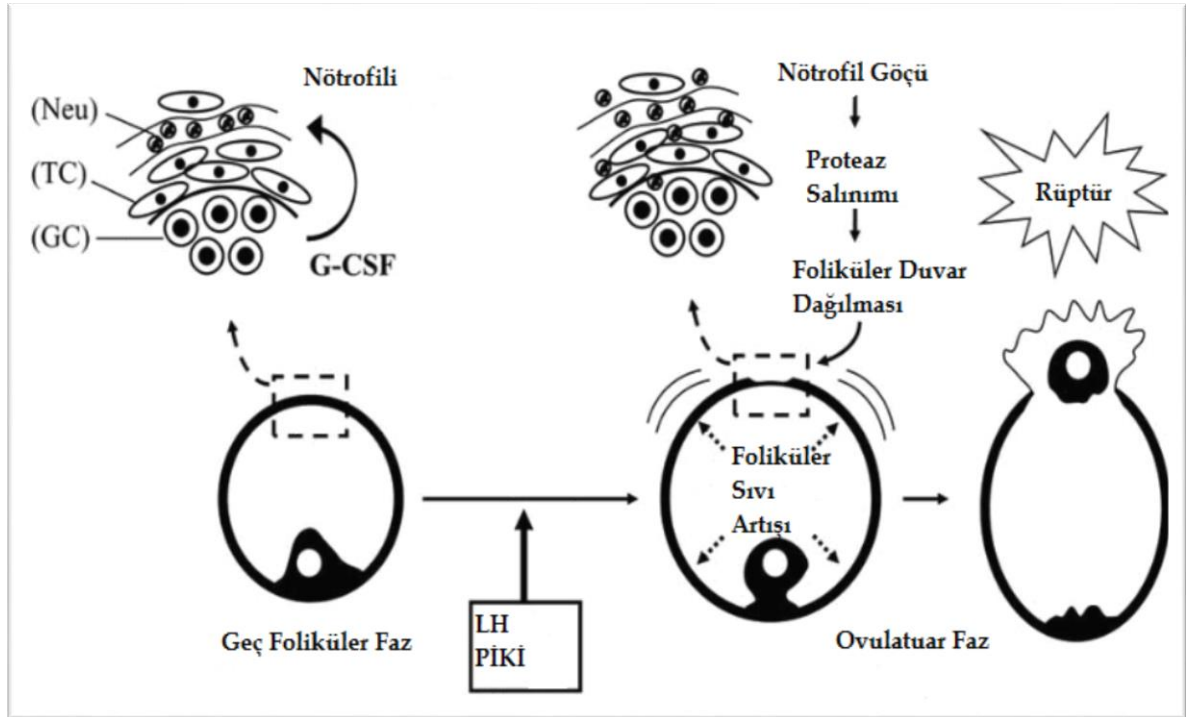
Şekil 2.14. Ribbon Diyagrama göre 3 adet insan G-CSF gösterimi



Şekil 2.15. G-CSF reseptörü gösterimi

Granulosit Koloni Stimülasyon Faktörü Reseptörü (G-CSF-R), insanda CSF3R geninden kodlanan CD114 olarak da bilinen bir proteindir [237] (Şekil 2.15). G-CSF için hücre yüzey reseptörüdür [238]. G-CSF reseptörleri, hemopoietin reseptör ailesinden olan sitokin reseptörleridir. Kemik iliğinde öncü hücrelerin üzerinde bulunan G-CSF-R, G-CSF tarafından uyarılmaya yanıt olarak, olgun nötrofilik granulositler ve makrofajlarda hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını başlatır. G-CSF-R bir transmembran zar reseptörüdür. G-CSF-R ligand bağlama, protein ile reseptör sinyal transdüksiyonu ve dimerizasyonu ile ilişkilidir. Bu proteinler Jak, Lyn, STAT ve ERK1/2'tir. Alternatif RNA ayrılmasından meydana gelen, beş farklı insan G-CSF izoformu izole edilmiştir [239-242]. G-CSF, hemopoietik sisteme ait bir büyüme

faktörü olmasıyla birlikte, aynı zamanda osteoblastlarda, düz kas hücrelerinde, endotelial ve epitelyal hücrelerde [242], overde [243], desidual hücrelerde [244], plasentada [244] ve reproduktif doku hücrelerinde üretimi [245-247] gösterilmiştir. Calhoun ve arkadaşları insan fetal dokularındaki çeşitli reseptörlerde, G-CSF varlığı ve dağılımını bildirmişlerdir [248]. Salmassi ve arkadaşları luteinize granüloza hücrelerinde G-CSF ve reseptörünün ekspresyonunu tespit etmiştir [249]. Salmassi ve arkadaşları diğer çalışmasında da folikül sıvısındaki G-CSF miktarını, kandaki G-CSF'ye göre daha fazla bulmuştur [249, 250].



**Şekil 2.16.** Ovulasyon mekanizmasında G-CSF [7]

Geç foliküler fazda, özellikle folikül rüptüründen birkaç gün önce, granüloza hücrelerinden G-CSF yapımı artar ve G-CSF folikül duvarına lökosit birikimini sağlar. LH pikiyle birlikte folikül duvarındaki lökosit sayısı önemli derecede artış gösterir ve bunlar proteolitik enzimlerin üretimini sağlar [247]. Folikül sıvı içeriği artar, folikül duvarının kalınlığı inceler ve folikül rüptüre olarak ovulasyon sağlanır (Şekil 2.16).

Bazı otörler tarafından, G-CSF'nin ovulasyonda artması nedeniyle, ovulasyonda çok önemli bir role sahip olduğu ve gebeliğin devamlılığı için gerekli olduğu düşünülmüştür [8, 251, 252].

G-CSF'nin, trofoblast büyümesi ve plasenta metabolizması üzerinde etkileri gösterilmiştir [244, 253]. G-CSF-R'nin, trofoblast hücre yüzeyinde lokalize olduğu gösterilmiştir [254].

Hayvan çalışmalarında G-CSF'nin düşüğe karşı etki ettiği bulunmuştur [255]. Bununla birlikte insan erken düşüklerinin trofoblastlarında, G-CSF ekspresyon yetersizliği bulunmuştur [242, 255, 256].

Serumdaki G-CSF hakkında yapılan çalışmalar, bunun implantasyondaki yeri hakkında bazı kanıtlar sunmuştur. Başarılı doğal sikluslarda [252] ve IVF/ICSI sikluslarında G-CSF'nin serumdaki miktarının arttığı kanıtlanmıştır [249].

G-CSF'nin immün sisteme çeşitli etkileri vardır. Bunlar; Th2 (T-helper 2) cevabını indükler, NK hücrelerini ve kandaki mononükleer hücreleri inhibe eder. Gebeliği semi allogreft bir durum olarak düşünürsek, gebenin immun toleransı esas sorundur. Allogreft öncesi G-CSF ön tedavisi alan farelerde, G-CSF'nin bu greftlere karşı, Th2 baskın cevaba yönelik değişimleri başlatır ve tolerojenik dendritik hücre farklılaşmasına sebep olarak, T hücre toleransını başlattığı gösterilmiştir [257]. Dahası, G-CSF ve IL-10 üreten düzenleyici T hücrelerinin üretimine katkıda bulunarak ve greft toleransını sağlamaktadır [258]. Bu özellik açıkça implantasyon öncesinde, sırasında ve erken postimplante uterusu gözlenen bağışıklık düzenleyici olaylarla ilişkilidir. Böylece folikül sıvısındaki G-CSF seviyelerinin, alıcı uterusun hazırlığına yol açan erken oosit-uterus iletişimini yansıttığı gözlenir ve embriyo üretilmeden önce değerlendirilebilir [259]. Bundan dolayı her bir oositin kalitesi, bu oositin uterusu hazırlaması ve yapışması, immun tolerans yolaklarını başlatma özelliklerinde bir kriter olabilir [259].

G-CSF'nin, oositin kendi m-RNA içeriğini etkilediği düşünülmektedir. Özellikle daha sonraki dönemde embriyonun endometrial hücreye yapışmasını sağlaması için, oosit yüzeyinde L-selektini de içeren bir seri adezyon molekülünün artışı tetikleyebilir. Alternatif olarak G-CSF, embriyonun gelişimi ve implantasyonu için gereken sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezini, kumulus granüloza hücrelerini uyararak arttırabilir. Normalde CD4+ T hücreleri ve makrofajların her ikisi de kumulus ooforusta tespit edilebildiği gösterilmiştir. Daha önemlisi bu T hücreleri, kandaki T hücrelerinden veya over hücrelerinin kendisinden çok daha fazla IL-4 ve LIF üretebilir [260]. Bundan dolayı, Th2 değişimi başlatabilen folikül sıvısındaki G-CSF ile T hücrelerinin LIF sentezlemesini ve kumulus ooforustaki T hücrelerininse IL-4 üretimini sağlar [261, 262]. İmplantasyonla ilgili bir çok özelliği arasında, LIF insan blastokistlerinin sayısını ve kalitesini in-vitro

çalışmalarda anlamlı olarak arttırmakta ve preimplante dönemdeki insan blastokistlerinin büyümesi, farklılaşması üzerine görevleri bulunmaktadır [155].

Folikül sıvısındaki G-CSF'nin embriyoya kendisini nasıl tamir edebileceği ile ilgili çok kritik bilgiler sağladığı düşünölmektedir. İmplantasyon öncesi tanının geniş kullanımı, embriyolardaki yüksek mozaisizm ve anöploidi oranını göstermekle kalmamış aynı zamanda, embriyonun kendini tamir ettiğini de ortaya koymuştur [263, 264]. Öz tamir yaşlanmadan etkilenen kan kök hücrelerinde tanımlanmış olmakla birlikte embriyolarda da gözlenmiştir. G-CSF, endojen kök hücrelerin iyileştirilmesi [265] veya kan multipotent progenitör hücrelerinin mobilizasyonu yoluyla [266], özellikle kalp ve karaciğerde öz tamiri başlatan bir ajan olarak çeşitli modellerde tanımlanmıştır [267].



### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Hasta Seçimi

Çalışmamız Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Ankara Tüp Bebek Merkezimize 2015 yılında çocuk isteği nedeniyle başvuran, Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı olan, ICSI yapılmasını planladığımız, 18-42 yaş arasında 19 hasta ile gerçekleştirildi. Başkent Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından çalışmamız KA15/138 no ile onaylandı. IVF endikasyonları açıklanamayan infertilite, erkek faktörden oluşmaktaydı. Zayıf yanıt verenler (toplanan oosit sayısı <3 ve hCG günü E<sub>2</sub><500 pg/ml olanlar) [268], dondurma-çözme siklusu olan veya zorunlu tek embriyo transferi yapılan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya alınan hastaların ayrıntılı anamnezleri alınıp, genel fizik ve jinekolojik muayeneleri yapıldı. Bazal değerlendirme için spermiogram, adet 3. günü yapılan TV-USG (*Siemens Sonoline Elegra, 6.5 mHz. vajinal prob*) ile over boyutları ve antral follikül sayısı değerlendirilmesi, adet 3. günü serum FSH, LH, E<sub>2</sub>, TSH, PRL ve adet 21.günü serum progesteron düzeyleri ve histerosalpingografi (HSG) bakıldı. Gerekli olgularda histerosonografi, histeroskopi ve laparoskopi yapıldı.

#### 3.2. Uygulanan IVF Prosedürü

Hastalara standart uzun dönem GnRH agonist-long protokol veya kısa dönemli antagonist ya da mikrodoz protokolleri ile kontrollü ovaryen hiperstimulasyon uygulandı.

##### **Long Protokol**

Uzun protokol kapsamında hastalara siklusün 21. günü GnRH analogu Lucrin® (*Leuprolide acetate, Abbott, Illinois, USA*) 1 mg/gün dozuyla başlandı. Menstrüasyonun 2-3. günü ölçülen serum E<sub>2</sub> düzeyinin <50 pg/ml, LH<3 mIU/ml ve USG de ölçülen endometrium kalınlığının <4 mm olması durumunda hipotalamo-hipofizer-ovaryen aks down-regüle kabul edilip Lucrin, 0.5 mg/gün idame dozuna düşüldü ve gonadotropinlerle [rekombinant rFSH: Gonal-F® (*Follitropin alfa, Merck Serono, Cenevre, İsviçre*), Puregon® (*Follitropin beta, Schering-Plough, Kenilworth, USA*)], [hMG (human Menaupozal Gonadotropin: FSH+LH): Merional® (*hMG, IBSA, Lugano, Ticino, İsviçre*)], [yüksek pütrifiye üriner uFSH: Fostimon® (*Urofollitropin, IBSA, Lugano, Ticino, İsviçre*)]

kontrollü ovaryen hiperstimülasyona 112,5-450 IU/gün dozları arasında başlandı ve 5-12 gün devam edildi.

### **Antagonist Protokol**

Antagonist protokol kapsamında menstrüasyonun 2-3. günü kontrollü ovaryen hiperstimülasyona gonadotropinlerle [rekombinant rFSH: Gonal-F® (*Follitropin alfa*, Merck Serono, Cenevre, İsviçre), Puregon® (*Follitropin beta*, Schering-Plough, Kenilworth, USA)], [hMG(human Menaupozal Gonadotropin: FSH+LH): Merional® (*hMG*, IBSA, Lugano, Ticino, İsviçre), Menogon® (*hMG*, Ferring, Saint-Prex, İsviçre), Menopur® (*hMG*, Ferring, Saint-Prex, İsviçre)], [yüksek pütrifiye üriner uFSH: Fostimon® (*Urofollitropin*, IBSA, Lugano, Ticino, İsviçre)] 75-450 IU/gün dozları arasında başlandı ve 6-16 gün devam edildi. Dominant follikül  $\geq 12-13$  mm'lik gelişim gösterdiğinde 0.25 mg/gün GnRH antagonisti [Orgalutran® (*Ganirelix*, Schering-Plough, Kenilworth, USA), Cetrotide® (*Cetrorelix*, Merck Serono, Cenevre, İsviçre)] başlandı ve hCG gününe kadar (hCG günü dahil) devam edildi.

### **Mikrodoz Protokol**

Mikrodoz kapsamında tedaviden bir önceki siklusta oral kontraseptif Desolett® (*etinil estradiol 0,03 mg + desogestrel 0,150 mg*, Merck Sharp Dohme, Hollanda) kullanıldı. Oral kontraseptifin bitiminden sonraki 3. günde 2 x 40 µgr Lucrin® (*Leuprolide acetate*, Abbott, Illinois, USA) başlandı. 2 gün sonra tedaviye yüksek doz 300-450 IU/gün gonadotropinler [rekombinant rFSH: Gonal-F® (*Follitropin alfa*, Merck Serono, Cenevre, İsviçre), Puregon® (*Follitropin beta*, Schering-Plough, Kenilworth, USA)] eklendi ve 8-12 gün devam edildi. 2 x 40 µgr Lucrin hCG gününe kadar (hCG günü dahil) devam edildi.

Uygulanan protokol ve gonadotropin dozları; optimal sayıda ve kalitede oosit elde etmek için, yaş, vücut kitle indeksi (VKİ), adet 3.günü over follikül sayısı, bazal FSH ve E<sub>2</sub> değerlerine, anamneze ve önceki tedavilere verdiği yanıtı göre seçildi. Tedavinin takibi seri TV-USG ile follikülometrilere ve serum E<sub>2</sub>, LH, progesteron ölçümlerine göre yapıldı.

Ovaryen stimülasyon sonrası en az 2 adet  $\geq 17-18$  mm ve birkaç adet  $\geq 14$  mm follikül geliştiğinde; 14 mm ve üzeri follikül başına 200 pg/ml E<sub>2</sub> değerlerine ulaşıldığında; ve de endometriumun trilaminar ve  $>6$  mm kalınlığa ulaştığında hCG [250-500 µgr rhCG: Ovitrelle® (*rekombinant koriogonadotropin alfa*, Merck Serono, Cenevre, İsviçre) veya 5000-10000 IU hCG Pregnyl® (*hCG*, Schering-Plough, Kenilworth, USA)] uygulanmasıyla ovulasyon tetiklemesi yapıldı.

hCG uygulamasından 36 saat sonra ultrasonografi eşliğinde transvajinal yoldan folliküller aspire edilerek oositler toplandı. OPU dan 4-6 saat sonra tüm matür oositlere mikroenjeksiyon sistemi (Eppendorf® *Transformer 2, Hamburg, Almanya*; Olympus® *IX71, Tokyo, Japonya*) kullanılarak ICSI işlemi uygulandı. Oositler ve embriyolar sırasıyla G1 ve G2 mediumlarında (Vitrolife®, *Kungsbacka, İsveç*) kültüre edildi. İnseminasyonu takip eden 16-18. saatlerde insemine edilmiş oositlerde pronükleus kontrolü yapıldı. İki pronükleus ve polar cisimcik varlığı normal fertilizasyon olarak kabul edildi. Transfer öncesinde embriyolar her gün morfolojik olarak değerlendirildi. Blastomerlerin gelişmelerine, eşit büyüklükte olup olmamalarına ve fragmantasyon içermelerine göre Grade I, II, III, IV embriyolar olarak klasifiye edildi.

OPU sonrası Neupogen® 48 MIU/0.5ml (Filgrastim) günde bir defa subkutan, 600 mg/gün intravajinal mikronize progesteron [Progynex® (*Farmako, İstanbul, Türkiye*), Progestan® (*Koçak, İstanbul, Türkiye*)] ile ve/veya 3 günde bir intramuskuler 1500 IU hCG Pregnyl® (*hCG, Schering-Plough, Kenilworth, USA*) verilmesiyle Luteal faz desteği sağlandı.

### **3.3. Serviko-Vajinal Lavaj Örneği Alınması**

ICSI sonrası 3.gün embriyo transferi (ET) aşamasına gelindi. Önce litotomi pozisyonunda spekulum yerleştirildi. Serviks, eksternal os, vajen steril serum fizyolojik ile yıkayıp nazikçe spanç ile kurulandı. Arkasına 5 cc serum fizyolojik (*sf: %0,9 NaCl*) takılmış Wallace® kateter (*inseminasyon katateri, Smiths Medical, Watford, UK*) ile eksternal ostan 0,5 cm içeri girilip; 5 cc sf'in tamamı servikal kanala yavaşça boşaltıldı. Sonra posterior vajinal fornikse dolan sıvılar aspire edildi (serviko-vajinal lavaj [269]). Aspirat'ın 1 ml'si standart 1,5 ml'lik mikro test tüpü (*3810, Eppendorf, Hamburg, Almanya*) içerisine boşaltılıp -20°C'de dondurulup; biyokimya analizleri yapılana kadar derin dondurucuda saklamaya alındı. Kültür sıvıları ile eksternal os tekrar temizlendi ve deneme katateri (*Wallace TT1816, TT1816N*) sonrası Embriyolog, transfer edilecek embriyoları Wallace® katater (*1816 N, 2316, Smiths Medical, Watford, UK*) içinde laboratuvarından getirdi. Pelvik ultrasonografi eşliğinde 2 adet embriyo transferi yapıldı. Hasta transfer sonrası yaklaşık 2 saat supin pozisyonunda yatırıldı.

### 3.4. Endometriyal Biyopsi Örneği Alınması

Önce litotomi pozisyonunda spekulum yerleştirildi. Serviks, eksternal os, vajen batikon ile yıkandı. Serviks tenekulum ile tutuldu. Dilatatörlerle dilate edildikten sonra, ofis histereskopiyle kavite değerlendirildi, karmen kanülle endometrial biyopsi alındı. Alınan materyaller formolle dolu olan kaba yerleştirildi ve patolojiye gönderildi.

### 3.5. Biyokimyasal Analiz

Çalışmaya alınan 19 hastanın serviko-vajinal numune toplanması işlemi tamamlandıktan sonra, örnekler önce derin dondurucudan çıkartıldı ve +20°C oda ısısında yavaşça tekrar sıvı hale döndürüldü. Serviko-vajinal lavaj örneklerinden Biyokimya laboratuvarımızda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile G-CSF (*Human GCSF ELISA kiti, Bioassay Technology Laboratory, Inc. Norcross, USA*) düzeylerine bakıldı.

Sonra human G-CSF ELISA kitine 100 µl serviko-vajinal lavaj numunesi eklendi. Serviko-vajinal lavaj numunesinde bulunan G-CSF, G-CSF antikorlarıyla kaplı ELISA tabakasıyla birleşti ve tabaka üzerinde immobil hale geldi. Yıkandıktan sonra biotinilize anti-human G-CSF antikor ekendi. Sonra tekrar yıkanarak bağlanmamış biotinilize anti-human G-CSF antikorları temizlendi. Komplekse HRT bağlı streptovidin eklendi. Sonra tekrar yıkandı ve bu komplekse TMB substratı ve böylece bağlı-immobilize G-CSF düzeyi miktarında bir renk oluştu. Durdurma solüsyonu rengi maviden sarıya değiştirdi ve rengin yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Bu yöntemin serviko-vajinal lavaj G-CSF'si için sensitivitesi: <5.37 ng/L; ölçüm aralığı: 10-3800 ng/L deney içi varyasyon katsayıları: CV<%8-10 olarak belirtilmiştir.

### 3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Çalışmaya alınan 19 hastanın endometrial biyopsi materyallerinin olduğu bloklar seçildi. Bloklar 3 mikronda kesilerek poly-lysin kaplı lamlara alınır. Kesilen lamlar sepetlere dizilerek etüve konur. 70°C 'de 40 dakika bekletilir. 40 dakika sonra 5 dakika Ksilen, 5 dakika Alkol ve 3 dakika suyla yıkama ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilir.

*Antijen Retrieval Aşaması:* Lamlar Antijen Retrieval cihazının sepetlerine dizilerek cihaza EDTA solüsyonuna yerleştirilir. 97°C'de 20 dakika kaynatılır. Yavaş yavaş 65°C'ye inmesi beklenilir. İstenilen sıcaklığa düşünce sepet alınır ve buffera atılır. Bu

işlemin amacı hem antijen retrieval solüsyonunu uzaklaştırmak, hem de lamların soğuması için yapılır.

Lamlar kod numaraları ile cihaza girilerek etiket bastırılır. Etiketler lamlara yapıştırılır. Gerekli antikör 1/175 dilüe edilerek cihaza yerleştirilir. Yardımcı reagentler (Hematoksilen, Peroksidaz, Horseradish Peroksidaz (HRP), Diaminobenzidin (DAB)) yerleştirilir. Fosfat Buffer Salin (PBS) yıkama solüsyonu ve distile su hazırlanarak dizilerek konulur. DAKO Autostainer Link 48 cihazı ile başlatılır. İşlem sırasıyla şu şekildedir;

1. Yıkama aşaması (Rinse): Bufferla yıkanır.
2. Endogenous Enzim Block aşaması: Fleks Peroksidaz Block ile 5 dakika bekletilir.
3. Rinse: Bufferla yıkanır ve diğer işleme geçer.
4. Primary Antibody Aşaması: G-CSF Reseptör anti-body (N2C1, internal, Lot no: 40506) ile 35 dakika bekletilir.
5. Rinse: Bufferla yıkanır ve diğer işleme geçer.
6. Labelled Polymer Aşaması: Flex HRP ile 20 dakika bekletilir.
7. Rinse: Bufferla yıkanır ve diğer işleme geçer.
8. Substrate-Chromogen Aşaması: Flex DAB-Substrate-Chromogen ile 10 dakika beklenir.
9. Rinse: Bufferla yıkanır ve diğer işleme geçer.
10. Counterstain Aşaması: Flex Hematoxylin ile 5 dakika bekletilir.
11. Rinse: Distile su ile yıkanır ve diğer işleme geçer.
12. Rinse: Bufferla yıkanır ve diğer işleme geçer.
13. Rinse: Distile su ile yıkanır ve diğer işleme geçer. Cihazda işlem biter.

Bu işlemlerden sonra lamlar sepete konulur. Birkez Alkol'den geçirilir. Kurumaya alınır. Kapama işlemi için Ksilen'e konulur. Monte işleminde Ksilen'e 5 dakika, Balsam 2 damla yapılarak kapatılır.

G-CSF reseptörün boyanması ile endometrial epitel ve stromal kısımlar, HSCORE (boyanma yoğunluğunun ışık mikroskobu ile semikantitatif histolojik skorlanması) göre değerlendirilir.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Serviko-vajinal lavaj G-CSF düzeyleri ile elde edilen gebelik oranları (ET sonrası 10-12. günler serum  $\beta$ -hCG düzeyleri, ET sonrası 4-6. haftalarda bakılan TV-USG ile

gestasyonel kese ve fetal kalp atımları) ilişkisi istatistiksel olarak incelenerek klinik prospektif bir araştırma yapılmıştır. Bulgularının istatistiksel analizi “SPSS for Windows Release 22.0” (Illinois, Chicago, USA) programı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler yanında gruplar arasındaki farklılıklar için “T test”, “Mann-Whitney U test” ve “ROC Curve” kullanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### Serum $\beta$ hCG pozitifliğine göre değerlendirildiğinde;

Serum  $\beta$ hCG pozitif olanlar ile olmayanlar arasında, serviko-vajinal lavajdan bakılan G-CSF açısından fark olup olmadığına bakıldı (Tablo 4.1.1).

**Tablo 4.1.1.** Hastaların Lavaj G-CSF değeriyle  $\beta$ -hCG oranları ilişkisi (sd: standart sapma)

Tüm Hastalar: 19 hasta				
(Mann-Whitney U Test)	$\beta$ hCG	Hasta Sayısı	Ortalama $\pm$ sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	Pozitif	13	734,29 $\pm$ 284,49	0.221
	Negatif	6	702,95 $\pm$ 155,82	

$p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde, serum  $\beta$ -hCG pozitifliği olanlar ile olmayanlar arasındaki Lavaj G-CSF ( $p:0,221$ ) düzeyine bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.1.1).

### Ultrasonografik gebelik kesesi pozitifliğine göre değerlendirildiğinde;

Ultrasonografik (USG) olarak gestasyonel kesesi olanlar ile olmayanlar arasında serviko-vajinal lavajdan bakılan G-CSF açısından fark olup olmadığına bakıldı (Tablo 4.1.2).

**Tablo 4.1.2.** Hastaların Lavaj G-CSF değeriyle gestasyonel kese oranlarının ilişkisi

Tüm Hastalar : 19 Hasta (Mann-Whitney U Test)				
USG'de görülen	Gebelik Kesesi	Hasta Sayısı	Ortalama $\pm$ sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	yok	10	690,61 $\pm$ 308,34	0,216
	var	9	761,92 $\pm$ 164,66	

USG’de gestasyonel kese görülenlere bakıldığında, gestasyonel kesesi olanlar ile olmayanlar arasında Lavaj G-CSF (p:0,216) düzeyleri açısından  $p<0.05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel bir fark çıkmamıştır (Tablo 4.1.2).

**Ultrasonografik Fetal Kalp Atımı [98] pozitifliğine göre değerlendirildiğinde;**

Ultrasonografik olarak Fetal Kalp Atımı var olanlar ile yok olanlar arasında serviko-vajinal lavaj G-CSF açısından fark olup olmadığına bakıldı (Tablo 4.1.3).

**Tablo 4.1.3.** Hastaların Lavaj G-CSF değerleriyle USG’de görülen FKA pozitifliği ilişkisi

<b>Tüm Hastalar : 19 Hasta (Mann-Whitney U Test)</b>				
USG’de görülen	<b>FKA</b>	Hasta Sayısı	Ortalama±sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	yok	10	690,61±308,34	0,216
	var	9	761,92±164,66	

Ultrasonografik olarak FKA’ı pozitif olanlar ile negatif olanlar arasında Lavaj G-CSF (p:0,216) düzeyleri açısından  $p<0.05$  anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak bir fark çıkmamıştır (Tablo 4.1.3).

**Subgrup Analizleri**

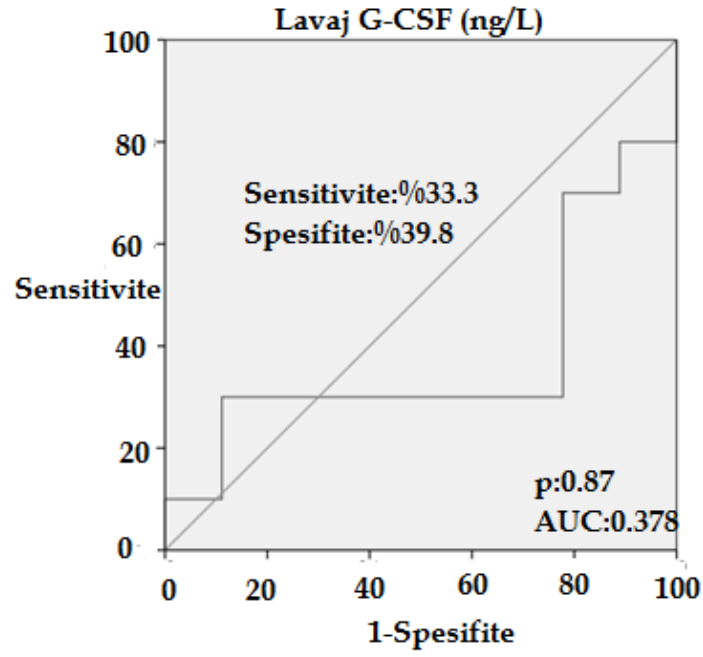
Tablo 4.1.1, 4.1.2 ve 4.1.3’de görüldüğü gibi, embriyo transfer günü serviko-vajinal lavajdan G-CSF için, gebelik açısından anlam çıkmamıştır. Lavaj G-CSF’ye daha ayrıntılı bakılacak olursa, Gebelik kesesi sayısı (0-1-2) (Tablo 4.2) ile arasındaki farklılıklar incelendi.



**Tablo 4.2.** Lavaj G-CSF değerlerinin USG’de gebelik kesesi sayılarına göre değerlendirilmesi

<b>Gebelik kesesi 0 ve 1 olanlar: 16 Hasta</b>				
(Mann-Whitney U Test)	Gebelik Kesesi	Hasta Sayısı	Ortalama±sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	0	9	761,92±164,66	0,082
	1	7	580,26±224,41	
<b>Gebelik kesesi 0 ve 2 olanlar: 16 Hasta</b>				
(Mann-Whitney U Test)	Gebelik Kesesi	Hasta Sayısı	Ortalama±sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	0	9	761,92±164,66	0,156
	2	3	948,11±366,97	
<b>Gebelik kesesi 0 ve 1+2+ olanlar: 16 Hasta</b>				
(Mann-Whitney U Test)	Gebelik Kesesi	Hasta Sayısı	Ortalama±sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	0	9	761,92±164,66	0,216
	1+2+	10	690,61±308,34	
<b>Gebelik kesesi 1 ve 2 olanlar: 16 Hasta</b>				
(Mann-Whitney U Test)	Gebelik Kesesi	Hasta Sayısı	Ortalama±sd	p
Lavaj G-CSF (ng/L)	1	7	580,26±224,41	0,081
	2	3	948,11±366,97	

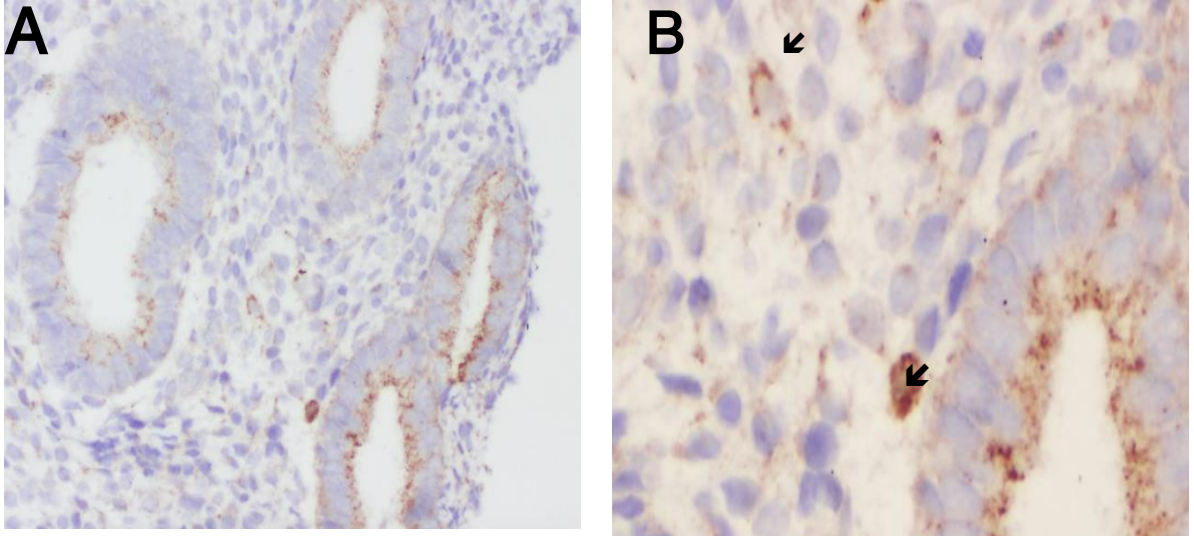
ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisinde Lavaj G-CSF düzeyleri ile gebelik kesesi ilişkisinin sensitivitesi ve spesifitesi incelenmiştir. Serviko-vajinal lavajdan bakılan G-CSF için: %33,3 duyarlılık ve %39,8 seçicilikte gebelik kesesi var (kese sayısı: 1 ve 2) (p: 0.87) ve AUC: 0.378 şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Lavaj G-CSF ve Gebelik kesesi var/yok, ROC eğrileri (AUC: ROC eğrisi altında kalan alan)

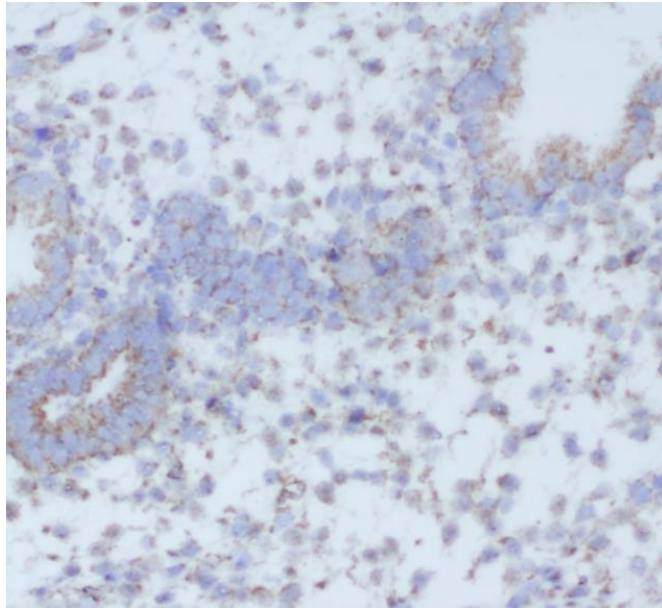
Toplam 19 hastanın histopatolojik tanılarında; 2 hastanın endometrit, 5 hastanın erken sekretuar endometrium, 12 hastanın proliferatif endometrium olduğu gözlemlendi.

Endometrial epitel ve stromal alanlarda G-CSF reseptörün boyaması ile HSCORE (boyanma yoğunluğunun ışık mikroskobu ile semikantitatif histolojik skorlanması) değerlerine göre,  $\beta$ -hCG pozitif olan (n:13) ve olmayan (n:6) karşılaştırıldı (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** A) G-CSF-R belirteci ile zayıf boyama paterni (x20 HPF)  
B) G-CSF-R belirteci ile zayıf boyama paterni (x40 HPF), ok ile gösterilenler boyanan hücreler.

Endometrial örneklerdeki G-CSF reseptörünün boyamasında, glandüler alanlarda tutulum olmadı.  $\beta$ -hCG pozitif olan 2 hastada,  $\beta$ -hCG negatif olan 1 hastada stromal alanlarda yaygınlığı az hücrede (%1) ve G-CSF reseptörünün boya yoğunluğu orta derecede saptandı.



**Şekil 4.3.**G-CSF-R belirteci ile boyama paterninin olmadığı (x20 HPF)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son 20 yıl içinde, CSF ailesinin anne ve embriyo arasındaki iletişimde çok önemli bir rolü olduğu insan ve hayvan modellerinde oldukça ikna edici bir biçimde gösterilmiştir [270]. Dahası CSF'nin, bir kadının reproduktif dönemi boyunca ilgili reproduktif süreçleri düzenlediğine dair çok sayıda kanıt vardır. CSF ailesi, Makrofaj-CSF (M-CSF, CSF-1), Granulosit-Makrofaj-CSF (GM-CSF, CSF-2) ve Granulosit-CSF (G-CSF, CSF-2)'i içermektedir. Glikoprotein olarak sekrete edilen bu CSF'ler reseptör proteinlerine bağlanarak hücre farklılaşması ve bölünmesiyle ilgili olan hücre içi sinyal yollarının aktive olmasını sağlamaktadır [5, 6]. M-CSF, GM-CSF ve G-CSF ve ilgili reseptörleri birlikte over dokusunda lokalizedir [243, 249, 250, 252]. Bütün bu sitokinler preovulatuvar folikülde tespit edilmiş olup granüloza hücrelerinden en fazla konsantrasyonda ovulasyonda sentezlendiği gösterilmiştir [250]. G-CSF ve GM-CSF'nin, başarılı IVF/ICSI sikluslarında ovulasyondan 10 gün sonra serumda artışı saptanmıştır [249].

Ovulasyon ve ovulasyon sürecinde belirgin varlığı bulunan inflamasyonun benzerliğine rağmen, bu olayların sebebi olan granulosit ve onunla ilişkili olan sitokin G-CSF, ovulasyon araştırmalarında çok az dikkat çekmektedir. Birçok çalışmada makrofajlar, granulositler yerine odak noktası olmuştur. İnflamatuar sitokinler, (IL-1- $\beta$  [153], IL-6 [153,154], TNF- $\alpha$  [155], GM-CSF [156,116] ve M-CSF [158,159,122]) insan folikül sıvısı içerisinde tespit edilmiş ve bunların ovulasyon süreciyle ilişkisi açıklanmıştır.

Özellikle ovulasyondan hemen önce yapılan oosit toplanmasında biriktirilen foliküler sıvı intrafoliküler fizyolojiyi anlamak için bilgi vericidir. İnsan folikül sıvısındaki inflamatuvar sitokinlerin, folikül rüptüründen hemen önce bulunması dikkat çekicidir. Bu sitokinler folikül rüptür mekanizmasında yer almalarından dolayı, folikül sıvısı içinde serumdan daha fazla bulunurlar. Buna rağmen, yapılan çalışmalarda folikül sıvısında ve serumda çok az sayıda sitokin bakılmış ve bunların düzeyleri değişkenlik göstermiştir. Fujii ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-6, M-CSF ve G-CSF miktarı folikül sıvısında serum göre daha fazla düzeyde, GM-CSF ve TNF- $\alpha$  ise daha az düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. IL-1- $\beta$ 'da farklılık saptanmamıştır. Üstelik G-CSF diğer sitokinlere göre, Folikül Sıvısı/ Serum Konsantrasyonu oranında daha yüksektir [7].

Makinoda ve arkadaşları serumdaki G-CSF miktarını, ovulatuvar fazda diğer fazlara göre daha yüksek olarak saptamıştır [8]. Fujii ve arkadaşları overyan stimülasyon yapılan hastalarda değişik sitokinlerin serum konsantrasyon değişikliklerini incelemiştir.

Ovulasyondan 5 ve 1 gün önce aralığında, G-CSF diğer sitokinlere göre anlamlı olarak daha yüksek olarak saptanmıştır [271].

Folikül sıvısındaki düşük G-CSF, yaşlı ve stimulasyona fazla cevap gösteren hasta grubunda izlenmekte olup bu iki grupta gebelik oranları azalmış ve bu da oosit kalitesini etkilemiş gözükmektedir. Böylece, dolaylı olarak, folikül sıvısındaki düşük G-CSF miktarının hastaların oosit yeterliliği ile bağlantılı olduğunu varsayabiliriz [272].

G-CSF'nin embriyo implantasyonunu nasıl etkilediği hala bilinmemektedir. Bununla birlikte bazı durumlar öngörülebilir. Öncelikle folikül sıvısının kendisi fertil hastalarda fallop tüplerine ve uterusu direkt mesajlar göndererek implantasyonu sağlayan bir seri karışık etkileşimin içerisinde yer alabilir [273].

Th1 ve Th2 hücrel fonksiyonlarına, doğal katil (NK) hücrelerinin sitotoksitesine, HLA kompleksi moleküllerine, CD4+ ve CD25+ T hücrelerinin disfonksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan immun cevaptaki dengesizlik, potansiyel olarak tekrarlayan düşükler ve embriyo implantasyonunun başarısızlığından sorumlu olan immunolojik mekanizmalardan bazılarıdır [226].

Endometrial reseptivitenin en önemli klinik belirteçlerinden birisi endometrial kalınlıktır ve ince endometrium sınır değeri 7mm olması [274] ve östrojene dirençli olması olarak tanımlanmıştır [275]. Kasius ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada endometrial kalınlığı 7mm üstünde olan kadınlara oranla 7mm altında olan kadınlarda klinik gebelik anlamlı derecede az olarak değerlendirilmiştir [276]. Standart tedavi protokolüne dirençli olan ince endometriumu olan kadınlarda G-CSF kullanıldığında, gebelik oranlarında anlamlı oranda artış gözlenmiştir [226, 277].

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda G-CSF kullanımı ile ilgili gelişmeler kaydedilmiştir [278, 279] ve tekrarlayan spontan abortus insidansında azalma gözlenmiştir [279, 280].

Daha önce kliniğimizde yapılan Serdar ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, YÜT yapılacak hastalardan serum ve serviko-vajinal lavajdan Glikodelin ve M-CSF bakılmış,  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde gebelik kese sayısı: 0 olanlarda (n:48, ortalama  $139,42 \pm 208,23$  ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı ve daha yüksek Glikodelin Lavaj düzeyleri varken; gebelik kese sayıları: 1 olanlarda (n:19, ortalama  $57,52 \pm 156,13$  ng/ml) (p: 0,010), 1+2 olanlarda (n:35, ortalama  $96,88 \pm 172,97$  ng/ml) (p: 0,043) ve 1+2+3 olanlarda (n:36, ortalama  $94,78 \pm 170,95$  ng/ml) (p: 0,049) istatistiksel olarak anlamlı ve daha düşük Glikodelin Lavaj düzeyleri saptanmıştır. Lavaj Glikodelin değerleri ile gebelik

kesesi sayısı 0 ve 2 olanlar (P: 0,597) ile 1 ve 2 olanlar (P: 0,220) arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır.

İkiz gebeliklerde, tekizlere oranla G-CSF gibi implantasyon belirteçlerinin daha fazla salgılanması; ikiz embriyoların birbirleri ve desiduayla olan diyalogları sayesinde daha uygun bir endometrial mikro-çevre oluşturarak birbirlerinin implantasyonunu kolaylaştırdıkları şeklinde yorumlanabilir.

Serviko-vajinal lavajda saptanılan G-CSF miktarını, klinik gebelik oranı açısından değerlendirebilmek için daha fazla hasta incelenmelidir.

G-CSF ile ilgili çalışmaların sayısı arttıkça, G-CSF'nin fertilizasyon ve implantasyondaki önemi daha iyi anlaşılacaktır. Böylelikle hem infertil çiftler için yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecek hem de fertil çiftler için yeni kontrasepsiyon teknikleri sağlanabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Speroff, F.M., Clinical gynecologic endocrinology and infertility 2005 Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
2. Moffett-King, A., Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(9): p. 656-63.
3. Palermo, G.D., et al., ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med*, 2009. 27(2): p. 191-201.
4. Ola, B. and T.C. Li, Implantation failure following in-vitro fertilization. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006. 18(4): p. 440-5.
5. Kaushansky, K., Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*, 2006. 354(19): p. 2034-45.
6. Marino, V.J. and L.P. Roguin, The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J Cell Biochem*, 2008. 103(5): p. 1512-23.
7. Makinoda, S., et al., Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Curr Med Chem*, 2008. 15(6): p. 604-13.
8. Makinoda, S., et al., Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. *Eur J Clin Invest*, 1995. 25(11): p. 877-9.
9. Speroff, F.M., Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
10. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2013. 99(1): p. 63.
11. Schwartz, D. and M.J. Mayaux, Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. Federation CECOS. *N Engl J Med*, 1982. 306(7): p. 404-6.
12. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2015. 103(6): p. e44-50.
13. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertil Steril*, 2014. 101(3): p. 633-4.
14. Series, W.T.R., Recent Advances in Medically Assisted Conception 1992. Number 820: p. 1111.

15. Wright, V.C., Chang, J., Jeng, G., Macaluso, M. , Assisted Reproductive Technology Surveillance --- United States, 2005, in CDC. 2008. p. 1-23.
16. 2001 assisted reproductive technology success rates A.S.f.R.M. Centers for Disease Control and Prevention, Society for Assisted Reproductive Technology, RESOLVE, Editor. 2003: Atlanta.
17. Mahmood, R., et al., Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet*, 2000. 106(6): p. 620-6.
18. Hassold, T. and D. Chiu, Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*, 1985. 70(1): p. 11-7.
19. Westrom, L., Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology*, 1995. 8(4): p. 219-22.
20. Winkel, C.A., Evaluation and management of women with endometriosis. *Obstet Gynecol*, 2003. 102(2): p. 397-408.
21. Esposito, M.A., C. Coutifaris, and K.T. Barnhart, A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod*, 2002. 17(1): p. 118-23.
22. Taylor-Robinson, D., Mycoplasma genitalium -- an up-date. *Int J STD AIDS*, 2002. 13(3): p. 145-51.
23. Polisseni, F., E.A. Bambirra, and A.F. Camargos, Detection of chronic endometritis by diagnostic hysteroscopy in asymptomatic infertile patients. *Gynecol Obstet Invest*, 2003. 55(4): p. 205-10.
24. Munro, M.G., H.O. Critchley, and I.S. Fraser, The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding: Malcolm G. Munro, Hilary O.D. Critchley, Ian S. Fraser, for the FIGO Working Group on Menstrual Disorders. *Int J Gynaecol Obstet*, 2011. 113(1): p. 1-2.
25. Munster, K., L. Schmidt, and P. Helm, Length and variation in the menstrual cycle--a cross-sectional study from a Danish county. *Br J Obstet Gynaecol*, 1992. 99(5): p. 422-9.
26. Urman, B. and K. Yakin, Ovulatory disorders and infertility. *J Reprod Med*, 2006. 51(4): p. 267-82.
27. Wathen, N.C., et al., Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 288(6410): p. 7-9.



28. Optimizing natural fertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2013. 100(3): p. 631-7.
29. McGovern, P.G., et al., Absence of secretory endometrium after false-positive home urine luteinizing hormone testing. *Fertil Steril*, 2004. 82(5): p. 1273-7.
30. Coutifaris, C., et al., Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*, 2004. 82(5): p. 1264-72.
31. Murray, M.J., et al., A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril*, 2004. 81(5): p. 1333-43.
32. Speroff, L. and M.A. Fritz, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th ed. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. x, 1334 p.
33. den Tonkelaar, I., E.R. te Velde, and C.W. Looman, Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. *Maturitas*, 1998. 29(2): p. 115-23.
34. Vegetti, W., et al., Premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. 161(1-2): p. 53-7.
35. Lawson, R., et al., Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod*, 2003. 18(3): p. 527-33.
36. Seifer, D.B., et al., Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1996. 66(4): p. 593-8.
37. Burger, H.G., et al., Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(11): p. 4025-30.
38. Kupesic, S., et al., Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril*, 2003. 79(1): p. 190-7.
39. Broekmans, F.J., et al., A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(6): p. 685-718.
40. Maseelall, P.B. and P.G. McGovern, Ovarian reserve screening: what the general gynecologist should know. *Womens Health (Lond Engl)*, 2008. 4(3): p. 291-300.
41. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2015. 103(3): p. e9-e17.

42. Scott, R.T., et al., Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, 1989. 51(4): p. 651-4.
43. Smotrich, D.B., et al., Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, 1995. 64(6): p. 1136-40.
44. Seifer, D.B., et al., Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril*, 1997. 67(1): p. 110-4.
45. Nardo, L.G., et al., Circulating basal anti-Mullerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2008.
46. Navot, D., Z. Rosenwaks, and E.J. Margalioth, Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*, 1987. 2(8560): p. 645-7.
47. Lass, A., et al., Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod*, 1997. 12(2): p. 294-7.
48. Bukulmez, O. and A. Arici, Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004. 16(3): p. 231-7.
49. Sonntag, B. and M. Ludwig, An integrated view on the luteal phase: diagnosis and treatment in subfertility. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012. 77(4): p. 500-7.
50. Fluker, M.R., et al., Exogenous gonadotropin therapy in World Health Organization groups I and II ovulatory disorders. *Obstet Gynecol*, 1994. 83(2): p. 189-96.
51. Knochenhauer, E.S., et al., Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(9): p. 3078-82.
52. Hamilton-Fairley, D. and A. Taylor, Anovulation. *BMJ*, 2003. 327(7414): p. 546-9.
53. Health and fertility in World Health Organization group 2 anovulatory women. *Hum Reprod Update*, 2012. 18(5): p. 586-99.
54. Westrom, L.V., Sexually transmitted diseases and infertility. *Sex Transm Dis*, 1994. 21(2 Suppl): p. S32-7.
55. Ghosh, M., et al., Association of Genital Chlamydia trachomatis Infection with Female Infertility, Study in a Tertiary Care Hospital in Eastern India. *Open Microbiol J*, 2015. 9: p. 110-6.

56. Zeyneloglu, H.B., A. Arici, and D.L. Olive, Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 1998. 70(3): p. 492-9.
57. Zhong, Y., et al., Effect of surgical intervention on the expression of leukemia inhibitory factor and L-selectin ligand in the endometrium of hydrosalpinx patients during the implantation window. *Exp Ther Med*, 2012. 4(6): p. 1027-1031.
58. Strandell, A., et al., Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2001. 16(11): p. 2403-10.
59. Daftary, G.S., et al., Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx. *Fertil Steril*, 2007. 87(2): p. 367-72.
60. Ozkan, S., W. Murk, and A. Arici, Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1127: p. 92-100.
61. Kerin, J., et al., Development and application of a falloposcope for transvaginal endoscopy of the fallopian tube. *J Laparoendosc Surg*, 1990. 1(1): p. 47-56.
62. Oral, E., et al., Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components. *Fertil Steril*, 1996. 66(5): p. 787-92.
63. Mastroianni, L., Jr., The fallopian tube and reproductive health. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 1999. 12(3): p. 121-6.
64. Yamashita, Y., et al., Influence of severe endometriosis on gene expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in granulosa cells from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 2002. 78(4): p. 865-71.
65. Cirkel, U., et al., Inflammatory reaction in endometriotic tissue: an immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1993. 48(1): p. 43-50.
66. Hajikhani, B., et al., Classical and Molecular Methods for Evaluation of Chlamydia trachomatis Infection in Women with Tubal Factor Infertility. *J Reprod Infertil*, 2013. 14(1): p. 29-33.
67. Berek, J.S. and E. Novak, *Berek & Novak's gynecology*. 14th ed. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxii, 1671 p.

68. Gonzales, D.S., et al., Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod*, 1996. 11(12): p. 2739-45.
69. Kodaman, P.H., A. Arici, and E. Seli, Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004. 16(3): p. 221-9.
70. Taylor, E. and V. Gomel, The uterus and fertility. *Fertil Steril*, 2008. 89(1): p. 1-16.
71. Pellicer, A., Shall we operate on Mullerian defects? An introduction to the debate. *Hum Reprod*, 1997. 12(7): p. 1371-2.
72. Acien, P., Incidence of Mullerian defects in fertile and infertile women. *Hum Reprod*, 1997. 12(7): p. 1372-6.
73. Homer, H.A., T.C. Li, and I.D. Cooke, The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril*, 2000. 73(1): p. 1-14.
74. Grimbizis, G.F., et al., Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update*, 2001. 7(2): p. 161-74.
75. Golan, A., et al., Congenital anomalies of the mullerian system. *Fertil Steril*, 1989. 51(5): p. 747-55.
76. Eldar-Geva, T., et al., Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertil Steril*, 1998. 70(4): p. 687-91.
77. Oliveira, F.G., et al., Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2004. 81(3): p. 582-7.
78. Pritts, E.A., W.H. Parker, and D.L. Olive, Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril*, 2009. 91(4): p. 1215-23.
79. Stavreus-Evers, A., et al., Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod*, 2002. 8(8): p. 765-9.
80. Zeyneloglu, H.B., et al., Immunohistochemical characteristics of intramural leiomyomata that enlarge during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest*, 2008. 65(4): p. 252-7.
81. Perez-Medina, T., et al., Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod*, 2005. 20(6): p. 1632-5.

82. Katz, Z., et al., Reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis in Asherman's syndrome. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1996. 41(5): p. 462-5.
83. Coughlan, C., et al., Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*, 2014. 28(1): p. 14-38.
84. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 2004. 82 Suppl 1: p. S160-3.
85. Eijkemans, M.J., et al., Pregnancy chances on an IVF/ICSI waiting list: a national prospective cohort study. *Hum Reprod*, 2008. 23(7): p. 1627-32.
86. Zeyneloglu, H.B., et al., Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 1998. 69(3): p. 486-91.
87. Wordsworth, S., et al., Clomifene citrate and intrauterine insemination as first-line treatments for unexplained infertility: are they cost-effective? *Hum Reprod*, 2011. 26(2): p. 369-75.
88. Guzick, D.S., et al., Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 1998. 70(2): p. 207-13.
89. Reindollar, R.H., et al., A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: the fast track and standard treatment (FASTT) trial. *Fertil Steril*, 2010. 94(3): p. 888-99.
90. Langman's Medical Embriology, in First week of development: Ovulation to implantation. 2010, Lippincott Williams and Wilkins. p. 31-50.
91. Berek, J.S. and E. Novak, *Berek & Novak's gynecology*. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
92. Dalcık H., Ö.E., İnsan gelişiminin başlangıcı: Birinci hafta, in *Klinik Yöneleri ile insan embriyolojisi*. 2002, Nobel Tıp Kitabevleri. p. 17-46.
93. Oktay, K., D. Briggs, and R.G. Gosden, Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(11): p. 3748-51.
94. Gougeon, A., Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 1996. 17(2): p. 121-55.
95. Sathanathan, A.H., et al., From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech*, 2006. 69(6): p. 396-407.
96. Christin-Maitre, S., et al., Homologous in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) reveals increased FSH biological signal during the mid- to late

- luteal phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(6): p. 2080-8.
97. McNatty, K.P., et al., The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. 49(5): p. 687-99.
  98. Richards, J.S., et al., Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res*, 1987. 43: p. 231-76.
  99. Parmegiani, L., et al., Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet*, 2010. 27(1): p. 13-6.
  100. Young, K.A., et al., Controlled ovulation of the dominant follicle: a critical role for LH in the late follicular phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 2003. 18(11): p. 2257-63.
  101. Pauerstein, C.J., et al., Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates. *Am J Obstet Gynecol*, 1978. 130(8): p. 876-86.
  102. Fritz, M.A., et al., Onset and characteristics of the midcycle surge in bioactive and immunoactive luteinizing hormone secretion in normal women: influence of physiological variations in periovulatory ovarian steroid hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 75(2): p. 489-93.
  103. Chandrasekher, Y.A., et al., Titrating luteinizing hormone surge requirements for ovulatory changes in primate follicles. II. Progesterone receptor expression in luteinizing granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. 73(3): p. 584-9.
  104. Chaffkin, L.M., A.A. Luciano, and J.J. Peluso, Progesterone as an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 75(6): p. 1404-8.
  105. Couzinet, B., et al., Progesterone stimulates luteinizing hormone secretion by acting directly on the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 74(2): p. 374-8.
  106. Yoshimura, Y., et al., The effects of proteolytic enzymes on in vitro ovulation in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol*, 1987. 157(2): p. 468-75.
  107. Vanderhyden, B.C., E.E. Telfer, and J.J. Eppig, Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod*, 1992. 46(6): p. 1196-204.
  108. Wilcox, A.J., C.R. Weinberg, and D.D. Baird, Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Hum Reprod*, 1998. 13(2): p. 394-7.

109. Division of Life Sciences and K.O.f.E. Excellence, Fertilization Process. Fertilization, ed. College of Arts and Sciences. 2010, Tokyo: The University of Tokyo.
110. Bailey, J.L., Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med*, 2010. 56(5): p. 334-48.
111. Overstreet, J.W., et al., In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertil Steril*, 1980. 34(6): p. 604-6.
112. Bedford, J.M., Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod*, 1998. 59(6): p. 1275-87.
113. Elder K, D.B., First Stages of Development in In vitro Fertilization:. 2011, Cambridge University Press. p. 64-77.
114. Larsen, W.J., et al., Human embryology. 3rd ed. 2001, New York: Churchill Livingstone. xix, 548 p.
115. Sadler, T.W., J. Langman, and T.W. Sadler, Langman's essential medical embryology. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
116. Cooke, S., et al., Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril*, 2002. 78(6): p. 1254-60.
117. Sadler, T.W. and J. Langman, Langman's essential medical embryology. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1 v. (various pagings).
118. Strowitzki, T., et al., The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(5): p. 617-30.
119. Gambino, L.S., et al., Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod*, 2002. 17(5): p. 1199-206.
120. Navot, D., et al., The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril*, 1991. 55(1): p. 114-8.
121. Tabibzadeh, S. and A. Babaknia, The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*, 1995. 10(6): p. 1579-602.
122. Vinatier, D. and J.C. Monnier, [The fetal-maternal interface. Description of its elements from an immunologic perspective]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 1990. 19(6): p. 691-700.

123. Burrows, T.D., A. King, and Y.W. Loke, Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*, 1996. 2(4): p. 307-21.
124. Schatz, F., et al., Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(8): p. 2504-10.
125. Paria, B.C., et al., Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*, 2002. 296(5576): p. 2185-8.
126. Makrigiannakis, A., et al., Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 2006. 17(5): p. 178-85.
127. Giudice, L.C., Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod*, 1999. 14 Suppl 2: p. 3-16.
128. Wilcox, A.J., D.D. Baird, and C.R. Weinberg, Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 1999. 340(23): p. 1796-9.
129. Martel, D., et al., Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol*, 1987. 114(2): p. 319-24.
130. Kabir-Salmani, M., et al., Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Hum Reprod*, 2005. 11(8): p. 553-9.
131. Stavreus-Evers, A., et al., Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril*, 2001. 76(4): p. 782-91.
132. Jurisicova, A., et al., Variability in the expression of trophoctodermal markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod*, 1999. 14(7): p. 1852-8.
133. Achache, H. and A. Revel, Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(6): p. 731-46.
134. Christian, M., et al., Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, 2001. 142(7): p. 3142-51.
135. Kammerer, U., Antigen-presenting cells in the decidua. *Chem Immunol Allergy*, 2005. 89: p. 96-104.
136. Fazleabas, A.T. and Z. Strakova, Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 186(2): p. 143-7.



137. Ghosh, D. and J. Sengupta, Recent developments in endocrinology and paracrinology of blastocyst implantation in the primate. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(2): p. 153-68.
138. Ghosh, D., P. De, and J. Sengupta, Luteal phase ovarian oestrogen is not essential for implantation and maintenance of pregnancy from surrogate embryo transfer in the rhesus monkey. *Hum Reprod*, 1994. 9(4): p. 629-37.
139. Yie, S.M., et al., Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril*, 2005. 83(1): p. 30-6.
140. Erlebacher, A., Why isn't the fetus rejected? *Curr Opin Immunol*, 2001. 13(5): p. 590-3.
141. Rai, R., G. Sacks, and G. Trew, Natural killer cells and reproductive failure--theory, practice and prejudice. *Hum Reprod*, 2005. 20(5): p. 1123-6.
142. Yoshinaga, K., Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs). *Am J Reprod Immunol*, 2010. 63(6): p. 413-24.
143. Harbour DV, B.J., Lymphocytes and lymphocytic hormones pregnancy. *Prog neuro endocr Immunol*, 1989. 2: p. 55-63.
144. Aghajanova, L., A.E. Hamilton, and L.C. Giudice, Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. 19(2): p. 204-11.
145. Lee, J., et al., Differentially expressed genes implicated in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(12): p. 2265-77.
146. Kao, L.C., et al., Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2002. 143(6): p. 2119-38.
147. Morton, H., Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol Cell Biol*, 1998. 76(6): p. 483-96.
148. Tsampalas, M., et al., Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol*, 2010. 85(1): p. 93-8.
149. Bonduelle, M.L., et al., Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod*, 1988. 3(7): p. 909-14.
150. Lopata, A. and D.L. Hay, The surplus human embryo: its potential for growth, blastulation, hatching, and human chorionic gonadotropin production in culture. *Fertil Steril*, 1989. 51(6): p. 984-91.

151. Stewart, D.R., et al., Enhanced ovarian steroid secretion before implantation in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76(6): p. 1470-6.
152. Stevens, V.C., Potential control of fertility in women by immunization with HCG. *Res Reprod*, 1975. 7(3): p. 1-2.
153. Licht, P., V. Russu, and L. Wildt, On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med*, 2001. 19(1): p. 37-47.
154. Yagel, S., et al., High levels of human chorionic gonadotropin retard first trimester trophoblast invasion in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77(6): p. 1506-11.
155. Dunglison, G.F., D.H. Barlow, and I.L. Sargent, Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod*, 1996. 11(1): p. 191-6.
156. Sharkey, A.M., et al., Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod*, 1999. 60(2): p. 355-64.
157. Cullinan, E.B., et al., Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(7): p. 3115-20.
158. Das, S.K., et al., Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, 1994. 120(5): p. 1071-83.
159. Singh, M., P. Chaudhry, and E. Asselin, Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*, 2011. 210(1): p. 5-14.
160. Makrigiannakis, A., et al., The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 1999. 5(9): p. 789-96.
161. van der Weiden, R.M., F.M. Helmerhorst, and M.J. Keirse, Influence of prostaglandins and platelet activating factor on implantation. *Hum Reprod*, 1991. 6(3): p. 436-42.
162. Holmes, P.V., A. Sjogren, and L. Hamberger, Prostaglandin-E2 released by pre-implantation human conceptuses. *J Reprod Immunol*, 1990. 17(1): p. 79-86.

163. Taylor, H.S., et al., HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest*, 1998. 101(7): p. 1379-84.
164. Minas, V., D. Loutradis, and A. Makrigiannakis, Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online*, 2005. 10(2): p. 205-16.
165. Meseguer, M., et al., Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*, 2001. 64(2): p. 590-601.
166. Simon, C., 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(8): p. 2607-16.
167. Simon, C., et al., Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod*, 1996. 2(6): p. 405-24.
168. Aplin, J.D., Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod*, 1997. 2(2): p. 84-93.
169. Lessey, B.A., et al., Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril*, 1994. 62(3): p. 497-506.
170. Sutherland, A.E., P.G. Calarco, and C.H. Damsky, Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*, 1993. 119(4): p. 1175-86.
171. Merviel, P., et al., The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diagn Ther*, 2001. 16(6): p. 364-71.
172. Vacca, R.A., et al., Differential expression of beta 1c integrin messenger ribonucleic acid and protein levels in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(2): p. 720-9.
173. Hamilton, G.S., et al., Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*, 1998. 244(1): p. 147-56.
174. Gleeson, L.M., et al., Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(6): p. 2484-93.
175. Klentzeris, L.D., et al., Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod*, 1993. 8(8): p. 1223-30.

176. Church, H.J., et al., Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells. *Lab Invest*, 1996. 74(1): p. 21-32.
177. Loke, Y.W., et al., Laminin in human trophoblast--decidua interaction. *Hum Reprod*, 1989. 4(4): p. 457-63.
178. Nagase, H., Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 1997. 378(3-4): p. 151-60.
179. VanSaun, M.N. and L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006. 78(1): p. 69-79.
180. Isaka, K., et al., Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta*, 2003. 24(1): p. 53-64.
181. Shimonovitz, S., et al., Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 178(3): p. 457-61.
182. Hardarson, T., et al., Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*, 2001. 16(2): p. 313-8.
183. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 2011. 26(6): p. 1270-83.
184. Weckstein, L.N., et al., Low-dose aspirin for oocyte donation recipients with a thin endometrium: prospective, randomized study. *Fertil Steril*, 1997. 68(5): p. 927-30.
185. Sher, G. and J.D. Fisch, Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril*, 2002. 78(5): p. 1073-6.
186. Tourgeman, D.E., et al., Endocrine and clinical effects of micronized estradiol administered vaginally or orally. *Fertil Steril*, 2001. 75(1): p. 200-2.
187. Ledee-Bataille, N., et al., Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*, 2002. 17(1): p. 213-8.
188. Barash, A., et al., Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2003. 79(6): p. 1317-22.
189. Raziel, A., et al., Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril*, 2007. 87(1): p. 198-201.

190. Cowchock, F.S., et al., Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 166(5): p. 1318-23.
191. Empson, M., et al., Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(2): p. CD002859.
192. Laskin, C.A., et al., Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. *J Rheumatol*, 2009. 36(2): p. 279-87.
193. Stern, C., et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies. *Fertil Steril*, 2003. 80(2): p. 376-83.
194. Fiedler, K. and W. Wurfel, Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res*, 2004. 9(4): p. 207-14.
195. Simur, A., et al., Repeated in vitro fertilization failure and its relation with thrombophilia. *Gynecol Obstet Invest*, 2009. 67(2): p. 109-12.
196. Gardner, D.K., et al., A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1998. 13(12): p. 3434-40.
197. Balaban, B., et al., Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril*, 2001. 75(3): p. 514-8.
198. Loutradis, D., et al., A double embryo transfer on days 2 and 4 or 5 improves pregnancy outcome in patients with good embryos but repeated failures in IVF or ICSI. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2004. 31(1): p. 63-6.
199. No: 27513, in *Resmi Gazete*. 6 Mart 2010.
200. Kattal, N., J. Cohen, and L.I. Barmat, Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2008. 90(4): p. 1069-76.
201. Barmat, L.I., et al., Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril*, 1998. 70(6): p. 1109-13.
202. Simon, C., et al., Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(8): p. 2638-46.
203. Zeyneloglu, H.B. and S. Kahraman, The use of coculture in assisted reproductive technology: does it have any impact? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009. 21(3): p. 253-9.

204. Cohen, J., et al., Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril*, 1989. 51(5): p. 820-7.
205. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: a review of the literature. A Committee opinion. *Fertil Steril*, 2008. 90(5 Suppl): p. S196-8.
206. Das, S., et al., Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(2): p. Cd001894.
207. Petersen, C.G., et al., Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reprod Biomed Online*, 2005. 10(2): p. 224-9.
208. Schieve, L.A., et al., Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril*, 2000. 74(2): p. 288-94.
209. Hershlag, A., et al., Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril*, 1999. 71(1): p. 144-6.
210. Ziebe, S., et al., Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1997. 12(7): p. 1545-9.
211. Alikani, M., et al., Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*, 1999. 71(5): p. 836-42.
212. Keltz, M.D., et al., Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2006. 86(2): p. 321-4.
213. Pehlivan, T., et al., Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*, 2003. 6(2): p. 232-7.
214. Baart, E.B., et al., Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2007. 22(4): p. 980-8.
215. Werlin, L., et al., Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 2003. 80(2): p. 467-8.
216. Gianaroli, L., et al., Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril*, 1999. 72(5): p. 837-44.
217. Voullaire, L., et al., Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*, 2000. 106(2): p. 210-7.

218. Cohen, J., D. Wells, and S. Munne, Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril*, 2007. 87(3): p. 496-503.
219. Goossens, V., et al., Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*, 2008. 23(3): p. 481-92.
220. Northrop, L.E., et al., SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod*, 2010. 16(8): p. 590-600.
221. Fragouli, E., et al., Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod*, 2011. 26(2): p. 480-90.
222. Yu, D., et al., Asherman syndrome--one century later. *Fertil Steril*, 2008. 89(4): p. 759-79.
223. Ledee-Bataille, N., et al., Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod*, 2002. 17(5): p. 1249-53.
224. Sher, G. and J.D. Fisch, Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Hum Reprod*, 2000. 15(4): p. 806-9.
225. Qublan, H., et al., Luteal phase support with GnRH-a improves implantation and pregnancy rates in IVF cycles with endometrium of  $\leq 7$  mm on day of egg retrieval. *Hum Fertil (Camb)*, 2008. 11(1): p. 43-7.
226. Gleicher, N., A. Vidali, and D.H. Barad, Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil Steril*, 2011. 95(6): p. 2123.e13-7.
227. Elizur, S.E., et al., Modified natural cycle using GnRH antagonist can be an optional treatment in poor responders undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet*, 2005. 22(2): p. 75-9.
228. Kadoch, I.J., [Natural cycle IVF (nIVF) in women with implantation failure]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2004. 33(1 Pt 2): p. S33-5.
229. Tomas, C., et al., The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy. *Hum Reprod*, 2002. 17(10): p. 2632-5.

230. Urman, B., et al., Comparing two embryo transfer catheters. Use of a trial transfer to determine the catheter applied. *J Reprod Med*, 2000. 45(2): p. 135-8.
231. Noyes, N., Hysteroscopic cervical canal shaving: a new therapy for cervical stenosis before embryo transfer in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1999. 71(5): p. 965-6.
232. Pabuccu, R., et al., Successful treatment of cervical stenosis with hysteroscopic canalization before embryo transfer in patients undergoing IVF: a case series. *J Minim Invasive Gynecol*, 2005. 12(5): p. 436-8.
233. Metcalf, D., The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*, 1985. 229(4708): p. 16-22.
234. Nagata, S., et al., Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 1986. 319(6052): p. 415-8.
235. Dale, D.C., et al., Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol*, 2003. 72(2): p. 82-93.
236. Gomez Raposo, C., A. Pinto Marin, and M. Gonzalez Baron, Colony-stimulating factors: clinical evidence for treatment and prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Clin Transl Oncol*, 2006. 8(10): p. 729-34.
237. Tweardy, D.J., et al., Molecular cloning of cDNAs for the human granulocyte colony-stimulating factor receptor from HL-60 and mapping of the gene to chromosome region 1p32-34. *Blood*, 1992. 79(5): p. 1148-54.
238. Fukunaga, R., et al., Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(22): p. 8702-6.
239. Avalos, B.R., Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 1996. 88(3): p. 761-77.
240. Dong, F., et al., A point mutation in the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) gene in a case of acute myeloid leukemia results in the overexpression of a novel G-CSF-R isoform. *Blood*, 1995. 85(4): p. 902-11.
241. Larsen, A., et al., Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J Exp Med*, 1990. 172(6): p. 1559-70.
242. Thomas, J., F. Liu, and D.C. Link, Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 2002. 9(3): p. 183-9.



243. Zhao, Y., H. Rong, and N. Chegini, Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod*, 1995. 53(4): p. 923-30.
244. McCracken, S., et al., Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. *J Endocrinol*, 1996. 149(2): p. 249-58.
245. Morstyn, G. and A.W. Burgess, Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res*, 1988. 48(20): p. 5624-37.
246. Duan, J.S., Production of granulocyte colony stimulating factor in decidual tissue and its significance in pregnancy. *Osaka City Med J*, 1990. 36(2): p. 81-97.
247. Brannstrom, M., et al., Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol Reprod*, 1994. 50(1): p. 88-94.
248. Calhoun, D.A., et al., Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res*, 1999. 46(3): p. 333-8.
249. Salmassi, A., et al., Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod*, 2005. 20(9): p. 2434-40.
250. Salmassi, A., et al., Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*, 2004. 81 Suppl 1: p. 786-91.
251. Makinoda, S., et al., Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet*, 1996. 55(3): p. 265-71.
252. Yanagi, K., et al., Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Hum Reprod*, 2002. 17(12): p. 3046-52.
253. Novales, J.S., et al., Maternal administration of granulocyte colony-stimulating factor improves neonatal rat survival after a lethal group B streptococcal infection. *Blood*, 1993. 81(4): p. 923-7.
254. McCracken, S.A., et al., Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biol Reprod*, 1999. 60(4): p. 790-6.

255. Litwin, S., et al., Comparative immunohistochemical study of M-CSF and G-CSF in feto-maternal interface in a multiparity mouse model. *Am J Reprod Immunol*, 2005. 54(5): p. 311-20.
256. Sugita, K., et al., Granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) suppresses interleukin (IL)-12 and/or IL-2 induced interferon (IFN)-gamma production and cytotoxicity of decidual mononuclear cells. *Am J Reprod Immunol*, 2003. 50(1): p. 83-9.
257. Pan, L., et al., Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*, 1995. 86(12): p. 4422-9.
258. Morris, E.S., et al., Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood*, 2004. 103(9): p. 3573-81.
259. Herrler, A., U. von Rango, and H.M. Beier, Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online*, 2003. 6(2): p. 244-56.
260. Piccinni, M.P., et al., Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol*, 2001. 31(8): p. 2431-7.
261. Rutella, S., et al., Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol*, 2005. 175(11): p. 7085-91.
262. Piccinni, M.P., et al., Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med*, 1998. 4(9): p. 1020-4.
263. Baart, E.B., et al., Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 2006. 21(1): p. 223-33.
264. Munne, S., et al., Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril*, 2005. 84(5): p. 1328-34.
265. Piscaglia, A.C., et al., Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology*, 2007. 133(2): p. 619-31.

266. Imamura, R., et al., Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol*, 2005. 175(4): p. 2647-54.
267. Yannaki, E., et al., G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*, 2005. 33(1): p. 108-19.
268. Tarlatzis, B.C., et al., Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update*, 2003. 9(1): p. 61-76.
269. Gargiulo, A.R., et al., Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil Steril*, 2004. 82 Suppl 3: p. 1226-34.
270. Robertson, S.A., GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. 18(3-4): p. 287-98.
271. Huyser, C., et al., Interleukin-1 beta, interleukin-6, and growth hormone levels in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet*, 1994. 11(4): p. 193-202.
272. Ledee, N., et al., Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Hum Reprod*, 2013. 28(2): p. 406-13.
273. Leese, H.J., et al., Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev*, 2008. 20(1): p. 1-8.
274. Miwa, I., et al., Pathophysiologic features of "thin" endometrium. *Fertil Steril*, 2009. 91(4): p. 998-1004.
275. Casper, R.F., It's time to pay attention to the endometrium. *Fertil Steril*, 2011. 96(3): p. 519-21.
276. Kasius, A., et al., Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2014. 20(4): p. 530-41.
277. Gleicher, N., et al., A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies. *Hum Reprod*, 2013. 28(1): p. 172-7.
278. Xu, B., et al., Two protocols to treat thin endometrium with granulocyte colony-stimulating factor during frozen embryo transfer cycles. *Reprod Biomed Online*, 2015. 30(4): p. 349-58.
279. Santjohanser, C., et al., Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013. 61(2): p. 159-64.

280. Wurfel, W., et al., High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Hum Reprod*, 2010. 25(8): p. 2151-2; author reply 2152.