

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**İN VİTRO FERTİLİZASYON-EMBRİYO
TRANSFERİ SIKLUSLARINDA GLYCODELİN-A,
GRANULOCYTE COLONY-STİMULATING
FACTOR VE L-SELECTİN DÜZEYLERİNİN
GEBELİK SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. MAHMUT GÜNGÖR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**İNVİTRO FERTİLİZASYON-EMBRYO
TRANSFERİ SIKLUSLARINDA GLYCODELİN-A,
GRANULOCYTE COLONY-STİMULATING
FACTOR VE L-SELECTİN DÜZEYLERİNİN
GEBELİK SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MAHMUT GÜNGÖR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Cemal POSACI

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 99.3456.23
sayı ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Kadın hastalıkları ve doğum alanındaki uzmanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile bu uzmanlık alanını sevmemde ve yetişmemde katkıda bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri, sayın hocalarım; Prof. Dr. Bülent GÜLEKLİ, Prof. Dr. Oktay ERTEN, Prof. Dr. Ata ÖNVURAL, Prof. Dr. Berrin ACAR, Prof. Dr. Namık DEMİR, Prof. Dr. Turhan USLU, Prof. Dr. Cemal POSACI, Prof. Dr. Yakup ERATA, Prof. Dr. Murat CELİLOĞLU, Doç. Dr. Uğur SAYGILI, Doç. Dr. Sabahattin ALTUNYURT, Doç. Dr. Serkan GÜÇLÜ, Doç. Dr. Erbil DOĞAN, Uzm. Dr. Bahadır SAATLI ve beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sayın hocalarım; Prof. Dr. Cemal POSACI, Prof. Dr. Bülent GÜLEKLİ, Doç. Dr. Erbil DOĞAN, Uzm. Dr. Bahadır SAATLİ, Dr. Cemil KAYMAZ, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Sezer UYSAL, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Reyhan UÇKU, Tüp Bebek Merkezi hemşirelerinden Melek ŞİMŞEKEL, Aysun ELLİALTIOĞLU, Asena UYGUR, Aysun SARIKAYA, Tüp Bebek Merkezi biyologlarından Fulya KARAGÖZ, Fulya AYDINER ve Dr.Seda ÖZBAL'a teşekkür ederim.

Dr. Mahmut GÜNGÖR

Şubat 2008

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	i
ÖZET... ..	1
İNGİLİZCE ÖZET.....	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	3-4
GENEL BİLGİLER.....	5-20
Sperm transportu ve kapasitasyon.....	5
Folikül gelişimi ve ovulasyon.....	6
Oosit transportu.....	7
İmplantasyon fizyolojisi.....	7-10
ART siklusları ve implantasyon.....	10-11
İmplantasyonda rol alan moleküller.....	12-17
ART sikluslarında implantasyon oranını artırma stratejileri.....	17-20
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21-24
BULGULAR.....	25-32
TARTIŞMA.....	33-37
SONUÇ.....	38
KAYNAKLAR.....	39-47

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

TABLO-1: IVF-ET siklus özellikleri.....	26
TABLO-2: Biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve implantasyon oranları.....	26
TABLO-3: Biyokimyasal gebeliklerde klinik ve embriyolojik veriler.....	27
TABLO-4: Klinik gebeliklerde klinik ve embriyolojik veriler.....	27
TABLO-5: Embriyo transfer zamanı servikal mukustaki belirteçler ve klinik gebelik.....	28
TABLO-6: ROC eğrisinde G-CSF düzeyleri.....	29
TABLO-7: Belirteçlerin oosit toplama ve embriyo transfer zamanı düzeyleri.....	29
TABLO-8: Embriyo transfer zamanı serum belirteçleri ve klinik gebelik.....	29
TABLO-9: Oosit toplama zamanı servikal mukustaki belirteçler ve klinik gebelik.....	30
TABLO-10: Embriyo transfer zamanı servikal mukustaki belirteçler ve biyokimyasal gebelik.....	30
TABLO-11: Embriyo transfer zamanı serum belirteçleri ve biyokimyasal gebelik.....	31
TABLO-12: Oosit toplama zamanı servikal mukustaki belirteçler ve biyokimyasal gebelik.....	31
TABLO-13: Embriyo transfer zamanı serum belirteçlerinin korelasyonu.....	31
TABLO-14: Oosit toplama zamanı servikal mukustaki belirteçlerin korelasyonu.....	32
TABLO-15: Embriyo transfer zamanı servikal mukustaki belirteçlerin korelasyonu.....	32
ŞEKİL-1: ART sikluslarında canlı doğum oranlarının yaşa göre dağılımları.....	4
ŞEKİL-2: Blastokistin zona pellusidasından ayrılması.....	9
ŞEKİL-3: Embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlayan faktörler.....	12
ŞEKİL-4: Endometrium epitelinde sekretuar fazda pinopod ekspresyonu.....	13
ŞEKİL-5: Siklus boyunca glycodelin-A'nın salınımı.....	16
ŞEKİL-6: Embriyonun endometriuma adhezyonunda L-selectinin rolü.....	17
ŞEKİL-7: Hastaların infertilite tiplerine göre dağılımları.....	25
ŞEKİL-8: ROC eğrisi.....	28

ÖZET

İNVİTRO FERTİLİZASYON-EMBRYO TRANSFERİ SIKLUSLARINDA GLYCODELIN-A, GRANULOCYTE COLONY-STİMLATİNG FACTOR VE L- SELECTİN DÜZEYLERİNİN GEBELİK SONUÇLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Amaç: IVF-ET (İnvitro fertilizasyon-embriyo transferi) sikluslarında endometrial reseptiviteyi gösteren glycodelin-A, G-CSF(Granulocyte Colony-Stimulating Factor) ve L-selectin düzeylerinin gebeliği öngörmedeki faydasını araştırmak.

Yöntem: Yaptığımız prospektif kohort çalışmada, implantasyon penceresi döneminin belirteçlerinden olan glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin'in IVF-ET sikluslarındaki düzeylerini araştırdık. Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezine Mart 2007 ile Mayıs 2007 tarihleri arasında IVF tedavisi için başvuran 56 infertilite hastası katıldı. Oosit toplama zamanı ve embriyo transferi sırasında alınan servikal mukus ve embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerini ölçtük. Bulduğumuz sonuçlarla da gebelik oranlarını karşılaştırdık.

Bulgular: Embriyo transfer zamanı servikal mukusta ölçülen ortalama G-CSF düzeyleri klinik gebelik pozitif olanlarda, klinik gebelik negatif olanlara göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,024$). Klinik gebeliği öngörmede kesme noktası olarak 1365 pg/ml değeri alındığında; sensitivite %76, spesifite %61,3 olarak hesaplandı. Diğer taraftan embriyo transfer zamanı servikal mukusta ölçülen glycodelin-A ve L-selectin düzeyleri ile gebelik sonuçları arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Embriyo transfer zamanı servikal mukusta ölçülen G-CSF ($p= 0,04$) ve L-Selektin ($p=0,002$) düzeyleri oosit toplama zamanındaki değerlere kıyasla anlamlı olarak yüksek saptandı.

Sonuç: IVF sikluslarında, endometrial reseptiviteyi gösteren belirteçleri embriyo transfer zamanı servikal mukusta araştırmak non-invaziv ve etkin bir yöntemdir. G-CSF implantasyonu öngörmede önemli bir belirteç olabilir.

Anahtar kelimeler: IVF-ET, Endometrial reseptivite, G-CSF, L-Selektin, glycodelin-A

SUMMARY

THE EFFECT OF GLYCODELIN-A, GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR AND L-SELECTIN ON PREGNANCY OUTCOMES IN IN-VITRO FERTILIZATION/EMBRYO TRANSFER CYCLES

Objective: To investigate the benefits of glycodelin-A, G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) and L-selectin levels, which indicate endometrial receptivity in IVF-ET (in-vitro fertilization/embryo transfer) cycles, in prediction of pregnancy.

Design: Prospective cohort study

Setting: University academic IVF center

Patient(s): March 2007 to May 2007, fiftysix IVF-ET cycles

Methods: In our study, we examined the levels of glycodelin-A, G-CSF and L-selectin, which are markers of the implantation window phase, in IVF-ET cycles. The glycodelin-A, G-CSF and L-selectin levels in cervical mucus and blood samples were measured. Cervical mucus samples were obtained during oocyte pick-up and embryo transfer. Blood samples were collected during embryo transfer only. The results were then compared with pregnancy rates.

Results: The mean G-CSF levels, which had been measured during embryo transfer, were significantly higher in clinical pregnancy positive women than in women with negative results ($p=0.024$). When a value of 1365 pg/ml was set as the cut-off point, sensitivity was calculated as 76% and specificity as 61.3 %. On the other hand, a significant relationship was not determined between the glycodelin-A and L-selectin levels in the cervical mucus, which had been calculated during embryo transfer, and pregnancy outcomes. It was determined that the G-CSF ($p=0.04$) and L-Selectin ($p=0.002$) levels in the cervical mucus, which had been measured during the embryo transfer, were significantly higher than those measured during oocyte pick-up.

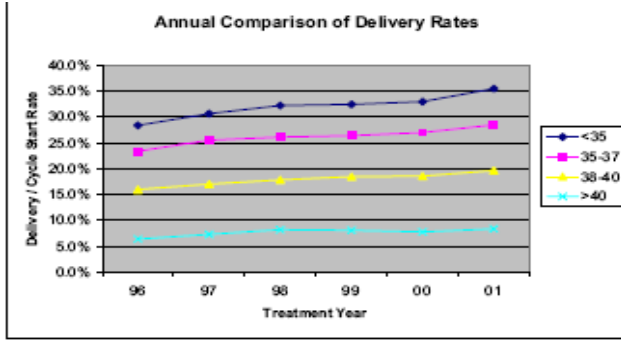
Conclusions: Investigating markers of endometrial receptivity in the cervical mucus during embryo transfer is a non-invasive and efficient method in IVF cycles. G-CSF may be an important marker in predicting implantation.

Key Words: IVF-ET, endometrial receptivity, G-CSF, L-selectin, glycodelin-A

GİRİS VE AMAC

Son yıllarda yardımcı üreme teknolojilerinde önemli gelişmeler olmasına rağmen, yardımcı üreme teknolojilerindeki implantasyon başarısızlığı çözülmeyi bekleyen bir problem olarak durmaktadır. IVF ve ICSI (intrasetoplazmik sperm enjeksiyonu) sikluslarında hCG (human koryonik gonadotropin) veya progesteron ile luteal faz desteğinin sağlanması implantasyon oranlarını arttırdığı ispatlanmıştır (1). Diğer yandan implantasyon oranlarını arttırmak için yardımcı tutunma (assisted hatching) ve implantasyon öncesi glukokortikoid tedavisinin etkileri henüz tartışmalıdır. Embriyo transfer tekniği, endometrial reseptivitenin yetersizliği, hastada myoma uteri ve hidrosalpinks olması ve embriyo kalitesinin düşüklüğü implantasyon başarısızlığının nedenleri olarak gösterilmektedir. Embriyonun tek başına implantasyon başarısızlıklarının üçte birinden sorumlu olduğu, diğer üçte ikisinden çoğunlukla endometrial reseptivitenin sorumlu olduğuna inanılmaktadır (2,3).

Avrupada 2003 yılı ART verilerine göre transfer başına klinik gebelik oranları IVF sikluslarında %29,6, IVF-ICSI sikluslarında %28,7, frozen embriyo transfer sikluslarında %18,6, oosit donasyon sikluslarında %37,9 olarak gerçekleşti. IVF sikluslarındaki gebeliklerin %10'u takip sırasında kaybedilirken, çoğul gebelik oranı %23,1 oldu. Transfer başına klinik gebelik oranlarında 1999–2003 yılları arasında fark gözlenmedi (4). Amerika Birleşik Devletlerinde 2001 yılı ART verilerine göre transfer başına klinik gebelik oranı IVF sikluslarında %40,6, frozen embriyo transfer sikluslarında %29,3, oosit donasyon sikluslarında %55,9 olarak gerçekleşti. IVF sikluslarındaki gebeliklerin %17,2'si takip sırasında kaybedilirken, çoğul gebelik oranı %35,9 oldu (5). Amerika Birleşik Devletlerinde yıllar içinde ART sikluslarında canlı doğum oranlarının yaşa göre dağılımları şekil 1 de gösterilmektedir. ABD verilerinde transfer başına klinik gebelik oranları ve çoğul gebeliklerin oranı Avrupa verilerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. ART sikluslarında hedefimiz implantasyon oranlarını arttırırken aynı zamanda çoğul gebelikleri de önlemek olmalıdır.



Şekil 1. Yıllar içinde ART sikluslarında canlı doğum oranlarının yaşa göre dağılımları (5).

Blastokist implantasyonu için endometrial reseptivitenin maksimum olduğu menstrual siklus aralığına implantasyon penceresi denir. Bu dönemde endometrial bezlerden çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve proteinler salgılanır (6). Son yıllarda implantasyon penceresi döneminin biyokimyasal belirteçleri üzerine olan çalışmalar artan ilgiyle devam etmektedir. Glycodelin-A, endometriumda glandüler hücreler tarafından salgılanan immünsupresif özelliği olan bir proteindir. Menstrual siklusun luteal fazı boyunca artan seviyelerde salgılanır (7). G-CSF hemotopoetik büyüme faktörleri ailesine ait bir sitokindir. Ovulasyon indüksiyonu uygulanan sikluslarda, seviyesinin kanda siklus boyunca yükseldiği gösterilmiştir. Foliküler sıvıda ovulasyon esnasında en yüksek değerlere ulaşmaktadır (8,9). L-selectin bir hücre adezyon molekülü olup, endometriumda ligandına bağlanmasıyla bir sinyal kaskatı aktif konuma geçer. Diğer hücre adezyon moleküllerleri de kendi ligandlarına bağlanır. Sonuçta embriyonun implantasyonu güçlenmiş olur (10).

Bir IVF-ET siklusunun başarısını belirleyen en önemli üç faktör vardır. Bunlar embriyo kalitesi, endometrial reseptivite ve atravmatik embriyo transferidir. Bu çalışmada IVF-ET siklusu uygulanan hastalarda oosit toplama zamanı ve embriyo transfer zamanı servikal mukusta ve embriyo transfer zamanı serum örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin implantasyon oranlarını etkileyip etkilemediği araştırıldı. Eğer bu üç belirteçin bir IVF-ET siklusunda, endometrial reseptivitenin bozulmasına bağlı oluşabilecek başarısız sonuçları önceden öngörebileceğini bulabilirsek, embriyo transferini erteleyip, tüm embriyoları dondurabilir ve implantasyona uygun siklusta transfer edebiliriz. Öte yandan araştırdığımız belirteçlerin düzeyleri endometrial reseptivite için yeterli düzeyde ise transfer edilecek embriyo sayısını azaltarak IVF sikluslarının önemli bir komplikasyonu olan çoğul gebelikleri önleyebiliriz.

GENEL BİLGİLER

Sperm ve oositin bir araya gelişi üremenin en önemli olaylarından biridir. Bu olayın gerçekleştiği bölge ve fertilizasyona katılan kaynaklar çalışılması zor bir alandır. Bu kısıtlamalar in-vitro fertilizasyon ile değişmiştir. Sperm ve oosit matürasyonu ve fertilizasyonundaki artan bilgiler yardımcı üreme tekniklerinin klinik kullanımının önemli yararlarından biridir.

Sperm transportu ve kapasitasyon

Spermatogenezin başlamasından yaklaşık 72 gün sonra sperm kaudal epididimis'e ulaşmaktadır. Kaudal epididimis ejakülasyon için gerekli spermleri depolamaktadır. Epididimisin sadece depolama görevi olduğu düşüncesi doğumsal vas deferens yokluğu olan erkeklerde in vitro uygulamalarda bu spermlerin dölleme yeteneği sonrasında gebeliklerin ve canlı doğumların gösterilmesi ile ispatlanmıştır (11). Ayrıca testiküler biopsi ile elde edilen tek bir spermın oosit içerisine enjeksiyonu (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) fertilizasyon ve gebelik elde edilmesinde son derece başarılıdır (12).

Spermin oositi dölleyebilmesi için kapasitasyon kazanması gerekir. Kapasitasyon özelliği; akrozom reaksiyonunu geçirebilme, zona pellusidaya bağlanabilme ve hipermotilitenin elde edilmesini içerir. Her ne kadar kapasitasyon spermın dışı genital kanalında geçireceği değişiklikler olarak tanımlansa da, özellikli mediumlarda kısa bir süre inkübasyon ile sperm, dışı üreme kanalında olmadan kapasitasyon kazanabilir. İn-vitro kapasitasyon için laktat, piruvat ve glukoz gibi enerji kaynakları ile albumin gibi protein içeren bir kültür mediumuna ya da serum veya foliküler sıvı gibi biyolojik bir sıvı içeren bir kültür mediumuna ihtiyaç vardır. Sperm yıkama işlemi kapasitasyonda başlangıç basamağı olarak muhtemelen sperm yüzeyindeki kılıfı ayırmaktadır. Sperm yüzeyinden kolesterolün ayrıştırılması spermi akrozom reaksiyonuna hazırlamaktadır. Kolesterolün kaybı zona pellusida için sperm yüzey reseptörleri ile ilgili olan sperm hücre membranında yüzey lestinlerinin ekspresyonunu ayarlamaktadır (13). İn-vitro kapasitasyon için gerekli ortalama zaman iki saattir (14).

Folikül gelişimi ve ovulasyon

Overin fizyolojik görevleri gametlerin periyodik olarak atılması ve steroid hormonlar olan estradiol ve progesteronun üretimidir. Over dışta korteks, içte santral medulla ve rete ovarii (hilus) olmak üzere üç major kısımdan oluşmaktadır. Oositler folikül olarak adlandırılan kompleksler içinde olup, korteksin iç kısmında yer alan stromal doku içinde gömülmüşlerdir.

Gestasyonun altı ile sekizinci haftalarında ovarian farklılaşmanın ilk işaretleri, germ hücrelerinin hızlı mitotik çoğalmasındır. 16–20. haftalarda altı ile yedi milyon oogoniaya ulaşılır. Bu gonadın ulaşabileceği maksimum kapasitedir ve bu dönemden sonra germ hücre sayısı giderek azalacaktır. Mitoz ile germ hücreleri oogoniaya dönüşürler. Oogoniyalar ilk mayotik bölünmeye girip profaz evresinde oositlere dönüşürler. Mayozun diploten evresine ilerlemesi doğumda tamamlanmaktadır. Oosit iki kez mayotik bölünme geçirir. Birincisi tam ovulasyon öncesinde, ikincisi ise sperm penetrasyon zamanındadır. Fazla genetik materyal ise, her mayotik bölünmede oluşan polar cisimcik ile atılmaktadır (15,16).

Primordiyal folikül mayozun profaz evresinde duraklamış olan bir oosit ve onun etrafında bir bazal membran tarafından çevrelenen tek katlı öncül granüloza hücreleridir. Foliküller değişik derecelerde olgunlaşmaya başlarlar. Öncül granüloza hücrelerinden oluşan tabakanın küboidal granüloza hücre tabakasına dönüşmesi ile primer folikülün oluşumu belirlenir. Daha tamamlanmamış granüloza hücre çoğalmasıyla preantral folikül oluşur. Folikülün içinde sıvı dolu boşluk oluşmasıyla da antral folikül meydana gelir. Bir primer folikülün ovulasyona ilerlemesinin 85 gün aldığı düşünülmektedir. Bu zamanın büyük kısmı gonadotropinlerden bağımsız olarak, FSH (Folikül Stimüle Edici Hormon) uyarısına hazır konuma gelmek için geçer (17,18). Menstrual siklusun erken dönemlerinde FSH bağımlı folikül olgunlaşma evresi görülür. Olgun olan foliküllerin sayısı gonada ulaşabilen FSH miktarına ve foliküllerin gonadotropinlere duyarlılığına bağlıdır. FSH reseptörleri granüloza hücre yüzeyinde en fazla oranda bulunmaktadır (19). Gelişme sırasındaki herhangi bir zamanda her bir folikül atrezi olarak adlandırılan bir süreç içinde duraksama olur ve geriler. Ovule olan her bir folikül için yaklaşık 1000 tanesi değişik uzunluktaki abortif büyüme dönemleri içinde kaybolacaktır. Gonadotropin uyarımı yeterli ise birkaç folikül biriminden bir tanesi çeşitli derecelerde olgunlaşma evrelerinden geçerek ovulasyona ulaşacaktır. Morfolojik olarak bu olaylar antral sıvı artışı ile antrumun genişlemesini ve avasküler granüloza ile

vaskülarize teka internayı ayıran sınırlayıcı membrana karşı granüloza hücrelerinin sıkıştırılmasını içerir. Antral sıvı artışı yavaşça oositi çevreleyen granüloza yığını olan kumulus ooforusu ayırır. Genişleyip ovarian kapsülden dışarı çıkıntı yapan folikülün yüzeyindeki tekanın incilmesi, ovarian kapsülü zayıflatan avasküler bir alanın oluşması ve son olarak da antrumun aniden genişleyip kumulus içindeki oositin dışarı atılması gerçekleşir (20).

Oosit transportu

Oosit, ovulasyon sırasında oositi folikül duvarına bağlayan granüloza hücreleri tarafından sarılmıştır. Oosit tarafında nonsellüler geçirgen glikoprotein tabaka olan zona pellusida bulunmaktadır. Midsiklustaki LH (luteinize hormon) tetiğine cevap olarak, matürasyonunda ilk mayotik bölünmesini tamamlamış oosit, ikinci mayotik bölünmeye girmekte ve ikinci metafazda duraklamaktadır. Oosit transportu ovulasyondan uterus içerisine girdiği morula aşamasını kapsamaktadır. Oosit fallop tüpündeki seyahatinin çok erken döneminde döllemektedir. İnsanda oosit fallop tüpünde yaklaşık 80 saat geçirmekte, bu zamanın %90'ı ampulla ve isthmik bölge geçişinde gerçekleşir. Bu sırada embryo klivaj evrelerini geçirmektedir. Başarılı bir gebelik için embryo ve endometrium arasında senkronizasyon olması gerektiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Eğer endometrium matürasyonu çok geri ya da ileri evrede ise implantasyon bu durumdan olumsuz etkilenmektedir (21,22).

İmplantasyon Fizyolojisi

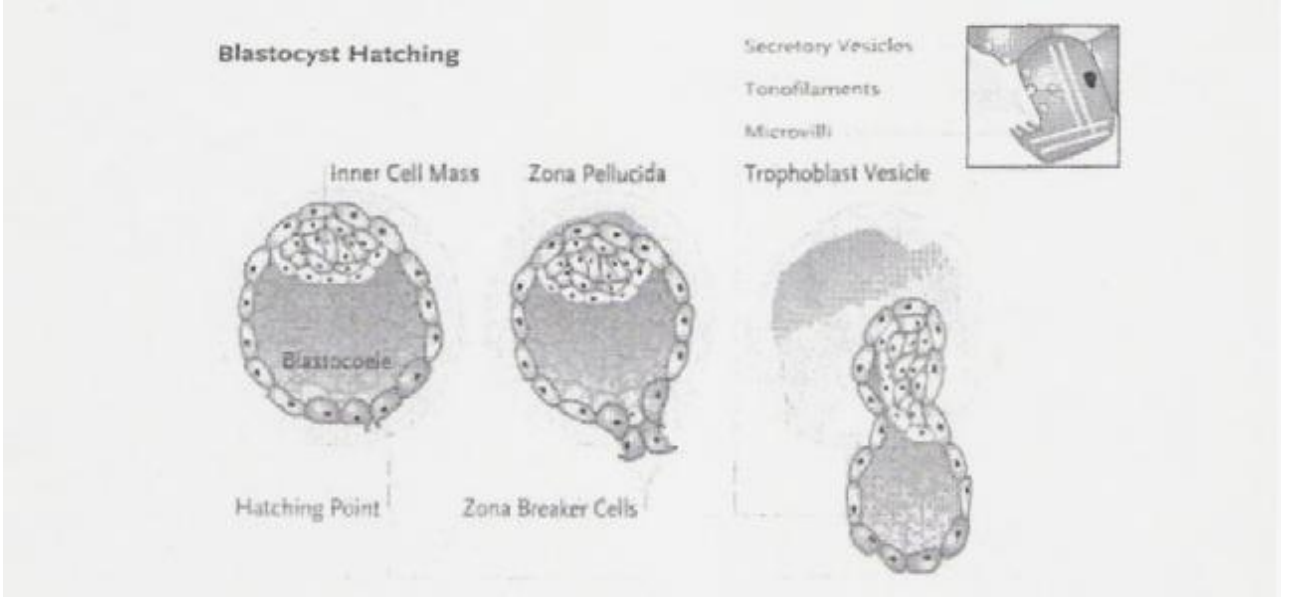
Fertilizasyondan üç gün sonra sekiz hücreli klivaj evresindeki embriyo oluşur. Bir gün sonra da morula aşamasındaki embriyo uterin kaviteye girmektedir. Otuz ile 200 hücre arasında değişen blastokist, fertilizasyonunun altı ile yedinci günlerinde zona pellusidanın ayrılmasından sonra endometriuma implante olur. Proliferatif endometriumdaki sekretuar endometriuma geçiş implantasyon için gerekli olan reseptivitenin elde edilmesi için son derece önemlidir. Proliferatif faz ovarian folikül gelişimi ve östrojen salınımının artımı ile birliktedir. Steroidal etki sonucu endometrium gelişmesi ve rekonstrüksiyon olur. Bu proliferasyon, özellikle blastokist implantasyon sahası olan uterusun üst üçte ikilik kısmında artan mitoz, nükleer DNA ve sitoplazmik RNA sentezi ile belirgin hale gelir. Östrojen ve progesteron reseptör konsantrasyonları ovulasyondan önce siklus ortasında tepe noktasına

ulaşır. Proliferasyon sırasında endometrium ortalama 0,5 mm'den 3,5–5 mm'lik tek kat kalınlığa ulaşır. Ovulasyondan sonra endometrium hem östrojene hemde progesterona karşı reaksiyon gösterir. Devamlı östrojen varlığına rağmen endometrial kalınlık preovulatar dönemde 5–6 mm olur. Stromal elemanların her biri büyümeye devam ederken endometrial kalınlığın sabit kalması bezlerde ve spiral damarlarda kıvrılmaya neden olur. Ovulasyon olduğunda ilk histolojik bulgu, siklusun 17–18. gününde subnüklear intrastoplazmik glikojen vakuollerinin bez epitelde görülmesidir. Dev mitokondriler ve nükleolar kanal sistemi bez hücrelerde görülür. Nükleolar kanal sistemi progesterona bağlı olarak görülen özgün bir oluşumdur. Bu yapısal değişiklikleri takiben glikoprotein ve peptidlerin endometrial kaviteye aktif sekresyonu başlar. Plazmanın transüstasyonu da endometrial sekresyona katkıda bulunur. Önemli immunglobulinler dolaşımdan alınır ve epitel etrafında yapılmış olan bağlayıcı proteinler ile kaviteye verilir. Sekresyonda tepe noktasına siklus ortası gonadotropin zirvesinden yedi gün sonra ulaşılır. Bu da blastokist implantasyonu ile aynı zamana denk düşmektedir. Endometrium implantasyon zamanında midluteal fazda 10–14 mm'lik çift kat kalınlığındadır. Endometrial reseptivite penceresi 28 günlük normal bir siklusun 20–24 günleri arasında sınırlandırılmıştır (23).

İmplantasyon embriyonun endometriuma tutunması ve epiteli geçip maternal dolaşım sistemine plasentayı oluşturmak için ulaşmasını kapsayan bir işlem olarak tanımlanmaktadır. İmplantasyon fertilize oositin uterus girişinden iki ile üç gün sonra olmaktadır (23). İmplantasyon; apozisyon, adhezyon ve invazyon olmak üzere üç evreden oluşmaktadır.

Apozisyon ve Adhezyon

İnsan blastokisti bir ile üç gün arası endometrial kavitede sekresyon içerisinde kalmaktadır. Bu süre içerisinde zona pellusidasından ayrılarak (hatching), endometrium epiteline tutunmaya hazırlanmaktadır. Blastokistin embriyonik kutbunun tersi bölgesinde hatching başlangıç noktası oluşur. 'Zona kırıcı hücreler' olarak adlandırılan özelleşmiş trofoblastik hücreler bu noktada toplanarak zona pelusidanın erimesini sağlarlar. Zona kırıcı hücreler zona pelusidayı eritebilen keseciklere sahiptirler. Mekanik olarak, mikrovilus ve monofilamanların kontraksiyonlarıyla da hatching işlemi gerçekleşir. Bu süre içinde blastokist bir iç hücre kitlesine (embriyo) ve bir trofoektoderme (plasenta) farklılaşır (şekil 2) (24).



Şekil 2. Blastokistin zona pellusidasından ayrılması (25).

Blastokist endometrium ile daha yakın bir temasa geldikçe yüzeyindeki mikroviluslar kısalır ve epitelyal hücrelerin luminal yüzeyindekiler ile bağlantı kurarlar. Sonuçta hücre membranlarının son derece yakın bir temasta olduğu ve bağlantı komplekslerinin kurulduğu adhezyon evresine ulaşılır. Adhezyon aşamasında integrin ve selektinleri de içeren tüm adhezyon molekülleri görev alır. Desidualize endometrium ve erken embriyo hücre adhezyonunu sağlayan laminin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks komponentlerini eksprese ederler (26). Bu dönemde büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte birçok molekül embriyo ile endometrium arasında sinyal iletimine yardımcı olarak adhezyonu sağlarlar. Glycodelin-A da immünsupresif özelliği ile embriyonun maternal reddini engeller (25).

İnvazyon

İmplantasyon işleminin başında trofoektoderm; dışta multinükleuslu sinsityotrofoblast ve içte sitotrofoblast tabakalarını oluşturmak üzere farklılaşır. Sinsityotrofoblast tabakası, aralarındaki hücre zarlarını kaybederek birbirleriyle birleşmiş olan trofoblast hücre ağından meydana gelir. Sinsityotrofoblast implantasyonun öncü birimini oluşturur. Endometriumda ekstraselüler matriks proteinlerini yıkmak için kollajenaz ve plazminojen aktivatörü gibi enzimleri salgılar. Plazminojen aktivatörü, plazminojenin plazmine dönüşümünü sağlayarak, metaloproteinazların salınmasına yol açar. Sonuçta matriks proteinleri yıkılarak, invazyon gerçekleşir. Uterin spiral arterioller sitotrofoblastlar ile invaze edilir ve maternal endotel

myometriyumun ilk üçte birlik kısmına kadar sitotrofoblastlar tarafından kaplanır (26). Trofoblastik aktivitenin kısıtlanması büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, enzimlerin, başlatıcı ve engel olucu faktörlerin arasındaki denge ile gerçekleşir. PAI-1 (Plazminojen aktivatör inhibitör), desidual hücrelerin major ürünüdür. Menstruasyon sırasında aşırı kanamayı ve erken gebelikte trofoblastik invazyonu sınırlar (27).

ART siklusları ve implantasyon

Yardımcı üreme teknolojilerinin kullanımı 1978 yılında doğan ilk IVF bebeğinden sonra gelişmeye devam etmektedir. Artık yüksek kalitedeki embriyolar seçilebilmekte ve endometriyum değerlendirilebilmektedir. Daha yüksek gebelik oranları, daha az çoğul gebelikler ve genetik olarak sağlıklı bebekler yardımcı üreme tekniklerinin günümüzdeki hedefleridir (28). Bütün gelişmelere rağmen, son 10 yılda gebelik oranlarında anlamlı bir artış olmamıştır (29). Henüz açıklığa kavuşturulamamış faktörler muhtemelen bu duruma neden olmaktadır.

Maymunlarda yapılan hayvan çalışmaları insanda implantasyonun farklı evreler içerdiğini düşündürmektedir. Blastokist endometriuma implantasyonu gerçekleştirmeden önce zona pellusidadan sıyrılarak apozisyon olur. İkinci adım olarak blastokist endometrial epitel yüzeyi ile temas ederek adhezyon gerçekleşir. Sonuçta blastokist epitelyal yüzeye penetre olur ve stromal invazyon meydana gelir (28).

Başarılı bir implantasyonun gerçekleşebilmesi için blastokistin belli bir zaman aralığında reseptif endometriyumla karşılaşması gerekir. Endometriyum menstrual siklus boyunca yeniden yapılırken ancak kısıtlı bir zaman aralığında embriyoya reseptif durumda olur. Bu zaman aralığına implantasyon penceresi dönemi denir. Doğal bir siklusta embriyo ovulasyondan ortalama dört gün sonra uterin kaviteye girer (30). Ovulasyondan altı ile sekiz gün sonra endometriyum blastokist implantasyonuna reseptif hale gelir. Ortalama dört gün boyunca reseptif halde kalır (31). Yüksek kalitedeki embriyoların alıcı annelere transferinin, verici annelere transferinden daha iyi implantasyon oranlarıyla sonuçlandığı çalışma; verici annelerde hiperstimülasyona bağlı estradiol yüksekliğinin endometrial reseptiviteyi olumsuz etkilediğini göstermektedir (32). Düşük embriyo kalitesi implantasyon başarısızlığının en önemli nedenlerinden biridir (33).

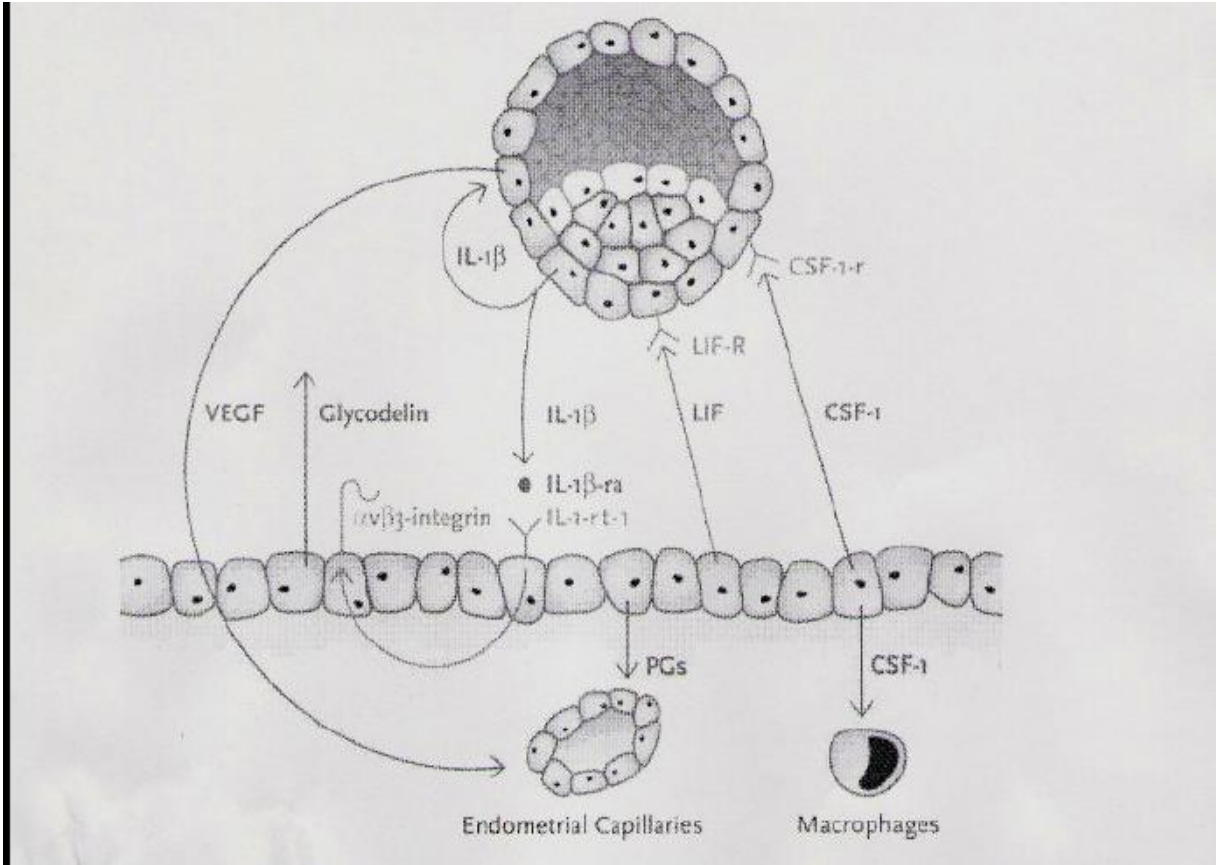
Ovarian stimulasyon uygulanan sikluslarda implantasyon oranını arttırmak için implantasyon penceresi dönemini belirleyebilmek ve seçilen en kaliteli embriyoyu bu dönemde transfer etmek gereklidir. Endometrial reseptiviteyi ve embriyo kalitesini, yardımcı üreme teknolojilerinin uygulandığı siklusa zarar vermeden değerdendirilebildiği yöntemlerin bulunması gerekir. İmplantasyon oosit matürasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometrium arasındaki kompleks ilişkiler sonucunda olur (34). Embriyo gelişimiyle endometrial matürasyonun senkronizasyon içerisinde olmasıyla başarılı blastokist implantasyonu gerçekleşir. Yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı sikluslarda implantasyon oranlarını arttırabilmek için endometrial reseptiviteyi gösteren ve invaziv olmayan yöntemler bulmak gerekir.

Sperm donasyonu kullanılarak yapılan intrauterin inseminasyon sikluslarında, siklus başına gebelik oranlarının yaşla birlikte azaldığı gözlenmiştir (35). Fertil kadınlarda human koryonik gonadotropin ölçüleriyle saptanan erken gebeliklerin üçte birinin klinik gebelik öncesi kaybedildiği anlaşılmıştır (36). Bu durum yumurta donasyon programlarında veya IVF sikluslarında %37 ve %48 gibi daha yüksek oranlarda gerçekleşir (37). İnsan embriyosunda yüksek oranlarda kromozomal anomaliler gözlenir. Embriyonik genetik anomali oranı yaşla birlikte artmaktadır. Genel populasiyona göre infertil çiftlerde embriyonik genetik anomali oranı daha yüksektir. Bu sorun ART sikluslarındaki implantasyon başarısızlığının en önemli nedenlerindedir (38,39).

Endometrial reseptiviteyi saptayabilmek için farklı yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Elektron mikroskopuyla endometrial ultra morfolojik yapılar incelenebilmektedir. Bu yöntemle endometrial reseptiviteyi gösteren pinopodlar ve nüklear kanallar gösterilebilir. Blastokistin endometriumda sadece pinopod bulunan alanlara implante olduğu ve pinopodların implantasyon pencere döneminde ortaya çıkması ve sonra kaybolması nedeniyle endometrial reseptivitenin belirteçi olabileceği bildirilmiştir (40). Ancak klinik olarak uygulanabilir bir yöntem değildir.

İmplantasyonda rol alan moleküller

Ovulasyondan 7–10 gün sonra her siklusta embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlamak amacıyla implantasyon penceresi döneminde birçok molekülün ekspresyonu meydana gelir. Embriyonun endometriuma implantasyonunda integrin molekülleri, L-selectin ligandları, mucin-1, HB-EGF(heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü) ve pinopodlar görev alır. Endometriumdan salgılanan sinyallere (lösemi inhibitör faktör reseptörü, colony stimulating faktör reseptörü, insulin-benzeri büyüme faktörü ve HB-EGF reseptörü) karşılık embriyodan sitokin ve büyüme faktörleri salgılanır. Glycodelin, inhibin ve interlökinler gibi immünmodülatör faktörler implantasyonda embriyonun maternal reddine engel olurlar. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve prostoglandinler implantasyonda angiogenezisde rol alırlar (25). (şekil 3)

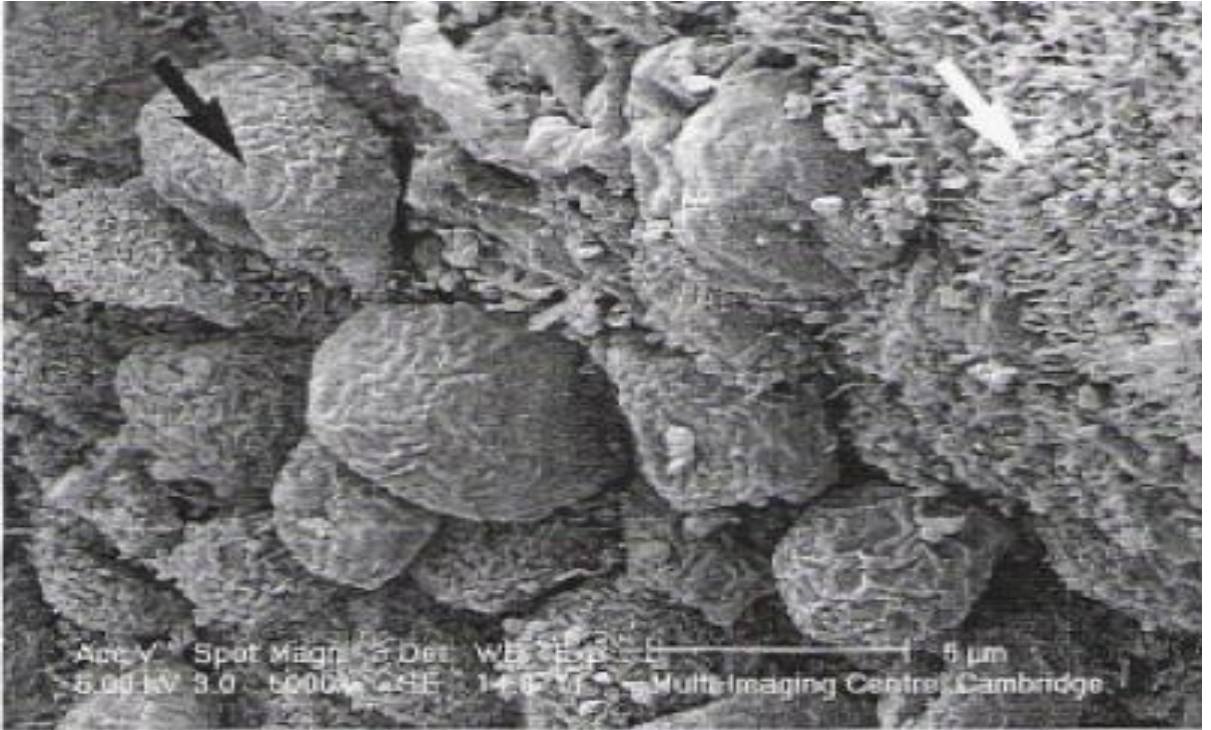


Şekil 3. Embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlayan faktörler (25).

Pinopodlar

Endometrium epitelinin apeksinde bulunan kabarcık şeklindeki çıkıntılardır. Elektron mikroskop yöntemi pinopodları tespit etmek için en yararlı yöntemdir. Luteal faz ortalarında

fertilitesi ispatlanmış 68 kadından endometrial biyopsi örnekleme ve kan örnekleme yapılmış. Progesteron seviyelerinde yükselmeye beraber pinopodların ortaya çıkışı elektron mikroskopuyla gözlenmiştir (41). Blastokist implantasyonu için endometrial reseptivitenin düzenlenmesinde HOXA-10 geni rol alır. Farelerde yapılan çalışmada HOXA-10 geninin bloke edilmesi endometrial histolojiyi etkilemezken, pinopod sayılarında azalmaya yol açmıştır (42). Beş fertilitesi ispat edilmiş kadından endometrial biyopsi örnekleme LH pikinden beş gün sonra alınmış ve blastokistin, endometrium örneklerinde implantasyon için pinopod bulunan bölgeleri tercih ettiği gösterilmiştir (40). Diğer taraftan luteal fazdan 11. gebelik haftasına kadar endometriumda pinopod oluşumunu gösteren çalışma; pinopodların implantasyon penceresi dönemine özgü olmadıklarını, belli bir süre progesteron etkisinde kalan endometriumda pinopod oluşumunun görüleceğini bildirmiştir (43). Endometrial reseptiviteyi göstermede pinopodların tespit edilmesi implantasyon oranlarını arttırmak için etkin bir yöntem değildir (şekil 4).



Şekil 4. endometrium epitelinde sekretuar fazda pinopod ekspresyonu (42).

Lösemi inhibitör faktör

LIF (Lösemi inhibitör faktör), birbirleriyle ilgili olan IL-6 (interlökin-6), IL-11 (interlökin-11), CT-1 (cardiotropin), OSM (oncostatin-M), CNTF (silier nörotrofik faktör),

CLC (cardiotropin-like cytokine), NP (neuropoietin) gibi sitokin grubuna ait, dört alfa-heliks yapısında bir sitokindir (42). Bu moleküller sinyal iletimini gp130 proteini yoluyla yaparlar. Farelerin endometrium epitelinden, blastokist implantasyonundan önce LIF mRNA ekspresyonunun artan seviyelerde gösterilmesi ve LIF geni olmayan farelerde implantasyon başarısızlığı olması, LIF'in implantasyonda önemli görevi olduğunu gösterir (44). Endometrial kavite yıkama sıvılarında LIF düzeyine LH pikinden 10 gün sonra bakmışlar. Açıklanamayan infertilite tanısı olan hastalarda LIF düzeyi normal fertil gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (45). LIF'in implantasyondaki görevini araştıran çalışmalar devam etmektedir.

İntegrinler

İntegrinler, 18 alfa ve sekiz beta zincire sahip glikoprotein yapıda hücre adezyon molekülleridir (46). İntegrin subüniteleri; ekstraselüler, intraselüler ve transmembranöz alanlar içerir. Embriyolojik gelişme, hemostaz, tromboz, yara iyileşmesi, immün ve non-immün savunma mekanizmaları ve onkojenik transformasyon gibi birçok fizyolojik olayda hücreler arası adezyonu sağlayarak görev alırlar (47). Düzenli adet gören, endometrial patolojisi olmayan 45 kadında menstrual siklus boyunca osteopontin ve onun reseptörü olan beta-3 integrin düzeyine immünohistokimyasal yöntemlerle bakmışlar ve geç sekretuar fazda salınımlarının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (48). Progesteron indirekt ve direkt yollarla endometrium epitelinden beta-3 integrin ve osteopontin ekspresyonunu artırır. İndirekt olarak stromal hücrelerde büyüme faktörlerinin düzeyini artırır ve büyüme faktörleri de parakrin yolla beta-3 integrin ekspresyonunu sağlar. Diğer taraftan progesteron direkt olarak da endometrium epitelinden beta-3 integrin ve osteopontin ekspresyonunu sağlayabilir (49).

Vasküler endotelial büyüme faktörü

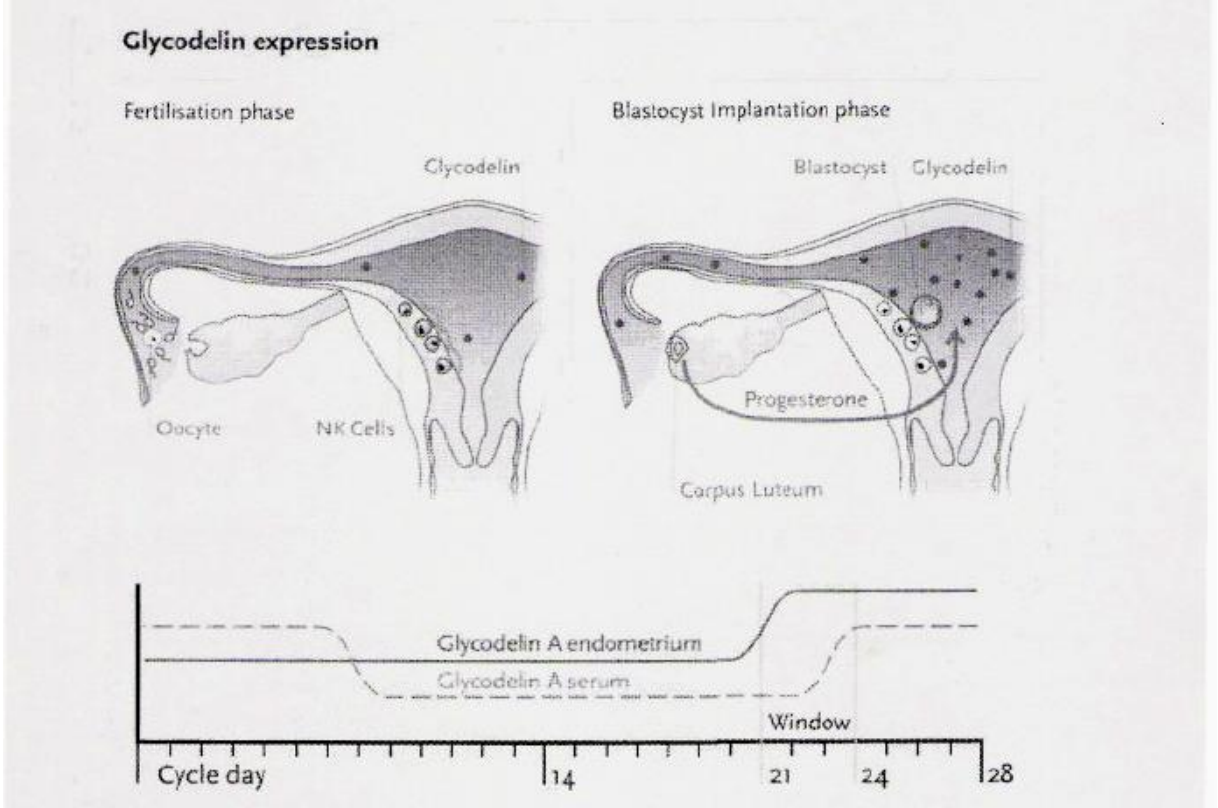
VEGF, altıncı kromozom üzerine yerleşmiş, insan vücudunun değişik bölgelerinde angiogenezisde görev alan bir büyüme faktörüdür (50). Embriyonun implantasyonu ve plasantasyonu için angiogenezis gereklidir. VEGF, angiogeneziste önemli bir faktör olarak, embriyonun implantasyonunda görev alması muhtemeldir (51). Bir çalışmada, VEGF düzeyinin kan örneklerinde gonadotropin uygulamasıyla düştüğü ve embriyo transfer zamanı serum VEGF düzeyi yüksek olan IVF hastalarında gebelik oranlarının daha yüksek olduğu

gösterilmiştir (52). VEGF ölçümlerinin implantasyonda belirteç olarak diagnostik değerinin olabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Glycodelin-A

Glycodelin matür formu 162 aminoasit rezidüsü içerir ve ağırlığının %17,5'ni karbonhidratlardan oluşturur. Glycodelinin glikolizasyonundaki farklılıklara bağlı olarak üç farklı izoformu mevcuttur (6). Glycodelin-A uterin lümene progesteron etkisiyle salgılanan major proteindir. Çoğunlukla amnion sıvısında bulunur. Glycodelin-A ve glycodelin-F foliküler sıvıda da bulunurken glycodelin-S seminal plazmada bulunur. Over, serviks ve fallop tüpü tarafından glycodelin salgılandığı invitro çalışmalarla gösterilmiştir (7).

Glycodelin-A aynı zamanda plasental protein 14 (PP14) veya progesterone associated endometrial protein (PEP) olarak da bilinen, geç sekretuar endometrium tarafından sentez edilen major glikoproteindir. Glycodelin-A ovulasyondan dört ile beş gün sonra salgılanmaya başlar ve menstruasyona kadar devam eder. Gebelik esnasında desiduadan glycodelin-A salgısı artarak devam eder (şekil 5). Glycodelin-A immünosupresif özelliğinden dolayı fetusun yabancı cisim olarak implantasyon alanından reddini engeller (25). Glycodelin-A sahip olduğu karbonhidrat sekansıyla spermin zona pellusidaya yapışmasını engeller. Glycodelin-A' nın ovulasyon sırasında yokluğu fertilizasyona olanak sağlarken ovulasyondan sonra artışı implantasyonun ve gebeliğin devamını sağlar. İn vivo çalışmalar göstermiştir ki glycodelin-A salınımı korpus luteumdan salgılanan progesteron ve relaxin hormonları sayesinde gerçekleşir (7). Durand ve arkadaşları (53) yaptıkları bir çalışmada; acil kontrasepsiyon yöntemi olarak LH pikinden üç dört gün önce hastalara 12 saat arayla iki doz levonorgestrel verilmiş ve daha sonra luteal faz boyunca glycodelin-A seviyelerine bakılmış. Glycodelin-A seviyesinin erken yükselmesinin ardından luteal faz boyunca kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde salgılandığı gözlenmiş. Glycodelin-A erken yükselerek spermin zona pellusidaya yapışmasını engellediği ve luteal faz süresince seviyesinin düşük olması nedeniyle de endometrial reseptivitenin azalmasına yol açtığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 5. Siklus boyunca glycodelin-A'nın salınımı (25).

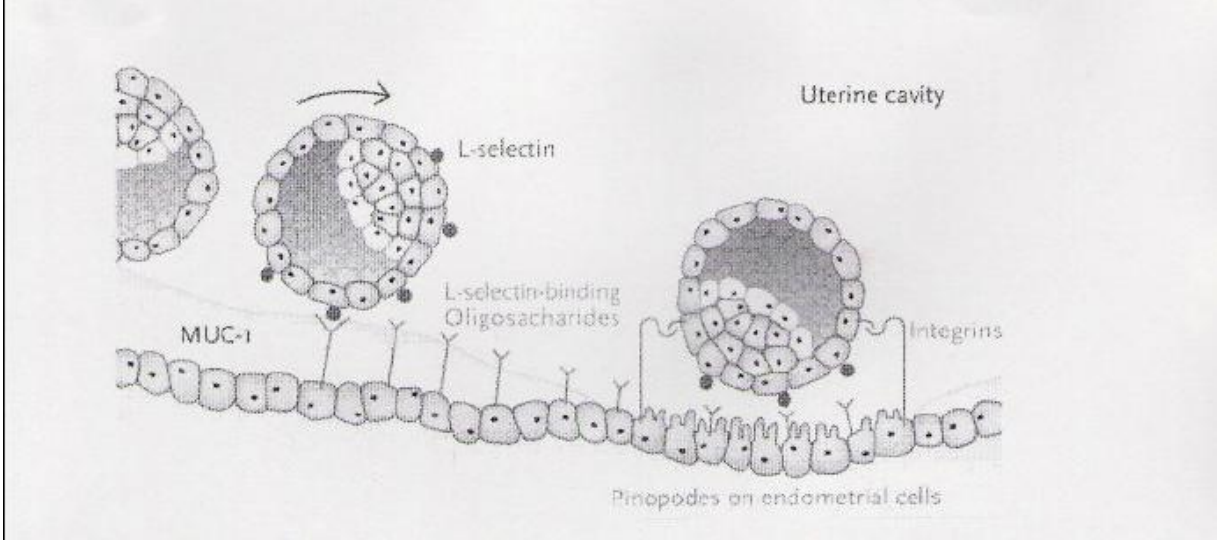
G-CSF

Sitokinlerin ovarian fonksiyon için önemli lokal faktörler olduğu görülmektedir. G-CSF hemotopoetik büyüme faktörleri ailesine aittir (54). Primer olarak hemotopoetik hücrelerden üretilmesine rağmen osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel, epitel, insan over ve endometriumu tarafından da üretilir (55). Ovarian stimülasyon uygulanan sıklüslarda beyaz küre hücrelerinin arttığı, sonuç olarak da G-CSF düzeyinin kanda siklus boyunca yükseldiği gösterilmiştir (8,9). Bazı araştırmacılar da G-CSF düzeyinin ovulatuvar fazda en fazla arttığını, bu yüzden G-CSF'nin ovulasyonda önemli role sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (56). Bir başka çalışmada servikovajinal sıvıda ve periferik kanda implantasyon belirteci olabilmesi için sitokinler çalışılmış, M-CSF ve EGF en yararlı biyokimyasal belirteçler olarak bulunmuştur (57).

L-selectin

Selektinler hücre adezyon molekülleri grubunun üyeleri olarak P-selectin , L- selectin ve E-selectinden oluşurlar. Bütün selektinler en az %30 karbonhidrat içeren glikoproteindirler

(58). Embriyonun endometriuma bağlanması için trofoblastlardan salgılanan L-selectin ile endometriumdaki oligosakkarid yapıları L-selectin ligandı köprü oluştururlar. L-selectinin ligandına bağlanmasıyla bir sinyal kaskadı aktif konuma geçerek diğer hücre adezyon moleküllerinin (integrinler ,tropofinin , HB-EGF) kendi ligandlarına bağlanması gerçekleşir. Böylece embriyonun endometriuma adezyonu pekişmiş olur (şekil 6) (10). Bu nedenle L-selectinler endometrial reseptiviteyi göstermede önemli biyokimyasal belirteçler olabilirler. L-selectinler endometriumun değişik fazlarında farklı seviyelerde salınırlar. Luteal fazda upregüle olurlarken proliferatif fazda downregüle olurlar. L-selectin, sekretuar fazın başlangıcından post-ovuluar beş ile yedinci günlerde pik seviyesine ulaşırken, post-ovuluar 9–11. günlerde seviyesinde düşmeler başlar. L-selectinler luminal epitelden glandüler epitele göre daha fazla salınırlar (58).



Şekil 6. Embriyonun endometriuma adhezyonunda L-selektinin rolü (25).

ART sikluslarında implantasyon oranını artırma stratejileri

ART 'de çoğul gebelikleri azaltmak için tek embriyo transferine doğru bir eğilim vardır. Bu nedenle embriyo seçimi giderek önem kazanmaktadır. Morfolojik değerlendirme embriyo seçimi için standart bir yöntem haline gelmiştir. Embriyolojik gelişme daha iyi anlaşıldıkça in vitro kültür teknikleri de gelişmiştir. Buna rağmen embriyo gelişim evrelerinden hangisinde transferin yapılması konusunda ortak bir fikir oluşturulamadı. Bazıları blastokist evresinde, bazıları da klivaj veya iki pronükleus (2PN) evresinde embriyo transferi yapmaktadır (28). Embriyo kalitesini değerlendirmede morfolojik yöntemin subjektif olması nedeniyle yeni

yöntemler araştırılmaktadır. Embriyo kültür mediumunda besin tüketimini ve metabolik sekresyonların ölçümüne yönelik yöntemler araştırılmaktadır (59).

Endometrial kalınlığın, IVF-ET sikluslarında hCG verilme günü transvaginal ultrason ölçümleriyle ince bulunmasının implantasyon oranlarını olumsuz etkilediği geniş ölçüde kabul edilmiştir. HCG verilme günü dokuz mm endometrial kalınlık kesme noktası olarak alındığında dokuz mm'nin altındaki ölçümlerde gebelik oranları anlamlı olarak düşük bulunmuştur (60). HCG verilme günü 14 mm'nin üzerinde endometrial kalınlığın implantasyon oranlarını olumsuz etkilemediği, endometrial kalınlığın foliküler stimülasyon süresi ile doğru orantılıyken hasta yaşı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (61). Retrospektif olarak 1294 IVF siklusunun incelendiği araştırmada; hasta yaşı ve embriyo kalitesinden bağımsız olarak endometrial kalınlık arttıkça gebelik oranlarının arttığı bulunmuştur (62).

Farelerde yapılan çalışmada; ovarian stimülasyonun embriyo kalitesine ve endometrial reseptiviteye zarar vererek, implantasyon oranlarını azalttığı gösterilmiştir (63). Prospektif olarak, IVF-ET siklusuna dahil olan 55 hastada yapılan çalışmada; recombinant FSH, GnRH antagonist ve hCG'nin oosit toplama zamanı endometrial matürasyon üzerine etkisi araştırılmış. Stimülasyon başlama günü LH düzeyinin yüksekliği ve antagonist ekleninceye kadar ki recombinant FSH tedavisinin süresinin uzunluğunun, oosit toplama zamanı endometrial matürasyonun normal histolojiye göre daha ileri evrede olmasına neden olduğu bulunmuştur. Normal histolojiye göre üç günün üzerinde gelişmiş endometriumlarda gebelik gözlenmemiştir (64). IVF-ET sikluslarında, doğal sikluskardaki hormonal değişimlere benzeyen stimülasyon protokolleri geliştirebilirsek implantasyon oranlarını arttırabilmek mümkün olabilir.

Preimplantasyon genetik tanı (PGD) ilk olarak genetik bozukluk taşıyan ve genetik olarak etkilenmiş bebek sahibi olma riski olan çiftler için geliştirildi (65). Son zamanlarda preimplantasyon genetik tarama (PGS) herediter hastalık taşımayan infertil çiftlerde IVF sonuçlarını optimize etmek için kullanılmaya başlandı (66). Gametlerin kromozal analizleriyle, erken preimplantasyon embriyolarında yüksek oranda kromozal hata olduğu saptandı. Düşük IVF başarısı olan çiftlerde implantasyon oranını arttırabilmek için PGS yönteminden yararlanılmaya başlandı. Fertilizasyon öncesi ilk polar cisimcik veya

fertilizasyon sonrası ikinci polar cisimcik çıkarılarak genetik inceleme yapılabilir. Klivaj evresi embriyodan blastomerler çıkarılarak veya blastokist evresi embriyoda trofoektoderm dokusu çıkarılarak da PGS yapılabilir (67).

PGS ve PGD aynı teknolojilerin kullanılması nedeniyle benzer tedavi yöntemleri olarak sunulurlar. Aslında farklı endikasyonlar nedeniyle kullanılırlar. PGS, IVF-İCSİ tedavisi uygulanan subfertil çiftlerde implantasyon oranlarını arttırmak için kullanılırken, PGD, fertil çiftlerde genetik bozukluklardan etkilenmiş çocuk sahibi olmayı önlemek için kullanılır. PGS'nin, ileri maternal yaş, tekrarlayan IVF başarısızlığı, tekrarlayan düşükler ve TESE-İCSİ durumlarında kromozomal anomali riski arttığı için kullanım endikasyonu vardır. Bugüne kadar ki yapılan randomize kontrollü çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, henüz PGS'nin implantasyon oranlarını arttırdığı sonucu ortaya çıkmamıştır (68). Mersereau ve arkadaşları (69) PGS uygulaması için endikasyon kısıtlılığı koymadan yaptıkları prospektif randomize kontrollü çalışmada, PGS'nin implantasyon oranlarını arttırmadığını bulmuşlardır.

ART sikluslarındaki önemli bir soru da embriyo transferinin zamanlamasıdır. Blastokist evresine kadar beklemenin faydası daha iyi kalitede embriyo seçimine olanak tanınması ve embriyo ile endometrium arasındaki senkronizasyonun daha fizyolojik olmasıdır. İyi kalite blastokist transferinde anöploidi riski de azalmaktadır. Diğer taraftan kültür mediumlarının, henüz embriyo gelişimi için endometrial kavite kadar yeterli olmaması nedeniyle iyi klivaj evresi embriyoların kaybedilmesi riski vardır. Seçilmemiş hasta grubunda blastokist transferinin canlı doğum oranlarını artırma ve çoğul gebelik oranlarını azaltma başarısı henüz gösterilememiştir (70). İyi prognoza sahip genç hasta grubunda blastokist transferinin canlı gebelik oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (71).

Özellikle ileri yaştaki kadınlarda, ART sikluslarında, blastokist transferi uygulandığında blastokistin zona pellucidan ayrılmasındaki başarısızlık nedeniyle implantasyon oranları düşmektedir. Bu sorunu aşmak için zona pellucidanın bir kısmının çıkarılması veya assisted hatching yöntemi uygulanır. Assisted hatching yöntemi gebelik oranlarını artırırken canlı doğum ve spontan abortus oranlarına bir etkisi yoktur. Diğer taraftan çoğul gebelik oranlarını arttırmaktadır (72).

ART sikluslarında uygulanan kontrollü ovarian stimulasyon doğal fizyolojik s¼reci değiştirerek embriyo gelişimini ve endometrial reseptiviteyi etkilemektedir. Ovarian stimulasyon, ¼strojen ve progesteron d¼zeylerini ve bu iki hormonun birbirlerine oranlarını değiştirir. Sonuç olarak, bu hormonların endometrial resept¼r ekspresyonu da değişir. ART sikluslarında amaç birden çok mat¼r folik¼l oluşturmaadır. Bu y¼ntem de doğal sikluslara g¼re daha y¼ksek ¼strojen ve progesteron seviyelerine yol aarak endometrial reseptivitenin etkilenmesine neden olur (73). Stimulasyon uygulanan siklusların doğal sikluslardan farklı şekilde embriyo ve endometrial reseptiviteyi etkilediği bilinmektedir. İmplantasyon başarısızlığının tamamı embriyo seçim yanlışlığına veya kromozal anomalilere bağlanamaz. ART siklusuna zarar vermeden en az invaziv y¼ntemlerle endometrial reseptiviteyi g¼steren biyokimyasal belirteçleri bulmak gerekir. Biz de bu amaçla, IVF-ET sikluslarında endometrial reseptiviteyi g¼steren glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin d¼zeylerinin gebeliği ¼ng¼rmedeki faydasını servikal mukus ve serum ¼rneklerinde araştırdık.

GEREC VE YÖNTEMLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezine Mart 2007 ile Mayıs 2007 tarihleri arasında IVF tedavisi için başvuran infertilite hastaları çalışmaya dahil edildi. İn vitro matürasyon uygulanacak olan hastalar çalışma dışında bırakılırken, IVF/ICSI yöntemi uygulanacak olan veya intauterin inseminasyon siklusundan hipersitimülasyon nedeniyle IVF siklusuna dönen hastalar da çalışmaya dahil edildi. Yaş, infertilite tipi, 3.gün folikül stimüle edici hormon (FSH) ve östradiol (E2) değerleri ve IVF siklus sayısı gibi değişkenler çalışmaya uygunluk kriterleri içine dahil edilmedi. Bu süre içinde kabul ve dışlama kriterlerine uygun 59 hasta yazılı ve sözlü onam vererek çalışmaya katıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulundan izin alınarak çalışmaya başlandı.

Hastalara GnRH analogu (Lucrin; Abbott, Fransa / Suprefact; Sanofi Aventis, Almanya) ile bir önceki siklusun luteal fazının ortasından başlayarak uzun protokol ile hipofizer down regülasyon yapıldıktan sonra bireyselleştirilmiş dozlarda rekombinant FSH (FSH; Gonal-F, Serona, İtalya / Puregon; Organon, Hollanda) veya Human Menopozal Gonadotropin (Menogon; Ferring, Almanya / Menopur; Ferring, Almanya) ile indüksiyon başlandı. Yedi hastaya ise gonadotropin tedavisi başladıktan beş ile altı gün sonra GnRH antagonist (Orgalutron; Organon, Hollanda / Cetrotide; Serona, Almanya) tedavisi eklenerek eksojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Folliküler büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi. En az iki follikül çapı 18 mm olunca 10.000 IU Human Koryonik Gonadotropin (HCG; Pregnyl, Hollanda) uygulandı. Oosit toplama işlemi HCG yapıldıktan sonra, ortalama 36 saat sonra intravenöz sedasyon altında, transvaginal USG (7MHz, Siemens, Japonya) eşliğinde yapıldı. Sedasyon için midazolam (dormicum ampul 5mg/5ml,Roche) 0,02mg/kg, fentanyl (fentanyl citrate ampul, Abbott) 1mcg/kg ve propofol (propofol flakon500mg/ml, Abbott) 1mg/kg dozlarında kullanıldı.

Oositlerin toplanması için vajen steril salin solüsyonuyla yıkanmadan önce, servikal os'a bir dakika süreyle oftalmik sünger (BD visispear eye sponge; BD visitec, A.B.D) uygulandı. Bu yöntemle alınan servikal sekresyon örnekleri, kapaklı plastik tüplere yerleştirilerek -80 °C' de saklanmak üzere hemen transport edildi. Oosit toplama öncesi

mesane kalıcı olmayan foley sonda ile boşaltıldı. Steril bir kılıf içindeki transvajinal prob (7MHz) ve beraberinde tutturulmuş aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belgium) overleri görmek ve folikülleri en büyük çapından aspire etmek için kullanıldı. Özel olarak planlanmış 16 G'lik iğneler ile 10mm'den büyük foliküllere keskin olarak girilerek 125 mmHg vakum basıncında(Storz, Almaya) foliküler sıvı ve oositler aspire edildi. Aspire edilen sıvı, aspirasyon iğnesi çıkarılmadan hemen incelendi. Eğer oosit bulunamadıysa folikül içine tekrar sıvı (Hams F-10) verilerek aspirasyon yapıldı.

Oosit toplama işleminden sonra hastaların eşlerinden masturbasyon ile semen örneği alındı. Spermier swim up ve yoğunluk gradienti santrifugasyon yöntemi ile hazırlandı. Ayrılan spermier kapasitasyon amacıyla 0,5-4 saat protein içeren mediumda (Quin's Sperm Washing Medium, Sage Media, A.B.D) inkübasyona bırakıldı. Genelde her oosit 50-100 bin sperm ile beraber 37 °C'de, %5'lik karbon dioksitli ve %98'lik nemli ortamda (Heraus inkübatör, Almanya) bekletildi. Fertilizasyon, inseminasyon veya ICSI işleminden 16-20 saat sonra mikroskop altında iki ayrı pronukleusun görülmesi ile tespit edildi. Klivaj 24 saat sonra değerlendirildi. Embriyo transferi, inseminasyon veya ICSI işleminden yaklaşık 48-72 saat sonra yapıldı. Embriyo kalitesi; hücre sayısı, simetri, blastomerlerin şekli, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmentasyonların büyüklüğü ve klivaj oranı dahil edilerek morfolojik özelliklere dayanarak hesaplandı (74). Grade 1 embriyo: % 0 fragmentasyon, grade 2 embriyo: %0-25 arası fragmentasyon, grade 3 embriyo: %25-50 arası fragmentasyon ve grade 4 embriyo: > %50 fragmentasyon oranı olarak hesaplandı.

Embriyo transferi öncesinde vajen steril salin solüsyonuyla yıkanmadan önce, servikal os'a bir dakika süreyle oftalmik sünger (BD visispear eye sponge; BD visitec, A.B.D) uygulandı. Bu yöntemle alınan servikal sekresyon örnekleri kapaklı plastik tüplere yerleştirilerek, -80 °C' de saklanmak üzere hemen transport edildi. Transabdominal ultrasonografi (5MHz, Siemens, Japonya) rehberliğinde transfer kataterinin (Wallace, Smiths, İngiltere Labotect, Almanya) ucu fundusa dokunmadan yaklaşık 0,5-1 cm altında iken midkaviteye embriyo transferi yapıldı. Transfer kataterinde embriyo kalıp kalmadığı kontrol edildikten sonra işleme son verildi. Embriyo transfer zamanında hastalardan düz tüpe konmak üzere serum kan örnekleri de alındı. Alınan kan örnekleri 2000 devirde 10 dk süreyle santrifüj edildi ve serum kısmı ayrıldı. Elde edilen serumlar -80 °C'de dondurularak saklandı.

Hasta litotomi pozisyonunda 30dk istirahat ettikten sonra taburcu edildi. Luteal faz desteği doğal progesteron (Progestan kapsül,100mg, Koçak, Türkiye) 600 mg/gün, intravaginal uygulama ile sağlandı. Biyokimyasal gebelik embriyo transferi sonrası 12. günde serum β -hCG ölçümü >25 mIU/ml ise ve klinik gebelik transvaginal USG’de bir veya daha fazla gebelik kesesi görölmesi ile tanıldı. Servikal sekresyon ve serum örnekleri biyokimyasal analizin yapılacağı zamana kadar -80 °C’de saklandı.

Biyokimyasal analiz:

Oftalmik süngerler Castle ve arkadaşları (75) tarafından tanımlanmış yöntemle ekstrakte edildi. Her sünger absorbe ettiği sekresyon miktarını belirlemek üzere tartıldı. Süngerler 300 μ L ekstraksiyon tamponunda 30 dakika 4°C’de bekletildi. Ekstraksiyon tamponu fosfat tamponu, NaCl (0,25 M), Aprotinin (100 μ g/mL) ve Sodyum azid (% 0,001) bileşenlerinden oluştu. Daha sonra Spin-X santrifüj filtre tüpleri (Corning, Sigma) kullanılarak 16000 g’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Aynı miktarda ekstraksiyon tamponu ile yeniden yıkama yapılarak hemen santrifüj yapıldı. İki ekstraksiyon volümü birleştirilerek analiz yapılincaya kadar -80 °C’de saklandı. Kuru süngerlerin (y) ve sekresyon absorbe edilmiş süngerlerin (x) ağırlığı kullanılarak dilusyon faktörü hesaplandı: $[(x-y)+0,6g \text{ tampon}]/(x-y)$, tamponun dansitesi 1,005g/mL olup 0,6mL tamponun ağırlığı 0,603g olarak alındı. L-Selectin (Bender MedSystems Inc., A.B.D), G-CSF (Biosource, A.B.D) ve Glycodelin-A (DRG, Almanya) kitleri ile ELISA yöntemi ile çalışıldı. Geri kazanım çalışması için her test için çalışılan en yüksek standart konsantrasyonu seçildi. Standartlar süngerlere 100 μ L miktarında eklenerek 10 dk beklendi. Örneklerle uygulanan ekstraksiyon işlemi uygulanarak örneklerle birlikte analiz yapıldı. Geri kazanımlar: L-Selektin: %81,26, G-CSF: %62,54, Glycodelin-A : %74,75. Ölçümlerdeki değişme miktarları; L-selektin: %4,66, glycodelin-A: %8,64 ve G-CSF için %5,4 olarak olarak gerçekleşti.

İstatistiksel analiz:

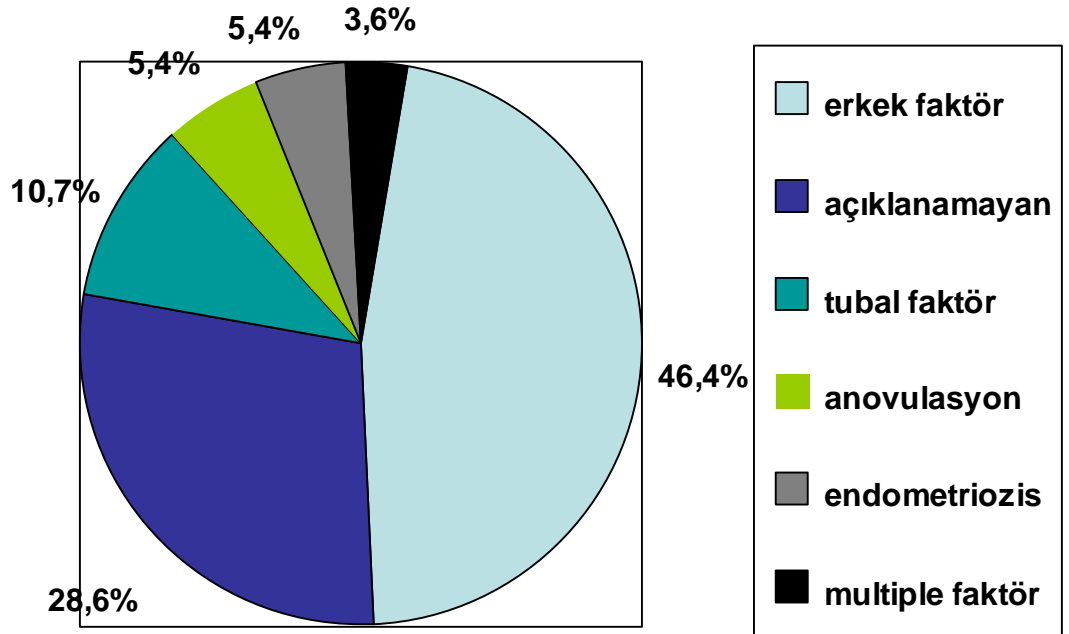
Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,0) programı kullanılarak analiz edildi. Servikal mukustaki G-CSF, Glycodelin-A ve L-selektin’in oosit toplama ve embryo transfer zamanındaki düzeylerinin karşılaştırılması için Parametrik Bağımsız T testi uygulandı. Biyokimyasal gebelik müspet olan ve olmayan, klinik gebelik müspet olan ve olmayan şeklinde iki grup oluşturuldu. Gruplar arasında GM-CSF,

Glycodelin-A ve L-selektin düzeyleri açısından farklılık olup olmadığını tespit etmek için non-parametrik Mann-Whitney U Testi kullanıldı. G-CSF, L-selektin ve glycodelin-A'nın embriyo transfer zamanı ve oosit toplama zamanı servikal mukusta ve embriyo transfer zamanı serum örnekleri arasında Pearson korelasyon analizi yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma kriterlerine uygun 59 hastadan, 2 tanesinde fertilizasyon gerçekleşmediği için ve 1 tanesinde de TESE sırasında sperm bulunamadığı için çalışma dışı bırakıldı. Toplam 56 hastanın verileri analiz edildi.

Elli altı hastadan 48 tanesi GnRH agonist uzun protokol, altı tanesi GnRH antagonist protokol ile tedavi edilirken, iki tanesi de OHSS nedeniyle intrauterin inseminasyon siklusunun iptaliyle ART siklusuna dahil oldular. Yirmisekiz hastada biyokimyasal gebelik, 24 hastada intrauterin gebelik ve bir hastada da dış gebelik gelişti. Çalışmaya dahil olan hastaların infertilite tiplerine göre dağılımları şekil 7 de yüzdeler halinde gösterilmektedir. Erkek faktör 26 hasta, açıklanamayan infertilite 16 hasta, tubal faktör 6 hasta, anovulasyon 3 hasta, endometriozis 3 hasta, multiple faktör 2 hasta şeklinde infertilite tiplerinin dağılımları gerçekleşti.



Şekil 7. Hastaların infertilite tiplerine göre dağılımları

Tablo–1: IVF-ET siklus özellikleri

n=56	Ortalama Değer±SD	Üst- Alt sınır
Yaş	31,6±4,66	21–40
3. gün bazal E ₂ (pg/ml)	52,06±28,73	20–168
3. gün bazal FSH (mIU/ml)	6,82±2,55	1,54–16,20
IVF siklus sayısı	1,35±0,58	1–3
Toplam gonadotropin dozu (IU)	3117,67±1833,04	700–9000
Toplam gonadotropin süresi (gün)	11,58±2,47	8–22
Toplam oosit sayısı	12,73±7,48	1–36
Toplam embryo sayısı	8,14±5,08	1–22
Transfer edilen embryo sayısı	3,48±0,91	1–5
Transfer edilen embryo kalitesi (grade)	1,64±0,57	1–4

SD: Standart deviasyon

Çalışmaya alınan hastaların ortalama yaşı, üçüncü gün ortalama FSH değerleri, üçüncü gün ortalama E₂ değerleri, IVF siklus sayısı, hastalarda kullanılan gonadotropin dozu ortalaması, kullanılan gonadotropin süresi ortalaması, toplanan oosit sayısı ortalaması, elde edilen embriyo sayısı ortalaması, transfer edilen embriyo sayısı ortalaması, transfer edilen embriyo kalitesi ortalaması tablo–1 de gösterilmektedir.

Tablo–2: Biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve implantasyon oranları

	oran	yüzde
Biyokimyasal gebelik	28/56	%50,00
Klinik gebelik	25/56	%44,64
İmplantasyon oranı	49/195	%20,51

İmplantasyon oranı: gestasyonel kese sayısı/transfer edilen embryo sayısı

Çalışmaya alınan hastalarda biyokimyasal gebelik, klinik gebelik ve implantasyon oranları tablo 2 de gösterilmektedir.

Tablo-3: Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda klinik ve embriyolojik veriler

n=56	Biyokimyasal gebelik(+) (n=28)	Biyokimyasal gebelik(-) (n=28)	p değeri*
yaş	31,4±4,5	31,8±4,8	0,72
3. gün bazal E ₂ (pg/ml)	45,21±20,27	58,91±34,25	0,11
3. gün bazal FSH (mIU/ml)	6,79±2,47	6,85±2,67	0,68
Toplam gonadotropin dozu(IU)	3421±2074	2813±1533	0,40
Toplam gonadotropin süresi(gün)	11,46±2,11	11,71±2,82	0,93
hCG günü Endometrial kalınlık(mm)	9,77±2,06	10,05±2,27	0,59
Toplam oosit sayısı	12,78±8,22	12,67±6,82	0,73
Toplam embriyo sayısı	8,03±5,30	8,25±4,94	0,75
Transfer edilen embriyo sayısı	3,60±0,83	3,35±0,98	0,15
Transfer edilen embriyo kalitesi (grade)	1,70±0,58	1,58±0,57	0,43

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Tablo-4: Klinik gebelik pozitif olan ve olmayanlarda klinik ve embriyolojik veriler

n=56	Klinik gebelik(+) (n=25)	Klinik gebelik(-) (n=31)	p değeri*
yaş	31,2	31,9	0,67
3. günE ₂ (pg/ml)	45,31	57,51	0,13
3.gün FSH(mIU/ml)	6,50	7,08	0,51
Toplam gonadotropin dozu (IU)	3288	2980	0,70
Toplam gonadotropin süresi (gün)	11,52	11,64	0,82
hCG günü Endometrial kalınlık (mm)	9,96±2,10	9,88±2,22	0,86
Toplam oosit sayısı	13,28±8,53	12,29±6,63	0,96
Toplam embriyo sayısı	8,60±5,34	7,77±4,92	0,47
Transfer edilen embriyo sayısı	3,60±0,86	3,38±0,95	0,19
Transfer edilen embriyo kalitesi (grade)	1,61±0,45	1,66±0,66	0,96

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Klinik gebelik ve biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda yaş, 3.gün bazal E₂, 3. gün bazal FSH, toplam gonadotropin dozu, toplam gonadotropin süresi, hCG günü endometrial kalınlık, toplam oosit sayısı, toplam embriyo sayısı, transfer edilen embriyo sayısı ve transfer edilen embriyo kalitesi değerleri karşılaştırıldı. Aralarında istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı (tablo-3) (tablo-4).

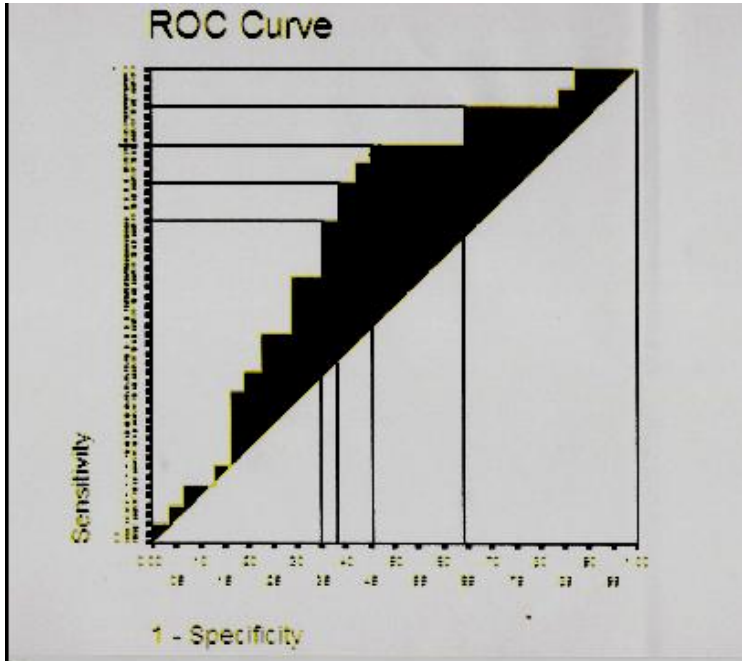
Tablo-5: Klinik gebelik pozitif olan ve olmayanlarda embriyo transferi sırasında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Klinik gebelik(+) (n=25)	Klinik gebelik(-) (n=31)	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	276,91±19,79	265,65±113,73	0,77
G-CSF pg/ml	2461,43±2021,28	1732,64±1523,23	0,024
L-selectin ng/ml	104,87±57,37	87,46±58,62	0,24

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Klinik gebelik pozitif olan ve olmayan hastalarda embryo transferi sırasında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. Glycodelin-A ve L-selectin ortalama düzeyleri klinik gebelik pozitif olan hastalarda daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. G-CSF düzeyi ise klinik gebelik pozitif olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu (p:0,024) (tablo-5).



Şekil-8: Embriyo transfer zamanı servikal mukustaki G-CSF düzeylerinin klinik gebelik müspet olan ve olmayanlarda ROC eğrisindeki dağılımları

Tablo-6:ROC eğrisinde servikal mukustaki G-CSF düzeylerinin hesaplanması

Kesme noktası	sensitivite	spesifite	Pozitif prediktif değer	Negatif prediktif değer	kappa	Like hood ratio
871pg/ml	%92	%35,5	%53,5	%84,6	0,257	1,42
1106pg/ml	%84	%54,8	%60	%81	0,374	1,85
1365pg/ml	%76	%61,3	%61,3	%76	0,364	1,96
1595pg/ml	%68	%64,5	%60,7	%71,4	0,321	1,91

Klinik gebelik pozitif olan ve olmayanlarda, embriyo transfer zamanı servikal mukustaki G-CSF düzeylerinin ROC eğrisindeki dağılımları şekil 8 de gösterilmektedir. ROC eğrisinde bire en yakın dört noktadan kesme noktası alınarak, G-CSF için sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve olabilirlik oranları hesaplandı (tablo-6).

Tablo-7: Oosit toplama zamanı ve embriyo transfer zamanı servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selektin düzeylerinin karşılaştırılması

n=56	OPU zamanı	ET zamanı	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	261,11±124,85	270,68±111,11	0,67
G-CSF pg/ml	1544,98±1251,12	2057,99±1783,82	0,046
L-selectin ng/ml	66,39±58,92	95,23±58,20	0,002

* Bağımsız T-test

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Opu: oosit toplama, et:embriyo transfer

Oosit toplama zaman ve embriyo transfer zamanı servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. G-CSF düzeyinin oosit toplama zamanına göre embriyo transfer zamanında istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptandı (p:0,046). L-selectin düzeyi de oosit toplama zamanına göre embriyo transfer zamanında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı (p:0,002). Glycodelin-A düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0,679)(tablo-7).

Tablo-8: Klinik gebelik pozitif olan ve olmayanlarda embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Klinik gebelik(+) (n=25)	Klinik gebelik(-) (n=31)	P değeri*
Glycodelin-A ng/ml	9,52±4,28	9,66±4,64	0,86
G-CSF pg/ml	57,84±11,01	60,17±14,07	0,55
L-selectin ng/ml	2068,64±626,39	2358,46±625,30	0,11

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Klinik gebelik pozitif olan ve olmayan hastalarda embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. İstatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (tablo-8).

Tablo-9: Klinik gebelik pozitif olan ve olmayanlarda oosit toplama zamanında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Klinik gebelik(+) (n=25)	Klinik gebelik(-) (n=31)	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	258,48±108,79	263,24±138,20	0,92
G-CSF pg/ml	1534,26±1090,31	1553,62±1385,11	0,70
L-selectin ng/ml	58,73±56,40	72,57±61,09	0,32

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Klinik gebelik pozitif olan ve olmayan hastalarda oosit toplama zamanında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. İstatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (tablo-9).

Tablo-10: Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda embriyo transferi sırasında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Biyokimyasal gebelik(+) (n=28)	Biyokimyasal gebelik(-) (n=28)	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	289,75±113,88	251,77±106,96	0,26
G-CSF pg/ml	2293,75±1969,46	1822,24±1577,29	0,13
L-selectin ng/ml	105,57±54,61	84,93±60,79	0,15

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Biyokimyasal gebelik pozitif olan hastalarda embriyo transferi sırasında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin'in ortalama değerleri, biyokimyasal gebelik negatif olan hastaların ortalama değerlerinden yüksek çıkmasına rağmen istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo-10).

Tablo-11: Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Biyokimyasal gebelik(+) (n=28)	Biyokimyasal gebelik(-)(n=28)	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	9,31±4,26	9,88±4,68	0,56
G-CSF pg/ml	57,43±10,75	60,83±14,45	0,37
L-selectin ng/ml	2074±591,26	2383,44±653,65	0,09

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayan hastalarda embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. İstatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (tablo-11.)

Tablo-12: Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda oosit toplama zamanında alınan servikal mukus örneklerindeki glycodelin-A, G-CSF, L-selectin düzeylerinin karşılaştırılması

	Biyokimyasal gebelik(+) (n=28)	Biyokimyasal gebelik(-)(n=28)	p değeri*
Glycodelin-A ng/ml	267,33±109,51	254,89±140,29	0,61
G-CSF pg/ml	1519,25±1029,72	1570,70±1458,39	0,41
L-selectin ng/ml	66,51±58,04	66,27±60,86	0,92

* Mann-Whitney U Testi

Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak sunulmuştur

Biyokimyasal gebelik pozitif olan ve olmayanlarda oosit toplama zamanı alınan servikal mukus örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeyleri karşılaştırıldı. İstatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (tablo-12).

Tablo-13: Embriyo transfer zamanı serum örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin korelasyonu

n=56	r	p değeri*
Glycodelin-A / G-CSF	-0,222	0,10
G-CSF / L-selectin	-0,052	0,70
L-selectin / Glycodelin-A	0,206	0,12

*Pearson Korelasyon Analizi

Embriyo transfer zamanı serum örneklerinde glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldı. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı (tablo-13).

Tablo–14:Oosit toplama zamanı servikal mukusta glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin korelasyonu

n=56	r	p değeri*
Glycodelin-A / G-CSF	0,410	0,02
G-CSF / L-selectin	0,411	0,002
L-selectin / Glycodelin-A	0,430	0,001

*Pearson Korelasyon Analizi

Oosit toplama zamanı servikal mukusta glycodelin-A, G-CSF ve L-selektin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldı. G-CSF ile L-selektin, L-selektin ile Glycodelin-A ve Glycodelin-A ile G-CSF arasında pozitif yönde düşük düzeyde korelasyon saptandı (tablo–14).

Tablo–15:Embriyo transfer zamanı servikal mukusta glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin korelasyonu

n=56	r	p değeri*
Glycodelin-A / G-CSF	0,084	0,54
G-CSF / L-selectin	0,319	0,016
L-selectin / Glycodelin-A	0,149	0,27

*Pearson Korelasyon Analizi

Embriyo transfer zamanı servikal mukusta glycodelin-A, G-CSF ve L-selectin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldı. G-CSF ile L-selectin arasında pozitif yönde düşük düzeyde korelasyon saptandı (tablo–15).

Embriyo transfer zamanı serum ve servikal mukustaki G-CSF, glycodelin-A ve L-selectin düzeyleri arasında pearson korelasyon analizi yapıldı. Aralarında anlamlı korelasyon saptanmadı. G-CSF, glycodelin-A ve L-selectin düzeyleri ile hCG günü endometrial kalınlık düzeyleri arasında pearson korelasyon analizi yapıldı. Aralarında anlamlı korelasyon saptanmadı.

TARTISMA

İmplantasyon penceresi döneminin belirteçlerinden olan L-selectin, G-CSF ve glycodekin-A düzeylerini IVF-ET sikluslarında servikal mukusta ölçmenin non-invaziv ve etkin bir yöntem olduğunu yaptığımız çalışmada bulduk. Literatürde daha önce benzer bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız, IVF-ET sikluslarında endometrial reseptivite belirteçlerinin araştırılması alanında, yeni çalışmalara yol gösterici olacaktır.

Kompleks birçok molekülün birlikte salınması, implantasyonun başarısı için gereklidir. Ovarian hormonların etkisiyle endometriümdan salgılanan çok sayıda adhezyon molekülü, sitokinler, büyüme faktörleri ve lipidler saptanmıştır. Bu faktörler gebeliğin erken safhasında fetomaternal ilişkide önemli olabilirler. Bugüne kadar ki çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, henüz gebeliği öngörmeye yardımcı olabilecek bir biyokimyasal belirteç bulunamamıştır. İmplantasyon başarısızlığı, üreme tıbbında çözüme kavuşmamış en önemli sorunlardan biridir. IVF sikluslarında implantasyon oranı yaklaşık %25 düzeyindedir (76). İmplantasyon başarısızlığının üçte ikisinden endometrial reseptivite sorumluyken, üçte birinden embriyonun kendisi sorumludur (77). İmplantasyonun biyokimyasal belirteçlerinin bulunmasıyla infertilite tedavisinde, çoğul gebeliklerin ve erken gebelik kayıplarının önlenmesinde önemli bir aşama sağlanabilir.

Embriyo implantasyonunu öngörebilecek bir biyokimyasal belirteç, kolay saptanabilmeli ve IVF siklusuna zarar vermemesi için non-invaziv olmalıdır. Kanda saptanabilen bir belirteç ideal olur. Ancak implantasyon penceresi döneminde salgılanan birçok sitokin ve büyüme faktörünün vücutta başkaca görevleri olması nedeniyle, kanda implantasyona özgü belirteçleri bulmak zordur. Endometrial reseptivite belirteçleri lokal olarak salgılandıkları için serum düzeyleriyle de korelasyon göstermeyebilir. Endometrial biyopsi örnekleme, implantasyon belirteçleri için en özgün yöntem olmasına rağmen IVF sikluslarında embriyo transferi öncesi uygulanması etik sorunları beraberinde getirir. Bu nedenle çalışmamızda implantasyon belirteçlerini servikal mukus ve kan örneklerinde araştırdık.

Endometriümda GM-CSF düzeyinin sekretuar fazda en fazla salgılandığı gösterilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da servikal mukusta G-CSF düzeyinin oosit toplama zamanından

embryo transfer zamanına doğru anlamlı olarak yükseldiğini bulmamız, G-CSF'nin implantasyon pencere döneminde endometriumda artan düzeylerde salgılandığını doğrular. Doğal sikluslarda epidermal büyüme faktörü ve M-CSF gibi sitokinlerin servikovajinal sıvıda non-invaziv olarak ölçülebildiği ve M-CSF düzeyi ile E_2 ve E_2 / P oranı arasında anlamlı korelasyon olduğu saptanmıştır (57). IVF-ET sikluslarında endometrial reseptivite belirteçlerinden G-CSF'yi servikal mukusta araştırmanın non-invaziv ve etkin bir yöntem olduğunu bizim çalışmamız da göstermektedir. Farelerde yapılan hayvan çalışmalarında GM-CSF genin yokluğunun fertilizasyonu olumsuz etkilediği ve implantasyon öncesi dönemde GM-CSF verilmesinin implantasyon başarısızlığını ve fetal rezorpsiyonu önleyebileceği gösterilmiştir (79) (80). G-CSF düzeylerinin gebelik kayıplarını önleyici etkisi de bildirilmektedir (81). Salmassi ve ark. (82) oosit toplama zamanı foliküler sıvıda G-CSF düzeyinin yükseldiğini ve serumda G-CSF düzeylerini embriyo transferinden sonra gebe kalan kadınlarda gebe kalamayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise G-CSF düzeyinin endometriumda salgılanan düzeylerinin serum düzeylerine yansımaması nedeniyle serum düzeylerini gebeliği öngörmede faydalı bulamadık. Farelerde estrus (dişi hayvanlarda cinsel kızışma zamanı) döneminde serum ve uterus sıvısında 23 sitokin düzeyinin ölçüldüğü çalışmada; G-CSF düzeyi uterus sıvısında seruma göre 173 kat daha yüksek olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada G-CSF'nin uterus sıvısında en yüksek düzeyde salgılanan esas sitokin olduğu gösterilmiştir (83). Bizim çalışmamızda klinik gebeliği pozitif olanlarda embriyo transfer zamanı servikal mukusta ölçülen G-CSF düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen biyokimyasal gebeliği pozitif olanlarda ise anlamlı fark bulunamadı. Bu sonuç; IVF sikluslarında embriyo transfer zamanı servikal mukusta ölçülen G-CSF düzeyinin implantasyonu göstermede önemli bir belirteç olabileceğini gösterir. Yapılan çalışmalarda akut myokard enfaktüsünde G-CSF'nin doku rejenerasyonu etkisinden yararlanarak, G-CSF tedavisiyle doku iyileşmesi sağlandığı gösterilmiştir (84). Üreme endokrinolojisi alanında da endometrial reseptiviteyi arttırmak için G-CSF, tedavi yöntemlerinin arasında ilerleyen yıllarda yer alabilir.

Endometrial yüzeyde L-selectin ligandının immünohistokimyasal yöntemlerle implantasyon penceresi döneminde salgılandığı gösterilmiştir (85). Benzer şekilde Lai ve ark. (58) yaptıkları çalışmada L-selectin ligand düzeylerinin en fazla menstrual siklusun sekretuar fazında arttığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da servikal mukusta L-selectin

düzeylerinin oosit toplama zamanından embryo transfer zamanına doğru anlamlı şekilde yükseldiği bulunmaz, implantasyon penceresi döneminde L-selectin'in görev aldığı ve L-selectin düzeyini servikal mukusta ölçmenin etkin bir yöntem olduğunu gösterir. IVF sikluslarında tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hasta grubunda, fertil kadınların oluşturduğu kontrol grubuna göre L-selectin ligand düzeylerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (86). Donör oosit alıcı hastalarda yalancı transfer sırasında endometrial örnekleme yapılan çalışmada; L-selectin ligand düzeyi immünohistokimyasal yöntem ile ölçülmüş ve gebe kalan hastalarda L-selectin ligand düzeyi daha yüksek olarak bulunmuştur (87). Bizim çalışmamızda embriyo transfer zamanı servikal mukusta L-selectin düzeyleri klinik gebelik pozitif olanlarda olmayanlara göre daha yüksek ölçülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bunun nedeni yapılan çalışmalarda L-selectin ligand düzeyi ölçülürken bizim çalışmamızda farklı olarak L-selectin molekülünün kendisini ölçmemiz ve L-selectin düzeyine ovaryan stimülasyon uygulanan siklusta bakmamız olabilir. Kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanan oosit vericisi kadınlarda ovaryan stimülasyonun L-selectin düzeylerini olumsuz etkilediği bulunmuştur (88). Öte yandan ovaryan stimülasyon uygulanan sikluslarda luteal faz desteği olarak micronize progesteron ve 17B-östradiol kullananlarda, luteal faz desteği almayanlara göre L-selectin ligand düzeyi daha yüksek olarak bulunmuştur (89). IVF sikluslarında seks steroidleri ile kandaki L-selectin düzeylerinin ilişkisini inceleyen çalışmada, hCG alımına sekonder olarak oosit toplama zamanı L-selectin düzeyinin arttığını ve L-selectin düzeyinin progesteron hormonuyla korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (90). L-selectin progesteron etkisiyle implantasyon penceresi döneminde endometriyumda artan düzeylerde salgılanmaktadır. Öte yandan IVF-ET sikluslarında gebeliği öngörmede faydalı bir belirteç olarak kullanılabilmesi için prospektif daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

İmplantasyon penceresi döneminde endometriozisli kadınlar ve kontrol grubunda endometrial biyopsi örnekleme yapılarak gen ekspresyonu ölçülen çalışmada; glycodelin gen ekspresyonu endometriozis grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur (91). Brown ve ark.(92) kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulanan oosit vericisi kadınlarla, doğal sikluslu kadınları glycodelin-A seviyeleri açısından endometrial biyopsi örnekleme yaparak karşılaştırdıkları çalışmada; kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulanan kadınlarda belirgin yüksek glycodelin-A ekspresyonu olduğunu ve her iki grupta da luteal faz boyunca

glycodelin-A seviyelerinin arttığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise oosit toplama zamanı, embriyo transfer zamanı servikal mukusta ve embriyo transfer zamanı kanda glycodelin-A düzeyleri, gebe kalan ve kalmayan hasta grupları arasında farklılık göstermedi. Ayrıca oosit toplama zamanı ve embriyo transfer zamanı servikal mukustaki glycodelin-A seviyeleri arasında anlamlı fark bulunamadı. Doğal sikluslarda LH pikinden iki ve yedi gün sonra endometrial biyopsi örneklemeyle gen analizi yapılan çalışmada; ikiyüzonbir genin regülasyonunun üç kattan daha fazla değiştiği bulunmuştur. LH pikinden yedi gün sonra 153 gen up-regüle, 58 gen down-regüle olmuş ve glycodelin-A geni 107 kat daha fazla ekspresyon göstermiştir (93). IVF sikluslarında ovulasyon indüksiyonunun endometrial gen ekspresyonu üzerine olan etkisini araştırmak için Horcajadas ve arkadaşları (94) oosit vericisi fertil kadınlarda siklusun hCG+7. günüyle indüksiyon verilmeden önceki siklusun LH+7. gününü endometrial gen salınımı açısından karşılaştırmışlardır. Doğal sikluslarla ovulasyon indüksiyonu uygulanan sikluslar arasında üç kattan fazla oranda olmak üzere ikiyüz genin farklı eksprese edildiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada ovulasyon indüksiyonu verilmeden önceki siklusun LH+2. günüyle LH+7. günündeki gen ekspresyonları da incelenmiş ve glycodelin-A gen ekspresyonunun doğal siklusta 81 kat arttığı gözlenirken, stimülasyon uygulanan siklusta dokuz kat azaldığı gözlenmiştir. Doğal sikluslarda implantasyon belirteci olarak gösterilen glycodelin-A'nın, ovulasyon indüksiyonu uygulanan sikluslarda endometrial reseptivitenin olumsuz etkilenmesi nedeniyle düzeyi düşmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamızda; glycodelin-A düzeyi implantasyon penceresi döneminde artış göstermedi ve IVF-ET sikluslarında glycodelin-A gebeliği öngörmede faydalı bulunamadı.

IVF sikluslarında kullanılan yüksek doz gonadotropinlerin suprafizyolojik östrojen ve progesteron düzeylerine neden olduğu ve bu durumun da endometriumun doğal siklusa göre daha ileri evrede gelişmesine ve glandüler stromal senkronizasyonun bozulmasına yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (73). Kolibianakis E ve ark (63) antagonist ekleninceye kadar ki recombinant FSH tedavi süresinin endometrial matürasyonun daha ileri evrede olmasına neden olduğunu bulmuştur. GnRH uzun protokol uygulanan IVF sikluslarını doğal sikluslarla karşılaştıran çalışmada; endometrium matürasyonu daha ileri evrede olmasına rağmen, östrojen ve progesteron reseptörlerinin doğal siklusa göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir (95). Bizim çalışmamızda da G-CSF, L-selectin ve glycodelin-

A düzeylerinin uyguladığımız stimülasyon protokollerinden, gonadotropin doz ve süresinden etkilendiği düşünülebilir.

Oosit toplama zamanı servikal mukusta ölçülen G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptarken, embryo transfer zamanı servikal mukusta sadece G-CSF ve L-selectin arasında anlamlı korelasyon saptadık. Glycodelin-A'nın ovulasyon indüksiyonundan olumsuz olarak etkilenmesi, embryo transfer zamanı diğer belirteçlerle korelasyon göstermemesinin nedeni olabilir. G-CSF ve L-selectin ise oosit toplama zamanı ve embryo transfer zamanı servikal mukus düzeyleri arasında korelasyon göstermeleri ve oosit toplama zamanından embryo transfer zamanına doğru düzeylerinin anlamlı şekilde artmaları nedeniyle IVF sikluslarında implantasyon penceresi dönemi belirteçleri olmaya adaydırlar.

Çalışmamızda embriyo transferi sırasında alınan serum örneklerindeki G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A düzeyleri gebeliği öngörmeye faydalı bulunmadı. Bu üç belirteçin serum seviyeleri arasında korelasyon saptanmadı. G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A'nın serum ve servikal mukus düzeyleri arasında korelasyon bulmamamız da bu üç belirteçin lokal olarak salgılanan düzeylerinin sistemik dolaşıma yeterince yansımadığını gösterir. Serum örneklerinde endometrial reseptivite belirteçlerini araştırmak kolay bir yöntem olmasına rağmen G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A'nın serum düzeylerini IVF-ET sikluslarında araştırmak çalışmamızda faydalı bulunmadı. Oosit toplama zamanı servikal mukustaki G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A düzeyleri klinik ve biyokimyasal gebeliği öngörmeye faydalı bulunmadı. Embriyo transfer zamanı servikal mukusta G-CSF, L-selectin ve glycodelin-A düzeylerini klinik ve biyokimyasal gebelik pozitif olanlarda daha yüksek olarak saptamamıza rağmen sadece G-CSF düzeyi klinik gebelik pozitif olanlarda anlamlı olarak yüksek bulundu. Çalışmamızda hasta sayısının az olması kısıtlılığa yol açmıştır. Literatürün de kısıtlı olduğu bu alanda daha fazla hasta sayısı ile yapılacak olan prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUC

IVF-ET sikluslarında endometrial reseptiviteyi gösteren belirteçlerin düzeyine non-invaziv olarak servikal mukusta bakabiliriz. IVF-ET sikluslarında G-CSF klinik gebeliği öngörmeye önemli bir belirteç olabilir. Daha geniş hasta sayısı ile yapılacak olan prospektif klinik çalışmalarla G-CSF'nin IVF sikluslarında klinik gebeliği öngörmeye önemli bir belirteç olduğu bizim çalışmamızı destekler şekilde gösterilebilirse, IVF sikluslarında implantasyon oranlarını arttırmada ve çoğul gebeliklerin önlenmesinde önemli bir gelişme sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Daya S, Gunby J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;CD004830.
2. Boomsma CM, Key SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;CD005996.
3. Grace J, Bolton V, Braude P, Khalaf Y. Assisted hatching is more effective when embryo quality was optimal in previous failed IVF/ICSI cycles. *J Obstet Gynaecol.* 2007 ;27:56-60.
4. Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2007;22:1513-25.
5. Society for Assisted Reproductive Technology; American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril.* 2007;87:1253-66.
6. Jerome FS, Bruce AL ve Barbieri RL. Dişı üreme sisteminin yapısı, fonksiyonu ve değerdendirilmesi. *Yen ve Jaffe Üreme Endokrinolojisi. Güneş Kitabevi.* 2006;5:255-98.
7. Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H et al. Roles of glycodeiin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250:149-56.
8. Hock DL, Huhn RD, Kemmann E. Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation. *Hum Reprod.* 1997;12:2143-6.
9. Makinoda S, Mikuni M, Furuta I, Okuyama K et al. Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:877-9.
10. Fazleabas AT, Kim JJ. Development. What makes an embryo stick? *Science.* 2003 17;299:355-6.
11. Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P et al. Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Engl J Med.* 1990;323:1788-92.
12. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994;62:639-41.

13. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS et al. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod.* 1993;8:2141-54.
14. Overstreet JW, Gould JE, Katz DF. *In vitro* capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertil Steril.* 1980;34:604-7.
15. Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thøgersen H et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature.* 1995;374:559-62.
16. Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187:189-96.
17. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986;1:81-7.
18. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17:121-55.
19. Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol.* 1996;148:47-53.
20. Speroff L and Fritz MA. *The Ovary-Embryology and Development.* Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Williams and Wilkins 2005;7:97-111.
21. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Pozzobon C, Tank P et al. Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while has no effect on day 5 single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2007;[Epub ahead of print]
22. Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheyen G, Van de Velde H et al. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 2005;20:3198-203.
23. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL et al. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception *in vitro.* *Fertil Steril.* 1991;55:114-8.
24. Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM et al. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod.* 1996;11:2739-45.

25. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R et al. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:692-715.
26. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*. 1996;2:307-21.
27. Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E et al. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2504-10.
28. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007;13:365-77.
29. Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J et al. The European IVF-monitoring programme (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2005;20:1158-76.
30. Croxatto HB, Ortiz ME, Díaz S, Hess R et al. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;132:629-34.
31. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril*. 1992;58:537-42.
32. Check JH, Nowroozi K, Chase J, Nazari A et al. Comparison of pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer between the donors and the recipients in a donor oocyte program. *J Assist Reprod Genet*. 1992;9:248-50.
33. Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:382-91.
34. Emiliani S, Delbaere A, Devreker F, Englert Y. Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:527-40.
35. Ferrara I, Balet R, Grudzinskas JG. Intrauterine insemination with frozen donor sperm. Pregnancy outcome in relation to age and ovarian stimulation regime. *Hum Reprod*. 2002;17:2320-4.

36. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999 10;340:1796-9.
37. Simón C, Landeras J, Zuzuarregui JL, Martín JC et al. Early pregnancy losses in in vitro fertilization and oocyte donation. *Fertil Steril.* 1999;72:1061-5.
38. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet.* 1980;44:151-78.
39. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 22;183:55-8.
40. Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L et al. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod.* 1999;14:515-20.
41. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA et al. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril.* 2003;79:970-4.
42. Sherwin JRA and Sharkey AM. Regulation of embryo-endometrial interactions at implantation. *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction.* Parthenon Publications Group. 2005;3:405-419.
43. Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E et al. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril.* 2007;87:1015-21.
44. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* 1992;359:76-9.
45. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC et al. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod.* 1997;12:569-74.
46. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-87.
47. Gilmore AP, Burridge K. Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure.* 1996;4:647-51.
48. von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C et al. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril.* 2001;76:775-81.

49. Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 2003;68:809-15.
50. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-4.
51. Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol Hum Reprod*. 2000;6:935-41.
52. Dorn C, Reinsberg J, Kupka M, van der Ven H et al. Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 concentrations in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet*. 2003;268:187-93.
53. Durand M, Seppala M, Cravioto Mdel C, Koistinen H et al. Late follicular phase administration of levonorgestrel as an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodelin in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception*. 2005;71:451-7.
54. Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res*. 1988 15;48:5624-37.
55. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L et al. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod*. 1995;10:3259-63.
56. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J et al. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*. 2004;81:786-91.
57. Gargiulo AR, Fichorova RN, Politch JA, Hill JA et al. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil Steril*. 2004;82:1226-34.
58. Lai TH, Shih IeM, Vlahos N, Ho CL et al. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2005;83:1297-302.
59. Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17:283-8.
60. Noyes N, Liu HC, Sultan K, Schattman G et al. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1995;10:919-22.

61. Yoeli R, Ashkenazi J, Orvieto R, Shelef M et al. Significance of increased endometrial thickness in assisted reproduction technology treatments. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:285-9.
62. Richter KS, Bugge KR, Bromer JG, Levy MJ. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril.* 2007;87:53-9.
63. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod.* 2001;16:221-5.
64. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril.* 2002;78:1025-9.
65. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC et al. ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod.* 2005;20:35-48.
66. Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C et al. ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod.* 2007;22:323-36.
67. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA et al. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril.* 2005;84:1628-36.
68. Twisk M, Mastenbroek S, van Wely M, Heineman MJ et al. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;CD005291.
69. Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2007; [Epub ahead of print]
70. Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 ;CD002118. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;CD002118.

71. Papanikolaou EG, Camus M, Fatemi HM, Tournaye H et al. Early pregnancy loss is significantly higher after day 3 single embryo transfer than after day 5 single blastocyst transfer in GnRH antagonist stimulated IVF cycles. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:60-5.
72. Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C, Hooper L et al. Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;CD001894.
73. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update*. 2003;9:515-22.
74. Veeck LL. Preembryo grading. *Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1991;2:121-149
75. Castle PE, Rodriguez AC, Bowman FP, Herrero R et al. Comparison of ophthalmic sponges for measurements of immune markers from cervical secretions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:399-405.
76. de los Santos MJ, Mercader A, Galán A, Albert C et al. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*. 2003;24:13-9.
77. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12:731-46.
78. Zhao Y, Chegini N. The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 1999;42:303-11.
79. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR et al. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod*. 1999;60:251-61.
80. Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18:287-98.
81. Whitcomb BW, Schisterman EF, Klebanoff MA et al. Circulating levels of cytokines during pregnancy: thrombopoietin is elevated in miscarriage. *Fertil Steril*. 2007; [Epub ahead of print]
82. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K et al. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod*. 2005 ;20:2434-40.
83. Orsi NM, Ekbote UV, Walker JJ et al. Uterine and serum cytokine arrays in the mouse during estrus. *Anim Reprod Sci*. 2007;100:301-10.

84. Kang S, Yang Y, Li CJ, Gao R. Effectiveness and tolerability of administration of granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Ther.* 2007 ;29:2406-18.
85. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 2003;299:405-8.
86. Foulk RA, Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:316-21.
87. Shamonki MI, Kligman I, Shamonki JM, Schattman GL et al. Immunohistochemical expression of endometrial L-selectin ligand is higher in donor egg recipients with embryonic implantation. *Fertil Steril.* 2006;86:1365-75.
88. Lai TH, Zhao Y, Shih IeM, Ho CL et al. Expression of L-selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. *Fertil Steril.* 2006;85:761-3.
89. Vlahos NF, Lipari CW, Bankowski B, Lai TH et al. Effect of luteal-phase support on endometrial L-selectin ligand expression after recombinant follicle-stimulating hormone and ganirelix acetate for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4043-9.
90. Orvieto R, Ben-Rafael Z, Schwartz A, Abir R et al. Soluble L-selectin levels during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol.* 2001;15:29-33.
91. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology.* 2003;144:2870-81.
92. Brown SE, Mandelin E, Oehninger S, Toner JP, Seppala M, Jones HW Jr. Endometrial glycodefin-A expression in the luteal phase of stimulated ovarian cycles. *Fertil Steril.* 2000 ;74:130-3.
93. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod.* 2003;9:253-64.
94. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod.* 2005;11:195-205.

- 95.** Bourgain C, Ubaldi F, Tavaniotou A, Smitz J et al. Endometrial hormone receptors and proliferation index in the periovulatory phase of stimulated embryo transfer cycles in comparison with natural cycles and relation to clinical pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2002;78:237-44.