

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

**Uzun GnRH Agonist ve Antagonist Protokolü Uygulanan
Yardımcı Üreme Tekniği Sikluslarında Serum ve Folikül
Sıvı Sitokin Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayten SAFAROVA

Danışman Öğretim Üyesi:

Doç. Dr. Erbil DOĞAN

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2010.KB.SAG.013 sayı ile desteklenmiştir

İZMİR - 2010

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	IV
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY.....	IX
1.GİRİŞ VE AMAC.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1 İNFERTİLİTE VE YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....	4
2.1.1. Kadın infertilitesi.....	5
2.1.1.1 Overyan nedenler	5
2.1.1.2 Servikal nedenler.....	7
2.1.1.3 Uterin Faktör	7
2.1.1.4. Tubal ve Peritoneal faktör	8
2.1.2. Açıklanamayan infertilite	9
2.1.3. Endometriozis.....	9
2.1.4. Erkeğe ait nedenler.....	9
2.1.4.1. Klasik semen analizi.....	10
2.2. İN VİTRO FERTİLİZASYON	12
2.2.1. Tanımı ve endikasyonları	12
2.3. OVARIAN STİMULASYON SEÇENEKLERİ.....	13
2.3.1. Uzun protokoller	13
2.3.2. Kısa protokoller.....	14
2.3.3. Antagonist protokoller.....	15
2.4. OVULASYON İNDÜKSİYON MONİTORİZASYONU.....	16
2.5. FOLİKÜL ASPİRASYONU VE FERTİLİZASYON	16
2.6. OOGENEZ.....	16
2.6.1.Foliküler gelişim	17
2.7. OOSİT MATURASYONU	18
2.7.1. Nükleer maturasyon	19
2.7.2 Sitoplazma maturasyonu	20
2.8. EMBRİYONEL GELİŞİM	20

2.8.1. Erken embriyonel gelişim	20
2.8.2. Morula ve Blastokist gelişimi	22
2.8.3. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesi	22
2.9. SİTOKİNLER	24
2.9.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF).....	25
2.9.2. İnterlökin-6	26
2.9.3 İnterlökin-2	26
2.9.4 İnterlökin-4.....	27
2.9.5 İnterlökin-5.....	27
2.9.6 İnterferon gamma (IFN- γ).....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Kontrollü Overyan Stimulasyon Protokolleri	28
3.2. Oosit ve Folikül sıvı Toplama İşlemi	29
3.3.Oositlerin Elde Edilmesi,Takibi,Morfolojik Değerlendirilmesi ve ICIS	30
3.4. Fertilizasyon, Klivaj ve Embriyo Kalitesi	31
3.5. Serum Ve Folikül Sıvısında Sitokin Tayini	32
3.6. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
5.TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
7. KAYNAKLAR	47

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. Oktay Erten, Prof. Dr. Ata Önvural, Prof. Dr. Berrin Acar, Prof. Dr. Namık Demir, Prof. Dr. Turhan Uslu, Prof. Dr. Bülent Gülekli, Prof. Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Yakup Erata, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Prof. Dr. Uğur Saygılı, Prof. Dr. Sabahattin Altunyurt, Doç. Dr. Serkan Güçlü, Doç. Dr. Erbil Doğan, Uzm. Dr. Bahadır Saatlı, Uzm. Dr. Emre Okyay ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında katkılarından dolayı sayın hocalarım Doç. Dr. Erbil Doğan, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Sezer Uysal, Dr. Birsen Tuğluya, Tüp Bebek Merkezinden Uzm. Dr. Elvan Ok, Embriyolog Seda Doğan, Embriyolog Müge Kovalı ve tüm merkez çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan annem, babam ve eşim'e sonsuz teşekkürler.

Dr. Ayten SAFAROVA

TABLO LİSTESİ

Tablo.1. Klasik Semen Analizi.....	10
Tablo.2. Hastaların İnfertilite Nedenleri.....	34
Tablo.3. Agonist ve Antagonist Grubun Genel Özellikleri	35
Tablo.4. Antagonist ve Uzun Agonist Gruplar Arası Pre-Stimülasyon (Bazal) Serum Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	36
Tablo.5. Post-Stimülasyon (OPU günü) Antagonist ve Agonist Uzun Gruplar Arası Serum Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	36
Tablo.6. Post- stimülasyon (OPUgünü) Antagonist ve Agonist Folikül sıvı Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	37
Tablo.7. Pre -Stimülasyon (Bazal) ve Post-Stimülasyon (OPU günü) Serum Sitokin Değerlerinin Her İki Grup da (Agonist ve Antagonist) Ayrı -Ayrı Karşılaştırılması ...	37
Tablo.8. Pre-Stimülasyon Serum (Bazal) ve Folikül sıvısı Sitokin Değerlerinin Her İki Grupda (Agonist ve Antagonist) Ayrı-Ayrı Karşılaştırılması.....	38
Tablo.9. Post-Stimülasyon (OPUgünü) Serum ve Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerini Her İki Grupta (Agonist ve Antagonist gruplar) Ayrı - Ayrı Karşılaştırılması.	38
Tablo.10. Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Matürasyona Göre Karşılaştırılması	39
Tablo.11. Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Fertilizasyona Göre Karşılaştırılması	39
Tablo.12. Folikül Sıvı Sitotkin Düzeylerinin Embriyo Kalitesine Göre Karşılaştırılması..	40
Tablo.13. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Bazal Serum Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	40
Tablo.14. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Serum (OPUgünü) Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	41
Tablo.15. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Folikülogenez basamakları	18
Şekil 2: Matür oosit ve polar cisimcik	19
Şekil-3: Fertilize olmuş oositler	21

KISALTMALAR

ART	: Yardımcı Üreme Teknikleri
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET	: Embriyo Transferi
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnRH-a	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Analogu
GV	: Germinal Vezikül
GVBD	: Germinal Vezikülün Yıkılması
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin hCG
HMG	: Human Menapozal Gonadotropin
HSG	: Histerosalpingografi
ICSI	: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
KOH	: Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon
LH	: Lüteinize Edici Hormon
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
mRNA	: Haberci Ribonükleik Asit
MI	: Metafaz I
MII	: Metafaz II
OHSS	: Ovarian Hiperstimülasyon Sendromu
OPU	: Yumurta Toplama İşlemi
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
rFSH	: Rekombinant Folikül Stimüle Edici Hormon
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyon
TV-USG	: Transvaginal Ultrason
USG	: Ultrasonografi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Uzun GnRH Agonist ve Antagonist Protokolü Uygulanan Yardımcı Üreme Tekniği Sikluslarında Serum ve Folikül Sıvı Sitokin Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

Amaç: Birçok fonksiyona sahip sitokinler, vücuttaki her fizyolojik olayda mevcuttur. Sitokinlerin; folikül gelişimi, ovülasyon, fertilizasyon ve embriyo gelişimi gibi üreme sistemindeki olaylarda çok önemli olduğu fark edilmiştir. Biz de bu çalışma ile ilk kez uzun etkili GnRH agonist ve GnRH antagonist protokolü uygulanan kontrollü over stimülasyonu altındaki kadınlarda; altı sitokin (IFN- γ , IL-4, IL2, IL6, IL5, TNF- α) seviyesini serum ve foliküler sıvısında karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

Dizayn: Prospektif Randomize çalışma

Kurum: Üçüncü basamak tıp merkezi

Metot: Otuz iki tanesi uzun GnRh agonisti 34 tanesi GnRh antagonist ile kontrollü over stimülasyonu uygulanan toplam 66 hastadan serum, folikül sıvısı ve oosit değerlendirildi. Ayrıca gonadotropin tedavisine başlamadan önce (pre - ovarian stimülasyon öncesi) ve oosit toplama (OPU) günü alınan serum örneklerinde sitokin düzeyleri ölçüldü. Uzun GnRh agonist ve antagonist gruplar arasında serum ve folikül sıvısı sitokin düzeyleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Bazal serum (pre-ovarian stimülasyon öncesi) sitokin düzeyleri uzun Agonist ve Antagonist gruplar arasında karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Oosit toplama (OPU) günü serum ve folikül sıvısında interferon gamma IFN- γ düzeyleri antagonist grup'ta agoniste göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Uzun agonist ve antagonist grupların ayrı-ayrı serum ve folikül sıvı düzeyleri karşılaştırıldığında, agonist grupta bazal serum TNF- α , IL-6 düzeyleri OPU günü serum sitokin düzeylerine göre azalmış, IFN- γ düzeyleri anlamlı artmış saptandı ($p<0,05$). Aynı grupta bazal serum düzeyleri, folikül sıvı sitokin düzeyleriyle karşılaştırıldığında IFN- γ düzeyleri bazal serumda azalmış saptandı. ($p<0,05$). Agonist grupta serum (OPU günü) IL-4, IL-6, IFN- γ düzeyleri folikül sıvı düzeylerine göre anlamlı azalmış saptandı. ($p<0,05$). Antagonist grupta ise bazal serum IFN- γ düzeyleri OPU günü serumda anlamlı düşük bulundu. ($p<0,05$). Antagonist grupta OPU günü serum IL-4 ve IL-6, IFN- γ düzeyleri folikül sıvısı sitokin düzeylerine göre anlamlı azalmıştır. ($p<0,05$). IFN- γ , IL2, IL6, IL5, TNF- α , düzeyleri klinik gebelik, matürasyona, embriyo gelişimi ve fertilizasyon açısından karşılaştırıldığında iki stimülasyon protokolünde anlamlı farklılıklar saptanamadı. Antagonist grupta gebelik elde edenlerde, gebelik elde etmeyenlere göre IL-4 düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulduk.

Sonuç: Sonuç olarak GnRH agonist ve GnRH antagonist ile kontrollü over stimülasyonu uygulanan normal kadınlarda serum ve folikül sıvı örneklerinde sitokin profili genellikle bezerdir. Antagonist grupta oosit toplama günü (OPU günü) serum ve intrafoliküler interferon gamma'nın IFN- γ düşük bulunması bu grupta klinik gebelik sonuçlarını, embriyo kalitesini, fertilizasyonu ve matürasyonu etkilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Yardımcı Üreme Teknikleri, folikül sıvısı, IFN- γ , IL-4, IL2, IL6, IL5, TNF- α , uzun GnRh agonist, GnRh antagonist.

SUMMARY

GONADOTROPIN RELEASING HORMON AGONISTS versus ANTAGONISTS for CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION IN ASSISTED REPRODUCTIVE CYCLES AND COMPARING SERUM AND FOLLICULE FLUID LEVELS OF CYTOKINES BETWEEN THE TWO GROUPS.

OBJECTIVE: Cytokines which have many functions, play a role in all physiologic events. It has been recognized that cytokines have many important functions in reproductive system such as ovulation, fertilization, and embryo development. The aim of this study, for the first time in literature to compare the six cytokine levels (IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-5, TNF- α) in serum and follicle fluid in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation.

DESIGN: Prospective Randomized Study

SETTING: Tertiary care medical center

METHOD: A total of 66 patients were included in the study. Between these patients; 32 women underwent long gonadotropin releasing hormone agonist protocol and 34 women underwent gonadotropin releasing hormone antagonist protocol for controlled ovarian hyperstimulation. Serum, follicular fluid and oocytes were evaluated for these patients. In addition, before starting the gonadotropin treatment (pre-ovarian hyperstimulation) and on the day of the oocyte retrieval (OPU) serum were taken for cytokines levels. Serum and follicular fluid cytokine levels were compared between gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists.

RESULTS: Basal cytokine serum levels (pre-ovarian hyperstimulation) showed no difference between gonadotropin-releasing hormone agonist group and gonadotropin antagonist group. ($p < 0.05$) On the day of oocyte retrieval (OPU), level of IFN- γ in serum and follicle fluid were significantly lower in the antagonist group. On the day of oocyte retrieval, when long agonist and antagonist groups were compared separately, serum and follicle fluid level of TNF and IL-6 level were found to be lower than basal serum cytokine levels in the agonist group and on the other hand IFN- γ levels were significantly lower only in the agonist group. ($p < 0.05$) In the same group, follicle fluid levels and serum levels of the cytokines showed that IFN γ levels were higher in basal serum when compared with follicle fluid level. ($p < 0.05$). In the agonist group, on the day of oocyte retrieval, serum IFN- γ , IL-4 and IL-6 levels were lower than the follicle fluid level. ($p < 0.05$) On the day of oocyte retrieval, in the antagonist group, basal serum IFN- γ level was significantly lower than serum and follicle fluid level ($p < 0.05$). On the day of oocyte retrieval, in the antagonist group, serum IL-4, IL-6 and IFN- γ levels were lower compared to follicle fluid levels ($p < 0.05$). When two hyperstimulation techniques were compared IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-5, and TNF- α level did not show any significant difference in pregnancy rates, oocyte maturation, embryo development and fertilization rates. In the antagonist group, serum IL-4 level was higher in women who got pregnant compared to cycles which did not result with pregnancy.

CONCLUSION: As a result for controlled ovarian hyperstimulation when gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist protocols are compared serum and follicular fluid levels of cytokines are similar. The low level of IFN- γ in the antagonist group did not affect the pregnancy, oocyte maturation fertilization, or embryo development.

KEY WORDS: Assisted reproductive techniques, follicular fluid, IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-5, TNF- α , long GNRH agonist, GNRH antagonist.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertil çiftlerin tedavisinde diğer konvansiyonel tedavi yöntemlerine yanıt alınmadığında yardımcı üreme teknikleri (ART) tercih edilmektedir. Günümüzde en çok tercih edilen yardımcı üreme tekniği de in vitro fertilizasyondur (IVF) (1). İn vitro fertilizasyon (IVF) yardımcı üreme teknikleri içerisinde yer alan ve 1978 yılından bu güne kadar gebelik elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

IVF gonadotropinlerle kontrollü overyan hiperstimülasyon sonrasında oositlerin toplanması, laboratuvar ortamında fertilizasyonu ve oluşan embriyoların transservikal olarak uterusu transferini kapsamaktadır. Tekniğin başarısı siklus başına elde edilen gebelik oranları ile değerlendirilir. SART (Society for Assisted Reproductive Technology) 2005 sonuçlarına göre siklus başına gebelik oranı %34, embriyo transferi başına canlı doğum oranı % 34.3'dür (2). İngiltere 2004 yılı sonuçlarına göre siklus başına gebelik oranı %27.4, embriyo transferi başına canlı doğum oranı %26'dır (3). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi IVF Merkezinde ise siklus başına gebelik oranı %31.5, embriyo transferi başına canlı doğum oranı 2008 yılında %26.1'dir.

Kadın üreme sisteminde sitokinlerin rolü IVF denemeleri için yapılan kontrollü over stimülasyonu sırasında geniş olarak araştırılmıştır. Kontrollü over stimülasyonu altında, kadın üreme sistemindeki fonksiyonların normal siklulardan belirgin farklılık gösterdiği nettir, ayrıca genel olarak kontrollü over stimülasyonu tipinin farklılığı üreme sistemi fonksiyonlarını etkilemektedir (4).

Farklı sitokinler, ART'de yer alan folikül gelişimi, fertilizasyon, embriyo gelişimi ve implantasyon gibi çeşitli aşamalardaki etkileri açısından araştırılmaktadır. Bu sitokinler ile ART sonuçları arasında yoğun bir şekilde korelasyon aranmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalar, kontrollü overyan hiperstimülasyon sikluslarında sitokin konsantrasyonlarının stimüle edilmemiş siklulara göre daha farklı olduğunu göstermiş ve bu çalışmalarda gonadotropinlerin overyen sitokin sekresyonunu düzenliyor olabileceği sonucuna varılmıştır (5,6). Overyen hiperstimülasyon sonrası Folikül sıvısında yüksek düzeylerde sitokinlerin bulunması, bu sitokinlerin foliküler mikroortamda potansiyel otokrin veya parakrin rollerinin olabileceğini düşündürmektedir. Gonadotropin releasing

hormon (GnRH) agonistleri ve antagonistleri, IVF için uygulanan overyen stimülasyon esnasında prematür LH pikinin önlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. IVF için en yaygın şekilde kullanılan stimülasyon protokolünün uzun GnRH agonisti olmasına karşın, son yıllarda GnRH antagonist protokolünün popülaritesi artmış bulunmaktadır ve bu protokolün, uzun agonist protokolüne benzer sonuçlara sahip olduğu öne sürülmüştür (7). Ancak agonist uzunlarla karşılaştırıldığında antagonist sikluslar için düşük implantasyon ve gebelik oranları ile ilgili tartışmalar halen devam etmektedir (8,9). ART uygulanan kadınlarda GnRH agonistleri ile antagonistlerini karşılaştıran yeni bir meta-analiz, antagonist sikluslar için daha düşük gebelik oranlarını göstermiştir (10).

GnRH agonist ve antagonistlerinin IVF uygulanan kadınlardan izole edilen granülosaluteal hücrelerin fonksiyonları üzerinde farklı etkilerinin bulunduğu öne sürülmektedir (11-12). Benzer şekilde, GnRH agonist ve antagonistleri arasında çeşitli folikül sıvısı marker'ları ile ilgili olarak yapılan karşılaştırmalı çalışmalar foliküler mikro-ortamdaki farklılıkları ortaya çıkartabilir ve bu tür çalışmalar antagonistlerle muhtemel düşük gebelik oranının çözümlenmesine yardımcı olacaktır.

Folikül sıvısı ve/veya serum sitokin konsantrasyonları ve IVF sonuçları ile ilgili pek çok çalışmanın yapılmış olmasına karşın, folikül sıvı sitokinleri ile overyen stimülasyon için kullanılan stimülasyon protokolü arasındaki korelasyon çok fazla sayıda çalışmada değerlendirilmemiştir. Bildiğimiz kadarıyla, antagonist sikluslarda çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sitokinlerden interlökin IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve interferon gamma (IFN γ) folikül sıvısı ve serum konsantrasyonlarının IVF için kullanılan farklı stimülasyon protokollerine, yani uzun GnRH agonist ve antagonist protokollerine göre farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Açıklanamayan tekrarlayan başarısız implantasyon patogenezinde sellüler immün efektör mekanizmaların rolü araştırma açısından büyük ilgi çekmektedir. Fonksiyonel bir bakış açısından, T-helper lenfositleri, sitokin üretim profillerine göre en az 2 alt-popülasyona kategorize edilebilirler; T-helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) hücreleri (13,14). Th2 hücreleri selektif olarak interlökin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 üretirler ve hücre dışı patogenlere karşı humoral immünite gelişiminde yer alırlar. Th1 hücreleri ise hücre-aracılı immüniteyi ve fagositlere bağımlı enflamasyonu başlatırlar (13,15) ve interferon-gamma (IFN- γ), IL-2, IL-12 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) üretirler.

Gebeliğin Th2 tipinde immüitenin hakimiyetiyle birlikte görüldüğü, diğer yandan tekrarlayan gebelik kayıpları ve birden çok implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda artmış Th1 immün yanıtının belirgin olduğu konusunda hala bir görüş birliği bulunmamaktadır. (16,17). T hücrelerinin ürettiği sitokinlerin profilinde görülen değişiklikler, paternal majör histokompatibilite kompleksi antijenlerinin varlığından dolayı bir allograft olarak kabul edilebilecek olan konseptusun immunolojik toleransında veya rezeksiyonunda önemli bir rol oynarlar. Dolayısıyla, allograft rejeksiyonunu kolaylaştıran Th1 sitokinlerinin gebeliği tehlikeye atabileceği, diğer yandan Th2-tipindeki sitokinlerin Th1 yanıtlarını inhibe etmek yoluyla allograft toleransını arttırabileceği ve böylelikle fetal sağkalımı iyileştirebilecekleri öne sürülebilir (18,19).

Artmış Th1 sitokinleri sentezinin sadece trofoblast antijenleri tarafından değil aynı zamanda hormonal olarak manipülasyona uğramış olan endometriyumun stres ürünlerine, aşırı stimüle edilmiş over ürünlerine veya subra - fizyolojik yüksek düzeylerdeki kadın cinsiyet hormonlarına yanıt olarak antijene spesifik olmayan sitokin üretimi tarafından da indüklenebilir (16).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE VE YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

Fertilize, üreme kapasitesine sahip olmaktır. Üreme dişi ve erkek reproduktif sistemlerinin eşzamanlı ilişkisini gerektirmektedir. Bu ilişki kadında oosit üretimi, erkekte sperm üretimi ve bu gametlerin buluşmasını sağlayacak fallop tüpleri ile embriyonun implante olacağı uterus kavitesinin gerekliliğini içermektedir.

Fekundabilite tek menstrüel siklуста gebe kalabilme olasılığıdır (normal çiftlerin %25'i). Fekundite ise tek menstrüel siklуста canlı doğum elde edilebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (20).

İnfertilite korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamaması olarak tanımlanmaktadır. Bu, üreme yaş grubundaki çiftlerin % 10-15'ini etkilemektedir. Tüm infertil çiftlerde, erkek partnere ait nedenler %25-40, kadına ait nedenler %40-50, hem erkek hem de kadına ait nedenler %10 ve hiçbir nedenin bulunamadığı açıklanamayan infertilite ise %10-15 sıklıkla görülmektedir(21).

İn vitro fertilizasyon (IVF) bir ART yöntemi olup, ovarian foliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi olarak elde edilen spermilerin laboratuvar ortamında fertilizasyonu ve in vitro kültür şartlarında gelişimini takiben embriyoların intrauterin kaviteye transferi şeklinde özetlenebilecek bir tedavi sürecidir.

İn vitro fertilizasyon (IVF) sonucu ilk bebek 1978 yılında dünyaya gelmiştir. Erkek infertilitesinde bir devrim olarak görülen İnter sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ilk kez 1992'de uygulanmıştır. Pek çok yenilik ve gelişmelere rağmen ART sikluslarında ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS) ve çoğul gebeliklerle buna ait komplikasyonlar temel problemler olarak devam etmektedir. Hastaya ait özelliklerdeki farklılıklar, ART 'ye verdikleri farklı yanıtlar nedeni ile tedaviler kişiselleştirilmelidir (22).

2.1.1. Kadın İnfertilitesi

Kadın infertilitesi etiyolojisinde rol alan nedenlerin prevalansı incelendiğinde;

- Ovaryen nedenler (azalmış over rezervi, ovulatuvar disfonksiyon) %30-40
- Tubal veya peritoneal faktör %30-40
- Endometriozis %5-10
- Uterusa ait nedenler %3-5
- Diğer nedenler %5-10 sıklıkla görülmektedir.

2.1.1.1 Ovaryen Nedenler

Anovülasyon ve infertilite ile giden hastalıklar gelişimin nedenlerine göre 3 kategoride incelenmektedir:

- a) Hipogonadotropik anovülasyon (kilo ve vücut kompozisyonunda değişiklikler, stres, aşırı egzersiz, hipotalamusun infiltran hastalıkları, prolaktinoma, boş sella sendromu, Sheehan sendromu, Cushing hastalığı, akromegali vb.)
- b) Normogonadotropik anovülasyon (PCOS)
- c) Hipergonadotropik anovülasyon (prematür ovarian yetmezlik) (22).

İleri yaş, kadın fertilitasını ve tedavi sonuçlarını olumsuz etkileyen en önemli faktördür (23). Azalmış fekundabilite, 30'lu yaşların başında başlar ve 35 yaşından sonra giderek belirginleşir. Kronolojik yaş, spontan ve yardımla üreme sikluslarında reproduktif başarının temel belirleyicisidir; çünkü ileri yaş, azalmış over rezervinin en önemli göstergesidir. Over rezervini değerlendirmede, siklusun üçüncü günü bakılan serum FSH düzeyi, klomifen sitrat challenge test, serum inhibin B düzeyi ve transvajinal ultrason ile over hacmi ve antral folikül sayısının belirlenmesi önerilmiştir (24). Bu testler içinde klinik uygulamada en sık kullanılanlar, siklusun üçüncü günü serum FSH düzeyi ve ultrasonografi incelemesi ile karar verilen over hacmi ve antral folikül sayısıdır. FSH değerinin 10-15 IU/L'nin altında olması beklenir. Bu değer 15-24,9 IU/L'e olması yarı yarıya azalmış fekundite ile ilişkilidir (25).

Ovülatuar problemlerin sıklıkla görülen tipi anovülasyon veya oligoovülasyondur. Konsepsiyon olabilmesi için ovülasyon mutlaka olmalıdır. Ovülasyon olup olmadığını anlamak için kullanılan metotlar:

Hormon düzeyleri: LH düzeyleri ovülasyondan yaklaşık 36-40 saat önce yükselir (26). Bu hormon salınımını idrar testi kitleri veya serum LH düzeyleri de belirleyebiliriz.

Üriner LH ölçümü: İdrar LH kitleri %90 olasılıkla 24-48 saat içerisinde ovülasyonu gösterebilmektedir. LH artışını doğru olarak saptamak için beklenen artıştan 2-3 gün önce başlamak üzere tüm siklus boyunca günlük yapılmalı, ilk pozitif testten sonra devam edilmemelidir. Genellikle ovülasyon, idrar LH artımından 14-26 saat sonra olmaktadır. Fertilitenin en yüksek olduğu dönem, LH artımının olduğu gün ve takip eden iki gündür (27). Ancak kitlerin pahalı olması ve ilişki gününü belirlemedeki psikolojik baskısı nedeni ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından üriner LH kitlerinin kullanımı önerilmemektedir (28).

Bazal vücut ısısı ölçümleri: Sabahın erken saatlerinde vücut ısısı en düşük noktasında iken yapılan seri ölçümler, ovülasyon olup olmadığı ve günü hakkında bilgi verir. Ovülasyonu takiben salgılanan progesteron, termojenik hormondur ve yumurtlamadan sonra vücut ısısı 0.2-0.3 Fahrenheit yükselir. Bu test günümüzde sıklıkla yanlış sonuçlar verdiği için kullanılmamaktadır (29).

Midluteal serum progesteron düzeyi: Serum progesteron düzeylerindeki yükselme ovülasyonun indirekt göstergesidir. Menstrasyon döngüleri 28 gün olan kişilerde menstrasyonun 21.gününde ölçülür. Ortalama zamanı menstrasyon başlangıcından yedi gün öncedir. Düzensiz adet gören kadınlarda serum progesteron düzeyi sonraki siklus başlayana kadar haftalık olarak ölçülmelidir. Luteal fazda ölçülen progesteron düzeyinin 3-5 ng /ml'nin üzerinde olması, ovülasyon göstergesi olarak kabul edilir.10 ng /ml'nin üzerinde olması da yeterli bir luteal faz için göstergedir. Progesteronun pulsatil salınımından dolayı siklusun 20-24. günleri arasında üç serum örneğinin incelenmesi ile luteal faz defekti tanısı konulur (30).

Trans-vajinal ultrasonografi (TV-USG): Preovülatuar foliküllerin büyüme ve gelişmelerinin seri USG takipleri ile izlenmesidir. Ovülasyon zamanını tahminde en iyi yöntemdir (31).

Endometrial biyopsi: Progesteronun histolojik etkisini göstermek amacı ile endometrial biyopsi uygulanır. Luteal faz yetersizliği veya bozukluğu tanısının konulmasında

kullanılmıştır. Ancak günümüzde geleneksel endometrial histolojik gün saptanmasının geçerli bir tanısai yöntem olmadığı gösterilmiştir. Kronik anovulatuvar kadınlarda endometrial hiperplazinin gösterilmesi amacı ile kullanılmaktadır (32).

2.1.1.2 Servikal Faktör

Servikal mukus, vagina ve ejakulattan spermleri yakalayarak diğer seminal proteinleri ayırır, anormal morfolojili spermleri filtre eder, biyokimyasal olarak hazır hale getirir ve sperm için rezervuar görevi yapar (31).

Postkoital Test: Cinsel ilişkiden 2-12 saat sonra alınan servikal mukus örneğinin özelliklerinin incelenmesine dayanır. Fakat günümüzde testin gebeliğin prediktif değerinin düşük olması, anormal sonuçların ve tedavinin gebelik sonuçlarını etkilememesi nedeniyle terk edilmiştir (33).

2.1.1.3 Uterin faktör

Konjenital ya da edinsel anomaliler, tüm infertilite nedenlerinin %3-5'ni oluşturmaktadır. Konjenital defektler uterus, fallop tüpleri, serviks ve üst vajenin embriyolojik gelişimini sağlayan Mülleriyan kanalların komplet yokluğu (Müllerian agenezi), uterusun gelişimsel anomalileri (septus, bikornis), vajinada longitudinal veya transfers septum olması sayılabilir. Edinsel anomaliler dilatasyon ve küretaj, zor doğum, intrauterin araç, geçirilmiş cerrahi sonrası endometrit, adezyon ya da sineşi (asherman sendromu) ile kavitede yer kaplayan lezyonlardır (miyom, polip). En sık görülen anomali septat uterusdur (%1). Komplet ya da parsiyel olabilir. Tanısında histerosalpingografi (HSG) kullanılabilir ancak bikornuat uterusu ayırt edilemeyebilir. TV-USG %100 sensitivite ve %80 spesifiteye sahiptir. Manyetik rezonans görüntüleme tüm uterin anomalilerde tercih edilebilecek bir yöntemdir. Ancak septat uterus tanısında histeroskopi ve laporoskopi altın standarttır. Uterin histeroskopik septoplasti tedavide temel seçenektir. Tekrarlayan gebelik kayıpları olan hastalarda gebelik sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu operasyon, septat uterusu ek açıklanmayan infertilite ya da tekrarlayan gebelik kaybı olan kişilere uygulanmalıdır. Diğer uterin anomaliler ise gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidir. Kişinin gebe kalma potansiyelini etkilemez (34).

Histeroskopi, fertiliteye olumsuz etkisi olan intrauterin adezyonların tedavisi, submukozal myom ve endometrial polip ayrımında ve tedavisinde kesin sonuç veren bir yöntemdir. Eğer HSG veya sonohisterografide bir patoloji görülmüş ise tanısız ve operatif histeroskopi yapılabilir. Kadında histeroskopi genellikle ileri evre bir tetkik yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle tekrarlayan ART başarısızlıklarında, zor intrauterin inseminasyon ve zor embriyo transferi olan hastalara uygulanması önerilir (35).

2.1.1.4 Tubal ve Peritoneal Faktör

Tubal ve peritoneal faktörler kadın infertilitesinin %30-40'nı oluşturur. Tubal faktörler fallop tüplerinin hasarlanması veya obstrüksiyonu ile ilişkilidir ve geçirilmiş pelvik enfeksiyon, pelvik veya tubal cerrahiye bağlı ortaya çıkar. Peritoneal faktörler ise sıklıkla pelvik enfeksiyon, cerrahi veya endometriozis ile görülen paratubal ve paraovaryan adezyonlarla ilişkilidir. Ayrıca tubal patoloji açısından yüksek riskli hastalarla düşük riskli hastaların ayrımında Chlamydia trachomatis immunglobulin G serolojisi taraması tavsiye edilmektedir. Chlamydia serolojisi pozitif çıkan ya da HSG'de bilateral tubal tıkanıklık tesbit edilen hastalara laparoskopi önerilmektedir (36).

Histerosalpingografi (HSG), tubal patensinin değerlendirmesinde ilk yapılması gereken testtir. HSG'nin, tubal oklüzyonu tanımlamada %65 duyarlılık ve %83 seçiciliğe sahiptir (31). Siklusun 6-11 günleri arasında yapılması gereken bu görüntüleme, endoservikal kanala yerleştirilen bir kanül aracılığı ile suda çözünen (günümüzde daha fazla tercih edilir) veya yağda çözünen kontrast madde uterin kaviteye enjekte edilir ve seri floroskopik çekimlerle uterin kavitenin dolumu, kontrast maddenin tubalardan geçişi ve peritoneal kaviteye serbestçe dağılımı görüntülenir.

Laparoskopi, tuboperitoneal nedenlerin tanısında altın standart yöntemdir. Pelvik organların direkt vizualize edilmesi, paratubal/paraovaryan adezyonlar ve endometriozisin değerlendirilmesi ve tubal patensinin ve tubaların fimbriyal yapısının direk incelenmesi mümkündür (37).

2.1.2 Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite, infertilite değerlendirmesinde yapılması gereken standart testlerin hepsinin normal gelmesi (normal semen analizi, dokümanite edilmiş ovülasyon bulgusu, normal uterin kavite, bilateral tubal patensi) durumudur. İnsidans tüm infertil popülasyonda %5-20 civarındadır.

Açıklanamayan infertilite, reproduktif verimlilik eğrisinin alt sınırı olarak kabul edilebilir. Bu olgularda ortalama siklus fekunditesi üçüncü yıldan sonra %2-4 civarındadır; bu oran normal fertil çiftlerde beklenen oranın (%20-25) çok altındadır (38). Muhtemelen standart değerlendirme metotları ile gösterilemeyen sperm veya oosit fonksiyonlarında, fertilizasyonda, implantasyonda veya embriyo gelişiminde anormallikler nedeniyle subfertilite olmaktadır.

2.1.3 Endometriozis

Endometriozis, üreme çağındaki kadınlarda görülen bir hastalıktır. Endometriozis; endometrial tabakanın karın içinde başka yerlere (fallop tüpleri, overler, Douglas, periton, mesane ve bağırsaklarda) yerleşmesi olarak tanımlanır. İnfertilite şikâyeti olan olguların ise %20-30'unda endometriozise rastlanmaktadır. Endometriozisin infertilite ve ağrı (devamlı alt karın ağrısı, dismnore ve disparoni) olmak üzere başlıca iki önemli belirtisi vardır. Endometriozis, karın içinde adezyonlara sebep olur. Bunun dışında fallop tüplerinin ve overlerin fonksiyonunu bozarak infertilite yapabilir. Karın içindeki endometriozis; periton, over ve derin endometriozis olmak üzere üçe ayrılır. Endometriozisli olgularda tanı için jinekolojik muayene bulguları, ultrasonografi (overlerde çikolata kistleri için), MRI (dokunun içine yerleşen derin endometriozis odakları için), kanda bakılan tümör belirteçleri (CA 125, CA 19-9) ve laparoskopi kullanılır. Laparoskopi ile hastalığın tanısı esastır. Laparoskopi ile hem hastalığın evresi saptanır (Evre I hafif, evre IV ağır) hem de endometriozis odaklarından patolojik tanı için biyopsi alınabilir (39).

2.1.4 Erkeğe ait nedenler

Erkeğe bağlı kısırlığı değerlendirmek için yapılan en basit ve önemli test semen analizidir (spermiogram). Erkeğin geçmişinde geçirilen hastalıklar ve enfeksiyonlar (kabakulak, cinsel temasla bulaşan hastalıklar), geçirilen cerrahi girişimler (fitik vb.), kullanılan ilaçlar, alkol kullanımı, radyasyon maruziyeti, Steroid kullanımı, kemoterapi, toksik ajanlar, kriptoorşidi, testis travması ve varikosel varlığının araştırılması önemli yer tutar.

2.1.4.1. Klasik semen analizi.

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk adım en az dört hafta ara ile uygun yapılmış iki semen analizi olmalıdır. Bu konu WHO tarafından bir kitap halinde hazırlanmış ve dünyada en çok kullanılan referans kitap haline gelmiştir (Tablo.1)

Tablo.1. Klasik semen analizi (40).

Görünüm:	Homojen, gri-opak
Viskozite:	≤ 2 cm
Likefaksiyon süresi:	$< 20-30$ dakika
Volüm:	≥ 2 ml
pH:	7,2-8,0
Sperm sayısı:	≥ 20 milyon/ml
Total sperm sayısı:	≥ 40 milyon/ml
Total motilite:	$\geq \% 50$
Hızlı ileri hareket:	$\geq \% 25$
Morfoloji:	$\geq \% 30$ WHO kriteri($\geq \% 14$ Kruger)
Vitalite:	$\geq \% 75$
Beyaz küre	≤ 1 milyon/ml
İmmunobead test: spermatozoolar	$\leq \% 50$ immün taneciklere bağlı motil
MAR Testi: yapışık	$\leq \% 50$ motil spermatozoalarda partiküller
Bioasseyler	
Hemizona İndeks	$\geq \% 35$
HOS Test	$\geq \% 60$
Sperm penetrasyon assay	$\geq \% 10$

Bazı semen değişkenleri için terminoloji řu şekildedir:

- **Normospermi:** Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
- **Oligospermi:** Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu
- **Astenospermi:** Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer
- **Teratospermi:** Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
- **Oligoasthenoteratospermi:** Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder
- **Azospermi:** Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması
- **Aspermi:** Hiç ejakülat elde edilememesi (40)

Klasik semen analizi için incelenecek ejakülat en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında masturbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhiz yedi günü geçmemelidir. Örnek en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak laboratuara getirilmiş olmalıdır. Ejakülatın makroskopik muayenesinde görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi ve pH'ı değerlendirilir. İlk değerlendirme için iki örnek alınmalıdır. İki örnek arasında geçen zaman yedi günden az, üç haftadan çok olmamalıdır. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı ve sınıflandırılması, aglütinasyonun varsa derecelendirilmesi ve morfoloji incelenir.

Sayı: Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan 100 karedeki spermleri saymaktır.

Kullanılan alete bağımlı olarak, tek karedeki ortalama sperm sayısı temel alınıp sayım milyon/ml olarak ifade edilir.

Hareketlilik: WHO hareketliliği dört sınıfta değerlendirilmektedir;

- a) Hızlı doğrusal progresif hareket
- b) Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hareket
- c) Progresif olmayan hareketlilik
- d) Hareketsiz (40)

Morfoloji: Kruger ve ark. (41) tarafından "Strict" kriterleri ile morfoloji değerlendirilmesinin tanımlanmasıyla bu parametre giderek artan bir önem kazanmıştır. Bu yöntem ilk kez 1986 yılında yayınlanmış ve 1990 yılında Menkveld ve ark. (42) tarafından modifiye edilmiştir.

Kısa süre içerisinde rutin incelemede yerini alan bu yöntemin, WHO kriterlerine göre morfoloji değerlendirilmesi yöntemine olan üstünlüğü de gösterilmiştir. Kruger'e göre morfoloji % 4'den az, %4-14 ve %14'den fazla olarak sınıflandırılmaktadır. Normal morfoloji %14'den az olduğunda IVF ile her oosit başına fertilizasyon oranı %37 iken, %14'den büyük olanlarda oran %91'e yükselmektedir (43).

2.2. İn Vitro Fertilizasyon

2.2.1. Tanımı ve endikasyonları

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT): Klasik invitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF/ET), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), intrauterine inseminasyon (İÜİ), mikroepidimal sperm aspirasyon(MESA) ve testiküler sperm ekstraksiyonunu (TESE) içerir.

IVF işlemi eksojen gonadotropinlerin kullanımıyla overlerin kontrollü hiperstimülasyonu (KOH) sonrasında transvajinal ultrasonografi eşliğinde oositlerin toplanması, laboratuarda fertilizasyonu ve embriyoların transservikal olarak uterusu transferini kapsamaktadır. IVF ile dünyaya gelen ilk gebelik 1978'de gerçekleşmiştir (44).

IVF endikasyonları şunlardır (45):

- Tubal faktör
- Endometriyozis (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)
- Açıklanamayan infertilite (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)
- Ovulatuvar disfonksiyon (diğer tedavilere yanıt olmaması durumunda)
- Over yetmezliği (oosit donasyonu ile)
- Over rezervinin azalması
- Ciddi erkek faktörü

2.3. Ovarian Stimülasyon Seçenekleri

İlk elde edilen IVF gebeliği uyarılmamış doğal bir sikludan toplanan oositle elde edilmiştir (46). Doğal IVF siklusu, tabi ki, halen mümkündür; ancak siklus iptali şansı fazladır (%25-75) ve siklus başına gebelik oranı oldukça düşüktür (47). Oosit toplanması fertilizasyon

başarılı olsa bile doğal sikluslarda sadece bir tane olgun oosit ve tek bir embriyo elde edilir (48). Embriyoları seçmek veya dondurup saklamak gibi bir seçenek yoktur ve toplam başarı oranı nisbeten düşük implantasyon oranına işaret etmektedir. Doğal IVF siklusu over uyarımına zaten düşük cevap veren hastalar için (1-2 folikül) veya uyarımının medikal sebeplerden dolayı sakıncalı olabileceği durumlarda bir seçenek olabilir (49). Eksojen hCG enjeksiyonu öncül folikül yeterli olgunluğa eriştiğinde yapılır ve bu yüzden oosit toplama için en uygun zamanı saptamak için endojen LH monitorizasyonu yapma gereği yoktur. GnRH antagonist ile adjuvan tedavi erken LH pikini engeller ve doğal IVF siklusu sonuçlarında düzelmeye sebep olur (50).

Ovülasyon induksiyonu ilaçları çoklu foliküler gelişimi sağlar ve en çok sayıda oosit oluşmasını sağlar. Böylece fertilizasyon olasılığı, transfer edebilecek ve seçilebilecek embriyo sayısı artar ve başarı şansı artar (51).

Birçok tedavi rejimi mevcuttur. Hiç uyarım yapmaktan (doğal siklus) minimal uyarım yapmaya kadar (klomifen sitrat) veya hafif uyarımdan (klomifen sitrat ve düşük doz eksojen gonadotropin ile ardışık tedavi), agresif uyarıma (GnRH agonisti veya agonisti ile beraber veya tek başına yüksek doz gonadotropin tedavisi) kadar bir çok seçenek olabilir. Her birinin kendine has avantajları, dezavantajları ve kullanılabilirliği mevcuttur. Tedavi rejiminin seçilmesinde bireyin yaşı, daha önceki herhangi bir tedaviye cevabı ve over rezervi önemli rol oynar (52).

2.3.1. Uzun Protokoller

Sıradan bir siklusta, GnRH agonist tedavisi mid-luteal aşamada ovülasyondan yaklaşık bir hafta sonra başlar. Bu dönemde endojen gonadotropin düzeyleri düşüktür ve agonistlerin sahip oldukları alev (flare) etkileri yeni bir foliküler gelişimi uyarmak anlamında en düşük seviyededir. Tedavi aynı zamanda erken foliküler dönemde de başlayabilir ancak hipofizer baskılanma için ihtiyaç duyulan süre daha uzundur. Analog tedavisi mensturasyonun üçüncü gününe kadar tam dozda verilir. Üçüncü gün yapılan USG'de 10 mm'den büyük folikül olmaması ve serum E2'nin 50 pg/ml'den az olması yeterli supresyon elde ettiğimizin göstergeleridir. Mensturasyonun ikinci veya üçüncü gününden itibaren tedaviye gonadotropinler eklenir ve analog dozu yarıya düşürülür veya aynı dozda devam edilir. Gonadotropin dozu hastanın yaşı, over kapasitesi ve daha önce induksiyon almışsa o

tedavideki yanıtlarına göre başlanır. Gonadotropin dozları basamaklı artış veya azalma şeklinde folikül gelişimine göre değiştirilir. Seri serum E2 tayini ve over foliküllerinin TV-USG ile değerlendirilmesi ile uyarıya cevap değerlendirilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki folikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında folikül olabilir. Serum E2 düzeyi ise 14 mm ve üstü foliküller için folikül başına 200 pg/ml'dir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılır. Uzun protokoller ART sikluslarında en çok tercih edilen protokollerdir. Luteal fazda ya da foliküler fazda başlansın uzun protokolün istenmeyen bir yan etkisi fonksiyonel kist oluşumudur. Tedavi öncesi oral kontraseptif kullanımı bu yan etkiyi azaltmaktadır. Oral kontraseptifin bir başka yararı ise GnRH analog kullanımı sırasında erken gebelik olasılığını engellemesidir (51).

Bazen stimülasyon aşırı artmış foliküler cevap, artmış masif ovarian genişleme, bütün foliküllerde artış ve yüksek serum E2 düzeyleri (3000 pg/ml'den fazla) ile sonuçlanabilir. Bu durumda OHSS riski belirgin olarak artmıştır. Bu hastalarda siklus iptal edilebilir; „coasting“ denilen analoga devam edilirken 1-3 gün gonadotropin dozu kesilip serum E2 normale gelince hCG verilebilir; embriyo transfer günü 5.güne geciktirilebilir ya da embriyolar dondurulabilir(52).

2.3.2. Kısa Protokoller

Over rezervinin kısıtlı olduğu (poor responder) olgularda kullanılır;

- a) Kadın yaşı >40
- b) Günlük ortalama gonadotropin dozu >300 IU
- c) hCG günü folikül sayısı <5
- d) Elde edilen matür oosit sayısı <5
- e) Erken foliküler faz FSH >15 mIU/ml
- f) hCG günü E2 <600 pg/ml (53)

Kısa protokolde GnRH analogu mensturasyonun 2-4. gününde verilir, daha sonra dozu azaltılır ve gonadotropin enjeksiyonuna mensturasyonun 3.günü başlanır. Folikül gelişimi TV-USG ile takip edilerek gerekirse gonadotropin dozları değiştirilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki folikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında folikül olabilir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit

toplama işlemi yapılır. Ultra-kısa protokol ise alev (flare) etkiyi uyarmak için agonist tedavi üç gün süre ile verilir, daha sonra kesilir; tedavi sadece gonadotropinle devam eder. Ancak erken LH artışları diğer protokollere göre daha sıktır çünkü endojen gonadotropin salgılanmasını baskılamak için daha uzun süre analog tedavisi gerekmektedir. Düşük başarı oranları nedeni ile nadiren uygulanır (52). Mikrodoz protokolünde, tedavi öncesinde oral kontraseptif kullanımı ile foliküler faz başlangıcında verilen GnRH-a etkisi ile gelişecek korpus luteumun kurtarılması problemi ortadan kaldırılmaktadır. GnRH-a dozunun düşük tutulması (80 µg/gün leuprolide asetat) ile ekzojen gonadotropinlere endojen hormonlar destek vermektedir (52). Flare etkinin dozu, klasik ko-flare protokollerinde görülen erken LH yükselmesine neden olacak düzeye ulaşmamaktadır. Bu protokolda 21 gün süre ile oral kontraseptif kullanılır, ilaç bitiminde üç gün ara verilir. Ardından iki gün GnRH-a başlanır ve 3.günden itibaren rFSH veya HMG eklenir. Diğer takipler önceden belirtildiği gibi yapılır (52).

2.3.3. Antagonist Protokolleri

GnRH antagonistleri doz bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke eder ve hızlı şekilde gonadotropin salınımını inhibe ederler. Antagonist tedaviye genellikle gonadotropin tedavisi başlandıktan 5-6 gün sonra ya da en büyük folikül 13-14 mm çapına ulaştığında başlanır. Antagonist ve gonadotropinler hCG gününe kadar birlikte verilir. Alternative olarak tek ve yüksek doz antagonist kullanılabilir. Tek doz antagonist siklusun 8.günü verilir. Tek doz antagonist erken LH artışını 96 saat kadar geciktirecektir. Yavaş cevap verenlerde ise 2.doz antagonist gerekebilir. Genelde hedef 17-18 mm çapta en az iki folikül elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında folikül olabilir. Bu hedefe ulaşıldığında 5000-10000 IU hCG uygulanır ve 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi yapılır. Antagonist protokollerde kullanılan toplam gonadotropin dozunun daha az olması nedeni ile maliyeti daha azdır. Önemli bir komplikasyon olan OHSS riski analog protokollere göre daha düşüktür. Ancak elde edilen oosit ve embriyo sayısı ve klinik gebelik oranı da antagonist sikluslarda daha düşüktür (54).

2.4. OVÜLASYON İNDÜKSİYONU MONİTORİZASYONU

Hastaların takibinde E2 ve TV-USG kullanılır. Folikül boyutunun takibinde ve hCG gününün belirlenmesinde ultrason kullanılır. Ortalama folikül boyutu 16-18 mm'ye ulaşan iki adet folikül görüldüğünde hCG yapılır. Ayrıca folikülometrinin son aşamasında endometrium kalınlığı da ölçülür. Endometrium kalınlığı 7 mm'nin altında olduğu olgularda gebelik oranı anlamlı düşüktür (55). Normal giden bir siklusta geç foliküler fazda E2'nin bir gün önceki değerine oranla %50 civarında artması, foliküllerin ise 1-3mm/gün büyümeleri beklenir.

Ovülasyon indüksiyonunda gonadotropin başlanan günden hCG gününe kadar geçen süre ortalama 10-12 gündür. hCG yapıldıktan 34-36 saat sonra yumurta toplama işlemi (oocyte pickup,OPU) yapılır.

2.5. Folikül Aspirasyonu ve Fertilizasyon

HCG uygulamasının 36. saatinde oositler transvajinal ultrasonografi eşliğinde folikül aspirasyonu yöntemiyle toplanmaktadır. Analjezi/anestezi eşliğinde (sedasyon altında paraservikal blok veya spinal anestezi tercih edilebilir) ultrasonografik gözlemlerle her bir foliküle iğne ile girilerek içerik aspire edilir. Toplanan oositlerin matürasyonu mikroskop ile değerlendirildikten sonra klasik IVF uygulanacak ise kumulus hücreleri mekanik olarak gevşetilir ardından uygun bir inkübasyon medyumuna aktarılarak %5-6 CO₂'li inkübatörde ortalama 3 saat inkübe edilir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanacaksa matür oositlerin, kumulus korona ve oosit kompleksi, enzimatik (hyaluronidaz ile) ve mekanik olarak denüde edildikten sonra iki saat inkübe edilir. İnseminasyondan bir-iki saat önce hastanın eşinden sperm örneği alınır. Elde edilen motil spermler yıkandıktan sonra yoğunlaşma ve motilite tekrar değerlendirilerek 37 derecede %5 CO₂'li inkübatörde 30 dakika bekletilir. Fertilizasyonun sağlanması için toplanan oositler kültür medyumunda hazırlanmış spermler ile bekletilir. Fakat ciddi erkek faktörü varsa, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanır. Erkek faktör olmayan olgularda ICSI'nın konvansiyonel IVF'e üstünlüğü saptanmamıştır (56). O nedenle erkek faktörü olmayan olgularda IVF tercih edilmektedir.

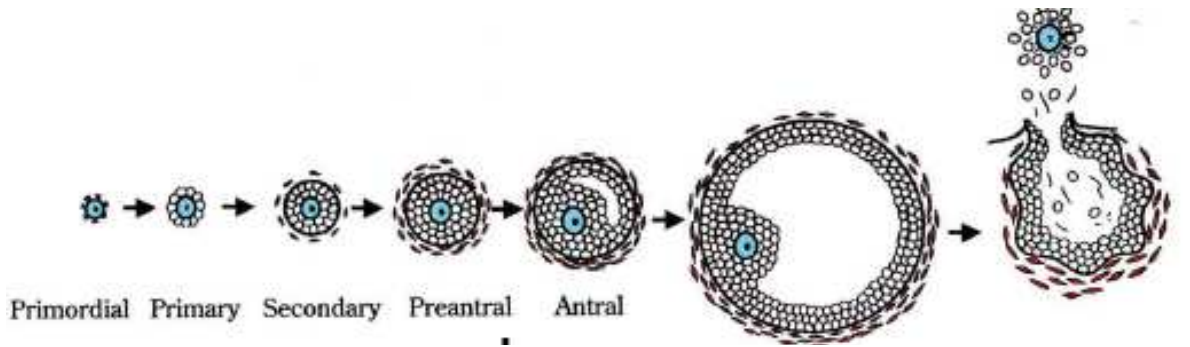
2.6. OOGENEZİS

Doğum sırasında overler 1-2 milyon germ hücresi içerir. Pubertede bu sayı 300.000-500.000'e düşer. 35-40 yıl süren reproduktif dönemde 400-500 germ hücresi ovülasyon için seçilmekte diğerleri atreziye uğramaktadır (57). Gametogenez ve steroidogenez overlerin iki önemli fonksiyonudur. Oositlerin periyodik olarak oluşum ve atılımları geniş anlamda folikülogenezdir. İntrauterin hayatta 6-8.haftalarda germ hücrelerinde hızlı mitotik bölünmelerle ilk işaretlerini veren ovarian başkalaşım ile 16-20.haftalarda 6-7 milyon oogoniaya ulaşılır. Bu gonadın en yüksek oogonal seviyesidir.

2.6.1 Foliküler gelişim

Foliküller steroidojenik ve ovulatuar potansiyellerini elde edebilmek için çeşitli gelişimsel basamaklardan geçer. Fetal overde 20. haftada yaklaşık 6-7 milyon primordial folikül bulunur. Fakat bunların çoğu pre veya postnatal dönemde dejenere olur (58). Bir menstrüel döngünün ortalama süresi 28 gündür. Primordial folikülden preovulatuar folikül aşamasına kadar olan gelişim süreci ise yaklaşık 85 gün sürmektedir (59). (Şekil 1). Foliküler gelişimin tamamlanması ve ovülasyonun gerçekleşmesi için hipofiz ön lobundan salınan gonadotropin hormonlara (FSH ve LH) ihtiyaç vardır. Foliküler gelişimin ilk bulgusu primordial folikül içindeki primer oosit boyutlarının artmasıdır. Ayrıca folikül çevresindeki granuloza hücreleri küboidal hale gelir. Granuloza hücreleri ve oositler arasında bağlantı yolları oluşur. Granuloza hücreleri ile oosit arasındaki besin alışverişi, büyüme faktörleri transferi, metabolitlerin uzaklaştırılması bu bağlantı yolları aracılığı ile sağlanır. FSH uyarısı ile primordial folikül çevresindeki granuloza hücreleri bir bazal membranda çoğalmaya başlar ve primer folikül oluşur. Folikül çevresindeki teka hücreleri farklılaşmaya başlar (60). Foliküler gelişim devam ettikçe oosit çevresindeki granuloza hücreleri çok katlı hale gelir. Stromadaki tekal hücreler folikül çevresine doğru yaklaşır. Granuloza hücre bazal membranına yakın olan teka hücreleri teka interna, daha uzakta olanlar teka eksterna olarak adlandırılır. Bu yapıya preantral folikül denir. Preantral folikülde steroidegenез başlar. Preantral folikülde farklı hücrelerde farklı gonadotropin reseptörleri bulunur. Teka hücreleri LH reseptörü, granuloza hücreleri ise FSH reseptörü taşımaktadır. LH teka hücrelerindeki membran reseptörüne bağlandığında, hücrede kolesterolden androstenedion ve testosterona kadar olan steroidegenезi uyarır. Teka hücrelerindeki androstenedion ve testosteron granuloza

hücrelerine aktarılır. Preantral foliküldeki granuloza hücreleri teka hücrelerinden gelen androjenleri aromataz enzimi ile östrojenlere çevirir. Folikülde üretilen östrojen, FSH ile sinerjistik olarak granuloza hücre proliferasyonunu ve hücre üzerindeki FSH reseptör sayısını artırır. Folikül gelişimine devam ettikçe önce granuloza hücreleri arasındaki boşlukta sıvı birikimi gözlenir. Daha sonra bu küçük boşluklar birleşerek antruma dönüşür ve antral folikül oluşur. Granuloza hücrelerinden salınan inhibin-B foliküler fazda FSH etkisi ile üretilmektedir. İnhibin-A ise luteal fazda LH etkisi ile salınır. Her iki inhibin formu FSH üretimini ve salınımını inhibe eder. Folikül geliştikçe östrojen ve inhibin-B üretimi artar. Üretilen bu iki hormon negatif feed-back ile hipofizer gonadotroplardan FSH üretimini azaltır. Overde gelişmekte olan antral foliküllerden FSH reseptörü fazla olan, ortamda azalan FSH'ı diğerlerine göre daha fazla bağlar ve gelişimine devam eder. Bu folikül dominant folikül olarak adlandırılır. Diğer foliküller ise atreziye uğrarlar. Dominant folikül gelişimine devam ederken boyutları ve folikül sıvısı artar. Primer oosit çevresindeki özelleşmiş granuloza hücrelerinden oluşan yapıya ise kumulus ooforus denir. Folikül geliştikçe üretilen östrojen granuloza hücrelerinde LH reseptörleri belirmesine neden olur. LH etkisi ile bu hücrelerde yağ birikimi başlar. Bu değişime luteinizasyon denir. LH'nin yükselmeye başlamasından 36 saat sonra folikül sıvısında oluşan plazminin etkisi ile kollejenaz aktive olur ve folikül duvarında rüptür ve ovülasyon gerçekleşir. Ovülasyondan sonra geriye kalan foliküller yapı ise korpus luteum olarak adlandırılır (61).



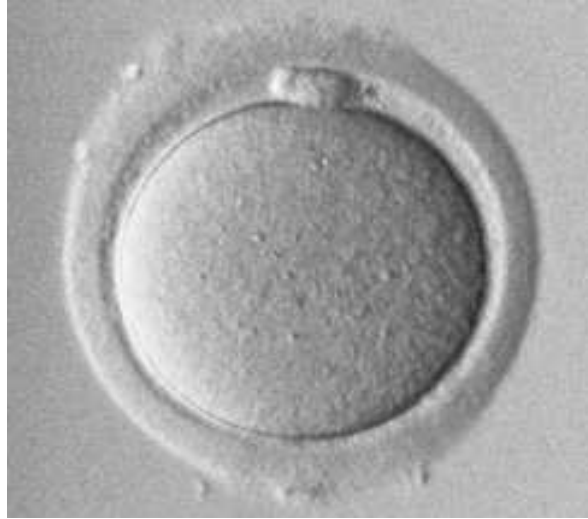
Sekil 1: Folikülogenez basamakları

2.7. OOSİT MATÜRASYONU

Oosit, kadın vücudunda sadece yapısal ve fonksiyonel yönden değil, mayoz yani redüksiyonel bölünmeye uğrayan tek hücredir. Oositteki mayotik sürecin ilerlemesi oosit matürasyonu olarak bilinir ve basitçe birinci mayotik bölünmenin tekrar başlayarak metafaz II (MII) fazına ilerlemesi ve beraberinde başarılı fertilizasyon ve erken embriyonel gelişme için gerekli sitoplazmik değişikliklerin olmasıdır (62). Aslında bu tanım nükleer ve sitoplazmik matürasyon olarak bilinen birbiri ile yakın ilişkili süreçleri tarif etmektedir.

2.7.1. Nükleer Matürasyon

Nükleer matürasyon temelde oositin mayoz 1 diploten evrede arreste uğramış bölünmesini 2.mayoz bölünmenin metafazına kadar ilerletmesi ve fertilizasyona hazır hale gelmesi olarak tanımlanır. Oositler tam bir matürasyon için siklus ortası LH pikine ihtiyaç duyarlar. LH reseptörlerinin uyarılması cAMP üretimine yol açar (63). Oosit mikroskop altında birinci polar cisim içeren metafaz 2 (MII); birinci polar cisim ya da germinal vezikül içermeyen metafaz 1 (MI); germinal vezikül içeren profaz 1 (PI) olarak grublandırılır. MII oositlerin fertilizasyon oranları belirgin olarak fazladır (64).



Şekil-2: Matür oosit ve 1. polar cisimcik

Ovülasyonda atılan oosit matür oosit ya da MII oosit olarak isimlendirilir. Ovülasyondan önce oosit intakt bir germinal vezikül içerir. Oosit 6 basamakta nükleer matürasyonunu tamamlar.

- a) Mayozun yeniden başlaması ve germinal vezikül yıkımı (GVBD)
 - b) Kromatin kondensasyonu
 - c) Mayotik spindle halkasının oluşumu
 - d) Homolog kromozomların ayrılması
 - e) Orantısız sitoplazmik bölünme ve 1.kutup cisimciğinin oluşumu
 - f) Mayozun tekrar durması
- 2.mayoz bölünme fertilizasyon sırasında spermin oosite girmesi ile tamamlanır (65).

2.7.2. Sitoplâzma Matürasyonu

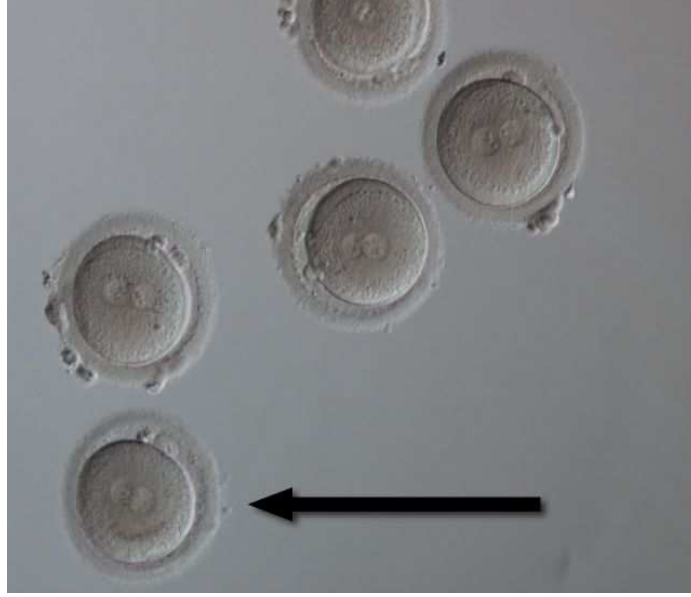
Sitoplâzma matürasyonu başarılı bir fertilizasyon, pronükleer biçimlenme ve implantasyon öncesi embriyonik gelişim için gerekli yapısal materyallerin sağlanması ve gerekli biyokimyasal sürecin oluşması, moleküllerin zamanında aktive olması, uygun depolanma kadar, organellerin yeniden yerleşmesi, proteinlerin ve mRNA' ların sentezini ve modifikasyonu içeren süreç olarak tanımlanır.

Sitoplazmik ve nükleer matürasyon, nükleer içeriğin germinal vezikülün yıkılması (GVBD) ile sitoplâzmaya salınmasıyla, birbiri ile koordineli hale gelen olaylardır. Her ne kadar nükleer matürasyon bazı yönlerden sitoplazmik matürasyonu etkilese de, en azında bazı durumlarda sitoplazmik matürasyon nükleer olaylardan bağımsızdır (66). Bu nedenle oositler birinci polar cisimciği atıp nükleer matürasyon açıdan matür (MII) olsa bile, aslında bu oositler fertilizasyon, pronükleer oluşum ve embriyonik gelişim için gerekli maternal faktörleri içermeye yetersiz olabilirler (65).

2.8 Embriyoner Gelişim

2.8.1 Erken Embriyonel Gelişim

İnseminasyondan 16–18 saat sonra pronükleuslar oosit sitoplâzmasının ortasında gözlenir. 20–34 saat sonra pronükleuslar birleşir yani singami oluşur. Bunu 35,6 saat sonra sitoplâzmanın ikiye bölünmesiyle meydana gelen iki diploid blastomerin oluşumu izler. Bu yapı iki hücreli bir embriyo olan zigottur. İnseminasyondan 45,5–45,7 saat sonra yani ikinci günde embriyolar dört hücreli, daha sonraki bölünme ile üçüncü günde ortalama 54,3–56,4 saatlerde 8 hücreli aşamaya ulaşılır.



Şekil-3: Fertilize olmuş oositler (pronukleuslar merkezde izleniyor)

Embriyonun ikinci ve üçüncü bölünmeleri arasında (dört blastomerli evreden sekiz blastomerli evreye geçiş) maternal genden embriyonik gen dağılımı aşamasına geçiş gerçekleşmektedir. Bu nedenle, spermle birleşmeden itibaren ilk 48 saatte embriyo öncelikle maternal mRNA etkisiyle protein sentezi gerçekleştirirken, bundan sonraki aşamalarda embriyonik genom aktivasyonu ile gelişmeye devam ederler (67).

Klinik IVF’de embriyo değerlendirmesinde kullanılan en önemli ölçütlerden biri de fragmantasyondur. Fragmantasyon hücrenin plazma membranının ekstrasellüler bölgeye bir atığıdır ve sitoplazma içerir (67). Fragmantasyon oluşumun intrasellüler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bölünme sırasında oluşan ölümcül zararlar ve apoptotik olaylara bağlı olduğu iddia edilmiştir (68). İn vitro fertilizasyonda embriyonun gelişim özellikleri ve implantasyon potansiyeli değerlendirilirken; günü ile uyumlu blastomer sayısı ve büyüklüğünün yanında fragmantasyon miktarı, dağılımı ve büyüklüğü de uygun embriyonun bir seçim kistası olarak kullanılmaktadır (69). Buna göre sitoplazmik fragmantasyonun miktarı ve dağılımı, embriyonun implantasyon potansiyeli ile ters orantılıdır ve embriyonun gelişimi üzerine olumsuz etkileri olabilir (70)

2.8.2 Morula ve Blastokist Gelişimi

İnseminasyondan sonraki üçüncü günde blastomerlerin sitoplazmasında granüler bir yapılanma küçük çukurlaşmalar gözlenebilir. Bu görünüm blastomerler arasında bağlanmanın artması ve sekiz hücreli bir embriyonun kompaktlaşmaya hazırlığı olarak yorumlanmıştır (67).

Fertilizasyondan sonraki dördüncü günde embriyo kompaktlaşmaya başladığı zaman morula olarak adlandırılır. Bu evrede blastomerler arasında, iletişimi ve hücreler arası bariyer oluşumu sağlayan sıkı ve gevşek bağlar oluşmuştur. Morula evresinde hücreler arasında kavite olduğu zaman embriyo blastokist adını alır. Kavitasyon ilerledikçe kompaktlaşma sırasında blastomerlerin kutuplaşmasıyla meydana gelen iki farklı hücre grubu (a) Ekstraembriyonik dokuyu oluşturacak trofektoderm (b) Embriyo ve daha sonra fetüsün gelişimi devam ettirecek iç hücre kümesini oluşturur. İn-vitro blastokist oluşumu inseminasyondan sonra 5 ve 7. günlerde gerçekleşir. Zona pellusida, fertilizasyonda çok önemli rolü olan ve henüz intrasellüler bağları oluşmamış blastomerleri bir arada tutarak fizyolojik bir bariyer görevi üstlenen, glikoprotein yapıda bir tabakadır. Zona pellusida, gelişen blastokistin hacim olarak büyümesi ile giderek incelir ve sonuçta açılan delikten blastokist fıtıklaşmaya başlar. Bu olaya hatching, bu aşamadan sonra 6-7. günde zona pellusidadan tamamen çıkan embriyoya ise hatch olmuş blastokist denir (67).

2.8.3 Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi

İlk tanımlamalar 1986 yılında hücre sayısı, blastomer büyüklüğü ve fragmentasyon oranını içeren 2.gün embriyo gelişimi değerlendiren skor sistemi ile başlamıştır (71).

Devam eden çalışmalar 3.gün embriyo değerlendirmesinin 2.gün değerlendirmeye göre gebelik başarısı, implantasyon oranı ve canlı doğum oranlarını belirlemede daha etkili olduğunu göstermiştir (72).

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinin temel amacı gebelik oranlarını öngörmede anne yaşı ve transfer edilen embriyo sayısına göre daha iyi bir belirteç bulmaktır. Böyle bir belirteçin tanımlanması yüksek oranda başarı, tek embriyo transfer edebilmek böylece çoğul gebelik riskini azaltmaktır (73,74).

1988 yılında Veeck'in (64) yaptığı embriyo kalitesi sınıflandırma sistemi halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna göre;

Grade 1: Eşit büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon yok

Grade 2: Eşit büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon minimal

Grade 3: Farklı büyüklükte blastomerler ve sitoplazmik fragmantasyon yok

Grade 4: Farklı büyüklükte blastomerler ve major sitoplazmik fragmantasyon

Grade 5: Az ya da tanımlanamayan blastomerler ve major sitoplazmik fragmantasyon

Terriou ve ark. (66) 2001'de 10.000 embriyo ile tanımladıkları kümülatif embriyo skoru; klivaj embriyo (1 puan), fragmantasyon (yok 1 puan), bölünme durumu (4 hücre 1 puan), irregüler hücre varlığı (yok 1 puan) alt başlıklarına göre hesaplanmaktadır. Multivariable analizde kümülatif embriyo skoru gebelik oranları üzerinde en etkili parametre olarak tespit edilmiştir.

Desai ve ark. (75) 2000 yılında embriyo kalitesini belirlemek için 3.gün embriyo değerlendirmesinde kullandıkları parametreleri hücre sayısı, fragmantasyon paterni, blastomer büyüklüğü, eşitliği ve ekspansiyonu, sitoplazmik pitting, sitoplazmanın vakuol içermemesi olarak tanımlamışlardır. Yüksek kaliteli embriyoların ekspansiyon, zonaya değen ve az bir perivitellin boşluk içeren blastomerlerden oluştuğunu göstermişlerdir. Bu parametreler içinden en anlamlısının hücre sayısı olduğunu tespit etmişlerdir.

2003 yılında Fisch ve ark. (76) dereceli embriyo skoru tanımlamış bu da inseminasyondan 16-18 saat sonra pronükleer morfoloji, 25-27 saat sonra erken klivaj ve 64-67 saat sonra 3.gün embriyo morfolojisi değerlendirilmesini içermektedir. Yalnızca 3.gün değerlendirmesine göre gebelik sonuçlarını tespitinde daha anlamlı bulunmuştur.

2008 yılında Loi ve ark. (77) ICSI sikluslarında 5 parametre içeren kümülatif embriyo skoru tanımlamışlar. Bölünen hücre sayısı (44.saatte 4, 68.saatte 6-8 hücre), fragmantasyon varlığı, hücre şekil ve boyutu, sitoplazma durumunu değerlendirmişlerdir. Kümülatif embriyo skoru arttıkça implantasyon oranı, gebelik oranı ve canlı doğum oranlarının arttığını göstermişlerdir. Embriyo kalitesine ilave olarak pro-nükleer skorlamanın kullanılması (nükleolus büyüklüğü, sayısı, skorlaması) bazı araştırmacılar tarafından faydalı bulunmuştur (78,79).

Bir başka çalışmada inseminasyondan 16-18 saat sonra zigot morfolojisi incelenmiş, 3.gün embriyo morfolojisi kadar değerli olmadığını gösterilmiştir (80).

2.9 Sitokinler

Foliküler sıvı fonksiyonlarındaki ve biyokimyasındaki farklılıkların oositlerin gelişim potansiyelini hem hücresel hem de kromozomal düzeyde etkilediği öne sürülmektedir. Foliküler sıvılar oosit matürasyonunun gerçekleştiği ortamı sağlarlar. Bu yüzden, foliküler sıvılar insanlarda fertilizasyonu ve erken embriyonik gelişimi etkilemektedir. Foliküler sıvının nötrofil granülositleri için kemotaktik aktivite sergilediği ve bu aktivitenin konsantrasyonunun in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisinin sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir (81).

İmmün hücrelerin ve immüno-modülatör sitokinlerin üreme traktüsündeki çeşitli fizyolojik proseslerde aktif oldukları gösterilmiştir (81). Ovulatuvar prosesin kendisi, lökositlerin ovulatuvar foliküllere migrasyonu ile karakterize olan fizyolojik bir enflamatuvar proses olarak kabul edilmektedir. Bunun dışında, corpus luteum oluşumu ve regresyonu lenfositlerin ve makrofajların progressif migrasyonunu ve çeşitli kemokinler, sitokinler ve hücre adezyon molekülleri arasında iletişimi gerektirmektedir (82). Ayrıca, insan over dokusunda en bol bulunan lökosit alt-grubunun monositler ve makrofajlar olduğu tanımlanmıştır (83,84) ve bu hücreler insan folikül sıvılarında da fazla miktarda bulunmuştur (83,85). Bu şekilde insanlarda preovulatuvar Folikül sıvısı'nın, ovulatuvar siklusta non-ovulatuvar siklustakinden daha yüksek olan nötrofilik kemotaktik aktiviteye sahip olduğu (86,87) gösterilmiştir.

Sitokinler, steroidogenezin ve gamet üretiminin önemli düzenleyicileri olmaktan sorumlu tutulmaktadır (88,89). İnsan foliküllerinin mikroortamı normal oosit gelişimi, folikülogenez ve ovülasyon açısından hayati bir önem taşımaktadır. Overyen foliküler hücrelerin büyümesi, diferansiyasyonu ve apoptozu endokrin, parakrin ve otokrin faktörlerin etkisi ve birbirleriyle olan etkileşimleri ile düzenlenmektedir (90,91). Ayrıca, pek çok çalışma çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin pre-implantasyon'da temel bir rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır (92,93).

Uterusta interlökin-1 (IL-1) ve reseptörleri (94), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) ve bağlayıcı proteinleri (95), koloni stimüle edici faktörler (96), transforme

edici büyüme faktörü alfa (TGF- α) ve beta (TGF- β) (97,98) ve lösemi inhibitör faktör (LIF) (99) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin temporal ve spatial(zamansal ve mekansal yani belirli uyarana ile ve hedef dokuda) olarak ekspresyonu, bu faktörlerin uterusun implantasyona hazırlanmasında önemli bir fonksiyonel role sahip olabileceklerini düşündürmektedir (100). Endometrium dokusu steroid hormonların, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin kontrolü altındadır (101). Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin endometrium ile blastokist arasındaki iletişim açısından olduğu kadar implantasyon prosesi açısından da önemli bir aday oldukları öne sürülmüştür (102,103). Üstelik, sitokinlerin implantasyon yerinde üretilmeleri ve etkileri trofoblast hücre büyümesi, diferansiyasyonu ve invazyonu açısından da önemlidir (104,105). Normal bir gebelik gelişimi için IL-2, tümör nekroz faktörü-alfa ve interferon-gama gibi enflamatuar sitokinlerin üretimi baskılanırken IL-4, IL-6 ve IL-10 gibi anti-enflamatuar sitokinlerin üretiminin arttığına inanılmaktadır.

2.9.1 Tümör Necrosis Faktör (TNF- α)

Tümör nekrozis faktörü TNF- α çeşitli hücre tipleri ve özellikle makrofajlar tarafından üretilen 17-kDa ağırlığında polipeptid yapıda pleiotropik bir sitokindir (93). TNF- α farklı hedef hücreler üzerinde sitotoksik etkiler yanında büyümeyi düzenleyici aktiviteler de sergilemektedir (106). TNF- α enflamatuar lökositleri aktive ederek IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi diğer pro-enflamatuar sitokinlerin üretimine sebep olur (107).

TNF- α , folikülogenezde ve over matürasyonunda temel rolü bulunan bir sitokindir (108). Over fonksiyonunun potent bir modülatörü olup hem granuloza hücrelerinin hem de intersisyel teka hücrelerinin steroidogenezini etkiler (109). Bu foliküler evrelerin ötesinde granuloza hücre akıbetinin düzenlenmesinde TNF- α ' ın kesin rolü bilinmemektedir. Dahası, TNF- α , ve mRNA'sı insan endometriyumunun epitelyal, stromal ve lenfoid hücrelerinde eksprese edilmektedir (110,111). TNF- α düzeyinin menstrüel siklusun geç sekretuar fazına doğru arttığını göstermişlerdir. Trofoblastların endometriyuma tutundukları erken gebelik döneminde TNF- α trofoblast proliferasyonunu inhibe eder (112) ve insan trofoblast hücrelerinin üzerinde TNF- α , reseptörleri karakterize edilmiştir (112). Serum TNF- α konsantrasyonu menstrüel siklus boyunca büyük dalgalanmalar gösterir. Konsantrasyonlar geç foliküler faz ve orta-luteal faz boyunca anlamlı bir şekilde artar. Değerler erken luteal fazda anlamlı bir şekilde azalır (113).

2.9.2 İnterlökin-6

İnterlökin 6 ilk olarak preaktivasyon halindeki normal insan lenfositleri ve Epstein Barr virüsüne transformasyona uğratılmış B lenfositler tarafından immünglobulin salgılatan bir faktör olarak tanımlanmıştır. 26 kD ağırlığında olup 184 aminoasitten oluşur. Başlıca T ve B lenfositler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler, astrositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenşimal hücreler tarafından sentez edilir. İnsanda İL-6 ailesi içinde ayrıca İL-11, LİF, OSM, CTNF-A, ve CT-1 yer alır. İL-6'nın başlıca biyolojik etkileri: B hücrelerinden Ig yapımının uyarılması, T hücre aktivasyonu ve İL-2 yapımının uyarılması, hematopoetik koloni stimülasyonu, hepatosit aktivasyonu (akut faz proteinlerinin sentezi), ateş, prolaktin, büyüme hormonu ve luteinizan hormonun salınmasında stimülatör etki, glukokortikoid sentezinin uyarılması, osteoklast aktivasyonu, keratinosit büyümesinin stimülasyonu, infeksiyonlara karşı nonspesifik dirence sebep olurlar.

İL-6'nın endometriozis patogeneziindeki rolü detaylı olarak çalışılmıştır. Endometriozisli hastalarda peritoneal makrofajlardaki, endometrial stromal hücrelerdeki (114,115) ve periferik makrofajlardaki İL-6 cevabı bozulmuştur. Endometriozisli hastalarda endometriotik hücrelerden salınan İL-6'nın, interferon - gamma IFN- γ ile birlikte sICAM-1 molekülünün makrofajlardan salınımını uyarırlar.

Tsuda ve arkadaşları sitokinlerin sadece immün hücrelerden değil endometriotik implantlardan da salgılandığını ileri sürmüşlerdir. Endometriotik hücrelerin İL-6 mRNA'sını oluşturup ve İL-6 proteini sentezlediklerini ve TNF- α 'nın doz bağımlı olarak İL-6 sentezini uyardığını göstermişlerdir. Endometriozisli hastaların makrofaj ve endometriotik stroma hücreleri İL-6 sentezlenmesi açısından karşılaştırıldığında iki tip hücreden de TNF- α uyarımı ile benzer düzeyde İL-6 salgılandığı tespit edilmiştir (116).

2.9.3. İnterlökin – 2

Antijen stimule T lenfositleri için büyüme faktörüdür. İL-2 antijen tanıtımından sonra T hücre klonal ekspansiyonundan sorumludur. T hücre büyüme faktörü olarak adlandırılır. (sentezlediği hücreler üzerine etki gösterir). CD4+ T hücreleri başta olmak üzere CD8+ T hücrelerden salgılanır. Antijen stimülasyonu ile fonksiyonel IL-2 reseptörlerinin ekspresyonu artar. IL-2'nin biyolojik etkileri, antijen spesifik hücrelerin proliferasyonundan sorumludur.

Başka immun hücrelerin farklılaşma proliferasyonunu da artırır (NK, LAK, ve B hücreleri). Antijen ile aktive T hücrelerinin apoptotik ölümünü artırır (117).

2.9.4 İnterlökin - 4

İL-4 İg E yapımı ve native CD4+ yardımcı T hücrelerinden Th2 hücrelerinin gelişimi için en önemli uyarıcıdır. Th2 alt grubunda CD4+T hücreleri ve aktive mast hücreleri tarafından sentezlenir. Biyolojik etkilerinden en önemli görevi B hücrelerinde İg E sentezini sağlamaktır. Native CD4+T hücrelerinde Th2 hücre gelişimini uyarır. Farklılaşmış Th2 hücreleri için otokrin büyüme faktörüdür. IFN- γ nın hücresele immünetteki etkilerini inhibe eder (118).

2.9.5 İnterlökin -5

İnterlökin -5 eozinofil aktivatörüdür. T hücre aktivasyonu ve eozinofil inflamasyon arasında bağlantıyı oluşturur. CD4+Th2 tip hücrelerden ve aktive mast hücrelerden salgılanır. Matür eozonofillerin aktivasyonunda rol alır. İL-5 eozonofillerin farklılaşma ve büyümelerinde uyarıcı etkilere sahiptir (119).

2.9.6 İnterferon gamma (IFN- γ)

IFN- γ en önemli makrofaj uyarıcı sitokindir. Doğal ve adaptif immünette kritik öneme sahiptir. CD4+Th1 ve CD8+ hücreler tarafından sentezlenir. Aktive makrofajların fagosite etkileri mikropları öldürmesini uyarır. Native CD4+T hücrelerinin Th1 alt grubuna farklılaşmasını sağlar ve Th2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe, B hücrelerinin özellikle bazı İgG alt tiplerine geçişi inhibe eder. Nötrofilleri ve NK hücrelerinin sitolitik etkilerini uyarır (117).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu prospektif randomize çalışma ocak 2010 ile temmuz 2010 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı IVF Merkezinde ICSI uygulanan hastalardan elde edilen serum ve foliküler sıvılarda gerçekleştirildi. Çalışmaya Üniversite Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlandı. İşlem öncesi çalışmaya katılım için her hastadan yazılı ve sözlü onam alındı.

Çalışmaya başlamadan önce randomizasyon tablosu oluşturuldu ve çalışmaya dahil edilecek hastalar numaralandırılarak rastgele iki farklı tedavi protokolüne dağıtıldı. IVF Merkezine başvuran hastalara da başvuru sırasına göre randomizasyon tablosunda sıralamaya alındı ve önceden belirlenen tedavi protokolüne tabi tutuldu.

Rotterdam kriterlerine göre PCOS tanısı alan ve kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası Oosit sayısı >15 (high responder) oosit elde edilen hastalar ve KOH'a kötü yanıt veren (< 5 oosit), hidrosalpinksi, endometriozisi ve pelvik enflamatuvar hastalık nedeni ile yoğun pelvik yapışıklıkları bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca over stimülasyonuna yeterli yanıt vermeyen ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) sırasında sperm bulunamayan hastalar çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmaya çeşitli nedenlerle (erkek faktör, kadın faktör, açıklanamayan infertilite) kliniğimize IVF/ICSI için başvuran toplam 66 hasta dahil edildi (agonist $n=32$, antagonist $n=34$). Fakat Power analizine göre her gruba en az 40 hasta dahil edilmeliydi. Çalışmada hastaların folikül sıvıları ve serum örnekleri siklusun 2. ve 5. günleri arasında alındı.

3.1. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Çalışmaya katılan hastalara ($n=32$) GnRH analogu (Lucrin; Abbott, Türkiye) ile bir önceki siklusun luteal fazının ortasından başlayarak uzun protokol ile hipofizer down regülasyon yapıldı. Optimum down regülasyon sağladıktan sonra bireyselleştirilmiş dozlarda rekombinant FSH (Gonal-F; Serona, Türkiye veya Puregon; Organon, Türkiye) veya Human menopozal gonadotropin (Menogon; Erkim, Türkiye veya Menopur; Erkim, Türkiye) ile indüksiyon başlandı. Gonadotropin tedavisi başladıktan beş ile altı gün sonra GnRH

antagonist (Orgalutron; Organon, Türkiye veya Cetrotide; Serona, Türkiye) tedavisi eklenerek ekzojen gonadotropin uyarısına devam edildi. Foliküler büyüme düzenli olarak ultrason ölçümleri ile takip edildi. En az iki folikül çapı 18 mm olunca 250 mcg rec.hCG (Ovitrelle; Serona, Türkiye) uygulandı.

3.2. Oosit ve Foliküler Sıvı Toplama İşlemi

Oosit toplama işlemi hCG yapıldıktan ortalama 36 saat sonra gerçekleştirildi. Oosit toplama öncesi hastalardan idrarlarını yapmaları istendi. Hastalara intravenöz sedasyon için midazolam (dormicum ampul 5mg/5ml, Roche, Türkiye) 0,02mg/kg, fentanyl (fentanyl citrate ampul, Abbot, Türkiye) 1mcg/kg ve propofol (propofol flakon 500mg/ml, Abbot, Türkiye) 1mg/kg dozlarında kullanıldı. Oosit toplama işlemi öncesi vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Steril bir kılıf içindeki transvajinal USG probu (7,5 MHZ Endovaginal Probe, Siemens, Japonya) ve beraberinde tutturulmuş aspirasyon iğnesi (Gynetics, Hamont-Archel, Belçika) overleri görmek ve folikülleri aspire etmek için kullanıldı. Çalışmaya dâhil edilen hastalardan alınan foliküler sıvılar, 16 G'lik iğneler ile 15–20 mm büyüklüğündeki ve proba en yakın foliküllere keskin olarak girildikten sonra, 125 mmHg vakum basıncında aspire edilerek elde edildi. Her bir folikül ayrı ayrı aspire edildi. Her aspirasyondan sonra bir sonraki folikül sıvısının kontaminasyonunu önlemek için set temizlendi ve yeni toplama tüpü kullanıldı. Her bir hastadan çalışma için 1–5 arası folikül aspire edildi. Her folikülden ortalama 2–7 ml sıvı alındı. Çalışma için yapılan folikül aspirasyon işleminden sonra standart yöntemlerle hastanın yumurta toplama işlemi tamamlandı. Yıkama sıvısı ve kan ile kontamine olmuş folikül sıvıları ve oositleri çalışmaya dâhil edilmedi. Aspire edilen her folikül sıvısı 60x15 mm'lik polisteren dişlere (BD Falcon 60x15mm petri dish, Biosciences, ABD) ayrı ayrı kondu. Tek oosit elde edilen sıvı, içerisindeki oosit alındıktan sonra steril pipetle ayrı steril, apirojen, polipropilen konik tabanlı 15 ml hacimli tüplere (BD Falcon, Biosciences, ABD) kondu. Alınan folikül sıvı örneği, debris ve granuloza hücrelerini uzaklaştırmak için, 2000 devir/dk hızda, 4°C de, 10 dakika setrifüj edildi. Süpernatant 4 ayrı steril polipropilen tüpe en az 0,4 ml sıvı içerecek şekilde her bir folikül için ayrı steril pipet kullanılarak eşit miktarlarda bölündü. Materyaller -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.

3.3.Oositlerin Elde Edilmesi, Takibi, Morfolojik Değerlendirilmesi ve ICSI

Aspirasyon işlemi ile tüp içerisine alınan her bir folikül sıvısı, laminar flow kabinin içerisindeki petri tabaklarına (BD Falcon, 353003 (100x 20 mm, Biosciences) dökülüp ve stereo-mikroskop altında oositler bulundu. Yumurta toplama günü hazırlanan Falcon 353037 (60x15 mm) center well dish dışına 2 ml iç kısmına 1 ml HEPES ile desteklenmiş Quinn's Advantage medyum (SAGE Biopharma, Bedminster, NJ, ABD) konularak hazırlanan tabağın dışında yıkayıp bulunan oositler Pasteur pipet yardımı ile içine alındı. Yumurta toplama bittikten sonra toplanan oositler OPU'dan bir gün önce hazırlanan Quinn's Advantage Protein Plus Fertilization (HTF) Medyumlu tabağa (NUNC four well dish,176740, Thermo Fisher Scientific, ABD) aktarıldı ve bu tabakta 2-4 saat inkübe edilerek ICSI zamanına kadar bekletildiler.

Foliküllerden çalışma için elde edilen oositler ICSI işlemi öncesi mekanik ve kimyasal olarak denüedildikten sonra invert mikroskopla (Olympus IX70, Olympus, Viyana, Avusturya) morfolojik olarak değerlendirildi. Nükleer matürasyonlarına göre oositler üç gruba ayrıldı. Grub 1; matür, metafaz II (MII) oositler, Grub 2; immatür, metafaz I (MI) veya germinal vezikül (GV) olan oositler, Grub 3; dejenere olan oositler olarak belirlendi. Sitoplazmik matürasyonlarına göre oositler iki gruba ayrıldı. Grub 1; sitoplazması normal yani şeffaf olanlar, Grub 2; sitoplazması granüler, koyu granüler, vokal ve/veya refraktil cisim içeren oositler olarak belirlendi.

Oosit toplama işleminden sonra hastaların eşlerinden mastürbasyon ile semen örneği alındı. Bu semen örneğinde sperm bulunamayan erkeklere TESE uygulandı. Spermier swim up ve yoğunluk gradiyenti santrifugasyon yöntemi ile hazırlandı. Ayrılan spermier kapasitasyon amacıyla 0,5-4 saat protein içeren mediumda (Quinn's Sperm Washing Medium, Sage Media, A.B.D) 37 °C'de, %5'lik karbon dioksitli ve %98'lik nemli ortamda inkübasyona (Heraus inkübatör, Almanya) bırakıldı. Mikroenjeksiyon prosedürü Van Steirteghem ve ark. tanımlamalarına göre yapıldı (120).

3.4. Fertilizasyon, Klivaj ve Embriyo Kalitesi

Fertilizasyon, ICSI işleminden 16–20 saat sonra mikroskop altında iki ayrı pronukleusun görülmesi ile tespit edildi. Oositler fertilize olmalarına göre iki gruba ayrıldı Grub 1; fertilize olanlar, Grub 2; olmayanlar olarak tanımlandı.

Fertilizasyondan sonra erken bölünme (bölünmenin 24 saatten önce başlaması) durumuna göre oositler iki grubta değerlendirildi. Grub 1: erken klivaj (bölünme) olanlar, Grub 2: erken bölünme olmayanlar olarak tanımlandı.

Klivaj İCSI'dan 24 saat sonra değerlendirildi. Embriyolar klivaj durumlarına göre iki gruba ayrıldı. Grub 1 klivaj olanlar, Grub 2 klivaj olmayanlar olarak tanımlandı.

Embriyo transferi ICSI işleminden yaklaşık 48–72 saat sonra yapıldı. Transfer günü embriyolar kalitelerine göre derecelendirildi. Embriyo kalitesi; hücre sayısı, simetri, blastomerlerin şekli, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyonların büyüklüğü ve klivaj oranı dâhil edilerek morfolojik özelliklere dayanarak modifiye Veeck kıstasları kullanılarak hesaplandı. Grade 1 embriyo (en üst kalite embriyo); blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, % 0 fragmantasyon, grade 2 embriyo; blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte %0–25 arası fragmantasyon, grade 3 embriyo; blastomerler eşit büyüklükte değil ve %25–50 arası fragmantasyon, grade 4 embriyo; blastomerler eşit büyüklükte veya değil ancak > %50 fragmantasyon oranı olarak tanımlandı. Kalitelerine göre değerlendirilen embriyolar iki gruba ayrıldı. Grub 1: grade 1 (en üst kalite embriyolar), Grub 2: grade 2, grade 3 ve grade 4 embriyolar olarak tanımlandı.

Embriyo transferi öncesinde vajen steril salin solüsyonuyla yıkandı. Transabdominal ultrasonografi (Sonoline Adara, Siemens, Almanya) rehberliğinde transfer kateterinin (Labotect, Almanya) ucu fundusa dokunmadan yaklaşık 0,5–1 cm altında iken midkaviteye embriyo transferi yapıldı. Transfer kateterinde embriyo kalıp kalmadığı kontrol edildikten sonra işleme son verildi. Hasta embriyo transferi sonrası 30dk istirahat ettikten sonra taburcu edildi. Luteal faz desteği doğal progesteron (Crinone vajinal jel %8 Progesteron, Serona, Türkiye) 600 mg/gün, intravajinal uygulama ile sağlandı. Biyokimyasal gebelik embriyo transferi sonrası 14. günde serum β -hCG ölçümü >25 mIU/ml ise ve klinik gebelik embriyo transferinden üç hafta sonra transvajinal USG'de bir veya daha fazla gebelik kesesi görülmesi ile tanındı.

3.5. Serum ve Folikül Sıvısında sitokin tayini

Gonadotropin tedavisine başlamadan önce bazal ve OPU günü alınan kandan elde edilen serum örnekleri 3000 devrde 10 dk ve OPU günü alınan folikül sıvısı 1500 devrde 10 dk. santrifuj edilerek süpernatant (plazma) analiz yapıncaya kadar -80 derece'de saklandı. Serum ve folikül sıvı örneklerinde sitokin düzeyleri ELİSA yöntemiyle Biokimya labaratuvarında çalışıldı.

Folikül sıvısı ve serum örneklerinde piyasada bulunan ticari kitler kullanılarak IFN- γ , IL-4, L2, IL6, IL5, TNF- α konsantrasyonları ölçüldü. Bu kitler sadece serum örnekleri için onaylanmış olduklarından folikül sıvı örnekleri mevcut ticari kitlerle analiz edilmeden önce seri dilüsyonları test edilmiş ve bu testler assay linearitesini (doğrusallığını) göstermiştir (elde edilen recovery oranı %85 ile %120 arasındaydı).

IL6 konsantrasyonları ELİSA kiti ile (İnvitrogen Corporation,Camarillo,USA) ölçüldü. İntra assay CV% 7,7, minimum tesbit edilebilir değer ise 0,10 olarak saptanmıştır.

IL-4 konsantrasyonları ELİSA kiti ile (İnvitrogen Corporation,Camarillo,USA) ölçüldü. İntra assay CV% 3, minimum tesbit edilebilir değer ise 0,10 olarak saptanmıştır.

(IFN)- γ , (TNF)- α konsantrasyonları ELİSA kiti ile (İnvitrogen Corporation, Camarillo, USA) ölçüldü. İntra assay CV% 5.2, minimum tespit edilebilir değer ise 0,10 olarak saptanmıştır.

IL-2 konsantrasyonları ELİSA kiti ile (İnvitrogen Corporation, Camarillo, USA) ölçüldü. İntra assay CV% 5.8, minimum tespit edilebilir değer ise 0,10 olarak saptanmıştır.

IL5 konsantrasyonları ELİSA kiti ile (İnvitrogen Corporation, Camarillo, USA) ölçüldü. İntra assay CV% 3.6, minimum tespit edilebilir değer ise 0,10 olarak saptanmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Scinences, Version 15.0) programında analiz edildi. Tanımlayıcı istatistiklerde bulgular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İki bağımsız grubun ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı T testinin non-parametrik karşılığı olan Mann-Whitney U testi ile bağımlı grublarda iki grub ortalamaları arasındaki fark ise Wilcoxon işaretli sıralar testi ile analiz edildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma toplam 66 hasta ile yapıldı. Altmışaltı hastadan 32 tanesi GnRH uzun agonist protokolle ve 34 tanesi GnRH antagonist protokolle tedavi edildi. 66 hastadan 38 (%57.6) tanesinde gebelik oluştu, 28 (%42.4) tanesinde ise gebelik oluşmadı.

Hastalar infertilite nedenlerine göre irdelendiğinde; erkek faktör 25 (%37.9), Kadın faktör 14 (%21.2), açıklanamayan 26 (%39.4), kadın ve erkek faktör faktör 1 (%1.5) hasta saptanmıştır (Tablo 2).

Hastaların yaş ortalaması 30.24 ± 4.36 , vücut kitle indeksleri (BMI) 29.42 ± 3.09 , infertilite süreleri $6,5 \pm 4,22$ yıl idi. Toplam indüksiyon süresi ortalama $9.71 \pm 1,92$ gün, HCG günü endometrium kalınlığı $11,6 \pm 2,22$ mm, fertilizasyon oranı %74.13, transfer edilen ortalama embriyo sayısı $1, 5 \pm 0,72$, klinik gebelik oranı %52.6'dır. Bu sonuçların gruplar arasında dağılımı Tablo-3'de gösterilmiştir. Agonist ve Antagonist grubu oluşturan 66 hastada karşılaştırılan parametreler arasında önemli fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Her iki gruptaki stimülasyon öncesi (bazal) serum sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığı zaman iki grup arasındaki sitokin düzeyleri farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). (Tablo 4).

Antagonist grupta post-stimülasyon (OPU günü) serum ve folikül sıvı interferon gamma $\text{INF-}\gamma$ düzeyleri uzun agonist grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0,05$). (Tablo.5,6).

İL-6 ve $\text{TNF-}\alpha$ agonist grupta OPU günü stimülasyon öncesine göre anlamlı azalmıştır. $\text{INF-}\gamma$ ise anlamlı artmıştır ($p<0,05$). Antagonist grupta ise sadece $\text{INF-}\gamma$ anlamlı artmıştır ($p<0,05$). (Tablo 7).

Agonist grupta bazal serum interferon gamma $\text{INF-}\gamma$ düzeyleri folikül sıvı düzeylerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). (Tablo 8).

İL-4, İL-6 ve $\text{INF-}\gamma$ düzeyleri her iki grupta da folikül sıvısında OPU günü sitokin düzeylerine göre anlamlı artmış, bulunmuştur ($p<0,05$). (Tablo 9).

Agonist grupta elde edilen 336 oositin 284 tanesi mayotik maturiteye ulaşmış (MII), 40 tanesi immatür (MI veya GV) ve 12 oosit dejenere olmuştur. 284 matür oosite ICSI uygulanmış ve 184 tanesi iki pronükleus içeren (2PN) zigot haline gelmiştir. Embriyo morfolojisine göre 67 tanesi Grade -1 embriyo ve 99 tanesi Grade -2-4 embriyo olarak değerlendirilmiştir.

Antagonist grubdan elde edilen 315 oositin 253 tanesi mayotik maturiteye ulaşmış (MII), 33 tanesi immatür (MI veya GV) ve 29 oosit yozlaşmış olmuştur. 253 matür oosite ICSI uygulanmış ve 158 tanesi iki pronükleus içeren (2PN) zigot haline gelmiştir. Embriyo morfolojisine göre 74 tanesi Grade -1 embriyo ve 72 tanesi Grade -2-4 embriyo olarak değerlendirilmiştir.

İki grupta da folikül sıvı sitokin düzeyleriyle matürasyon, fertilizasyon ve embriyo kalitesi arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptanmadı ($p>0,05$). (Tablo 10.11.12).

Antagonist grubunda gebelik elde edilenlerde, gebelik elde edilmeyenlere göre IL-4 düzeyleri anlamlı olarak daha yüksektir. ($p<0,05$). (Tablo 13).

Agonist uzun ve hasımca stimülasyon protokollerinde folikül sıvı ve serum sitokin düzeyleriyle klinik gebelik oranları arasında istatistiksel olarak farklılık saptanamamıştır ($p>0,05$). (Tablo 14,15)

Tablo. 2. Hastaların İnfertilite nedenleri

İnfertilite nedeni	Sayı	%
Erkek faktör	25	37.9
Kadın Faktör	14	21.2
Açıklanamayan	26	39.4
Kadın +Erkek faktör	1	1.5
Toplam	66	100.0

Tablo. 3. Agonist ve Antagonist Grubu Genel Özellikleri

	AGONİST (n:32) Ort ± SD	ANTOGONİST (n:34) Ort ±SD	P Değeri
Yaş	30.24±4.36	30.03±4.15	0.802
BMI (Kg/m2)	29.50±3.07	28.87±2.89	0.11
İnfertilite süresi (yıl)	6.50±4.22	6.53±4.54	0.81
İndüksiyon süresi (gün)	9.71±1.92	9.93±1.60	0.13
Endometrium kalınlığı hCG günü (mm)	11.03±2.21	10.65±1.71	0.25
Toplam gonodotropin dozu (IU)	2137±762.69	2277.71±0.24	0.24
Toplam folikül sayısı	11.42±4.19	11.43±4.19	0.88
Toplam oosit sayısı	9.84±4.59	10.46±4.23	0.22
Matür oosit sayısı	8.13±4.36	8.87±4.06	0.08
Fertilizasyon oranı (%)	66±14	65±12	0.69
Transfer edilen embriyo sayısı	1.48±0.74	1.50±0.76	0.76
Klivaj oranı (%)	(95)	(95)	0.49
G1 embriyo sayısı	2.19±1.86	2.21±2.09	0.73
Transfer edilen toplam blastomer sayısı	9.46±5.34	10.59±6.17	0.19
Klinik gebelik oranı (%)	52.6	47.4	0.46

Mann -Whitney U analizlerine göre

Tablo.4. Antagonist ve Agonist Gruplar Arası Pre-Stimülasyon (Bazal) Serum Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Bazal serum sitokin düzeyi (pg/mL)	AGONİST (n:32) Ort ±SD	ANTOGONİST (n:34) Ort ±SD	P Değeri
IL-4 (pg/mL)	0.98±0.44	1.54±1.46	0.066
TNF- α (pg/mL)	11.98±7.31	13.64±8.92	0.077
IL-6 (pg/mL)	25.00±15.27	23.76±12.23	0.164
IL-5 (pg/mL)	1.68±0.76	1.27±0.91	0.542
IL-2 (pg/mL)	0.37±0.30	0.78±0.30	0.403
IFN- γ (pg/mL)	1.75±0.52	2.64±1.39	0.098

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo. 5. Post-Stimülasyon (OPU günü) Antagonist ve Agonist Gruplar Arası Serum Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Serum sitokin düzeyi(OPU günü) (pg/mL)	AGONİST (n:32) Ort ±SD	ANTAGONİST (n:34) Ort ±SD	P Değeri
IL-4 (pg/mL)	1.16±0.66	0.94±0.43	0.544
TNF- α (pg/mL)	6.19±3.95	7.62±5.28	0.184
IL-6 (pg/mL)	14.38±10.90	16.52±17.57	0.171
IL-5 (pg/mL)	2.86±1.46	0.86±0.44	0.365
IL-2 (pg/mL)	1.95±0.30	1.08±0.30	0.743
IFN- γ (pg/mL)	10.00±4.49	7.53±3.63	0.001*

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.6. Post-Stimülasyon (OPUgünü) Antagonist ve Agonist Folikül sıvı Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.

Folikül sıvı sitokin düzeyleri (pg/mL)	AGONİST (n:32) Ort ±SD	ANTAGONİST (n:34) Ort ±SD	P Değeri
IL-4 (pg/mL)	3.00±1.30	3.00±1.30	0.938
TNF- α , (pg/mL)	5.29±5.03	8.11±1.67	0.441
IL-6 (pg/mL)	28.11±14.75	28.35±13.8	0.710
IL-5 (pg/mL)	3.82±2.82	3.55±0.34	0.739
IL-2 (pg/mL)	2.87±0.09	2.99±4.59	0.921
İNF- γ (pg/mL)	15.81±4.13	2.79±2.86	0.001*

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.7. Pre-Stimülasyon (Bazal) ve Post-stimülasyon (OPU günü) Serum Sitokin Değerlerinin Her İki Grupta (Agonist ve Antagonist) Ayrı-Ayrı Karşılaştırılması

	AGONİST (n:32) Ort ±SD			ANTAGONİST (n:34) Ort ±SD		
	Bazal serum sitokin düzeyi (pg/mL)	OPU günü serum sitokin düzeyi (pg/mL)	P değeri	Bazal serum sitokin düzeyi (pg/mL)	OPU günü serum sitokin düzeyi (pg/mL)	P Değeri
IL-4 (pg/mL)	0.98 ±0,44	1.16±0.66	0.165	1.54±1.46	0.94±0.43	0.25
TNF- α (pg/mL)	11.98±7.31	6.19±3.95	0.001*	13.64±8.92	7.62±5.28	0.362
IL-6 (pg/mL)	25.00±15.27	14.38±10.90	0.024*	23.76±12.23	16.52±17.57	0.334
IL-5 (pg/mL)	1.68±0.76	2.86±1.46	0.445	1.27±0.91	0.86±0.44	0.36
IL-2 (pg/mL)	0.37±0.30	1.95±0.30	0.106	0.78±0.30	1.08±0.30	0.575
İNF- γ (pg/mL)	1.75±0.52	10.00±4.49	0.001*	2.64±1.39	7.53±3.63	0.001*

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

Tablo.8. Pre-Stimülasyon (Bazal) ve Folikül Sıvısı Serum Sitokin Değerlerinin Her İki Grupta (Agonist ve Antagonist) Ayrı-Ayrı (kendi içinde) Karşılaştırılması

	AGONİST (n:32) Ort ±SD			ANTAGONİST (n:34) Ort ±SD		
	Bazal serum sitokin düzeyi (pg/mL)	Folikül sıvı sitokin düzeyi (pg/mL)	P değeri	Bazal serum sitokin düzeyi (pg/mL)	Folikül sıvı sitokin düzeyi (pg/mL)	P değeri
IL-4 (pg/mL)	0.98 ±0.44	3.00±1.30	0.963	1.54±1.46	3.00±1.30	0.105
TNF-α(pg/mL)	11.98±7.31	5.29±5.03	8.545	13.64±8.92	8.11±1.67	0.149
IL-6 (pg/mL)	25.00±15.27	28.11±14.75	0.403	23.76±12.23	28.35±13.8	0.364
IL-5 (pg/mL)	1.68±0.76	3.82±2.82	0.211	1.27±0.91	3.55±0.34	0.676
IL-2 (pg/mL)	0.37±0.30	2.87±0.09	0.533	0.78±0.30	2.99±4.59	0.123
İNF-γ (pg/mL)	1.75±0.52	15.81±4.13	0.001*	2.64±1.39	2.79±2.86	0.924

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

Tablo. 9. Post-Stimülasyon (OPU günü) Serum ve Folikül sıvı Sitokin Düzeylerini Her İki Grupta (Agonist ve Antagonist) ayrı-ayrı karşılaştırılması

	AGONİST (n:32) Ort ±SD			ANTAGONİST (n:34) Ort ±SD		
	Serum sitokin düzeyi(OPU günü) (pg/mL)	Folikül sıvı sitokin düzeyi (pg/mL)	P değeri	OPU serum sitokin düzeyi (pg/mL)	Folikül sıvı sitokin düzeyi (pg/mL)	P değeri
IL-4 (pg/mL)	1.16±0.66	3.00±1.30	0.001*	0.94±0.43	3.00±1.30	0.001*
TNF-α(pg/mL)	6.19±3.95	5.29±5.03	0.125	7.62±5.28	8.11±1.67	0.474
IL-6 (pg/mL)	14.38±10.90	28.11±14.75	0.001*	16.52±17.57	28.35±13.8	0.001*
IL-5 (pg/mL)	2.86±1.46	3.82±2.82	0.650	0.86±0.44	3.55±0.34	0.241
IL-2 (pg/mL)	1.95±0.30	2.87±0.09	0.199	1.08±0.30	2.99±4.59	0.265
İNF-γ (pg/mL)	10.00±4.49	15.81±4.13	0.001*	7.53±3.63	15.81±4.13	0.001*

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

Tablo. 10. Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Matürasyona Göre Karşılaştırılması

		M2	M1-GV	P Değeri
AGONİST (n=32)	IL-4 (pg/mL)	3.01±1.30	4.73±6.76	0.310
	TNF-α (pg/mL)	5.29±5.03	8.20±5.93	0.946
	IL-6 (pg/mL)	42.11±37.16	43.50±28.11	0.980
	IL-5 (pg/mL)	3.82±2.34	2.33±3.14	0.910
	IL-2 (pg/mL)	2.87±1.25	4.72±3.94	0.651
	İNF-γ (pg/mL)	7.79±2.86	4.24±3.20	0.667
Antagonist (n=34)	IL-4 (pg/mL)	3.98±1.87	4.35±3.34	0.536
	TNF-α (pg/mL)	5.86±5.23	4.34±2.32	0.624
	IL-6 (pg/mL)	80.71±75.34	85.53±42.22	0.939
	IL-5 (pg/mL)	5.53±3.39	5.43±4.29	0.487
	IL-2 (pg/mL)	16.53±7.13	15.6±5.45	0.385
	İNF-γ (pg/mL)	4.56 ±2.99	3.43±4.45	0.641

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.11. Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Fertilizasyona Göre Karşılaştırılması

		2PN	FERTİLİZE OLMAYAN	P DEĞERİ
AGONİST (n=32)	IL-4 (pg/mL)	3.00±1.30	4.49±0.82	0.750
	TNF-α (pg/mL)	5.29±5.03	2.85±0.28	0.893
	IL-6 (pg/mL)	82.11±37.16	80.98±47.05	0.877
	IL-5 (pg/mL)	3.82±0.82	10.27±9.25	0.843
	IL-2 (pg/mL)	2.87±0.09	0.30±0.00	0.829
	İNF-γ (pg/mL)	7.79±2.86	7.19±0.65	0.955
Antagonist (n=34)	IL-4 (pg/mL)	3.98±2.24	2.90±1.27	0.771
	TNF-α (pg/mL)	22.23±20.66	25.45±5.16	0.581
	IL-6 (pg/mL)	81.7±20.7	82.19±41.5	0.809
	IL-5 (pg/mL)	16.53±13.39	13.39±6.64	0.942
	IL-2 (pg/mL)	2.99±2.66	3.05±1.17	0.898
	IFN-γ (pg/mL)	5.81±3.13	7.83±2.95	0.814

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo. 12. Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Embriyo Kalitesine Göre Karşılaştırılması

		Grade 1	Grade 2-4	P
		Ort±SD	Ort±SD	Değeri
AGONİST (n=32)	IL-4 (pg/mL)	0.83±0.65	0.67±0.63	0.735
	TNF- α , (pg/mL)	12.30±7.78	11.96±7.63	0.781
	IL-6 (pg/mL)	26.91±11.97	25.63±13.64	0.953
	IL-5 (pg/mL)	20.90±15.38	17.32±15.34	0.937
	IL-2 (pg/mL)	0.39±0.32	0.38±0.22	0.964
	IFN- γ (pg/mL)	1.50±1.45	1.74±0.49	0.911
Antagonist (n=34)	IL-4 (pg/mL)	1.44±1.34	1.51±1.45	0.924
	TNF- α (pg/mL)	14.83±11.44	14.93±7.56	0.431
	IL-6 (pg/mL)	14.41±7.45	45.29±23.25	0.502
	IL-5 (pg/mL)	9.35±5.35	6.26±5.65	0,706
	IL-2 (pg/mL)	0.83±0.78	0.85±0.74	0.681
	IFN- γ (pg/mL)	5.80±2.67	6.68±3.53	0.827

Mann-Whitney U analizlerine göre

Tablo.13. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Bazal Serum Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Grublar Arasında Karşılaştırılması

Bazal serum	AGONİST (n:32)			ANTAGONİST (n:34)		
	Ort ±SD			Ort ±SD		
	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri
IL-4 (pg/mL)	1.49±1.41	1.99±1.93	0.744	1.15±1.00	0.41±0.34	0.010*
TNF- α (pg/mL)	25.39±51.82	19.11±4.45	0.552	9.75±9.62	10.30±5.86	0.365
IL-6 (pg/mL)	80.22±25.25	83.85±34.81	0.272	47.28±30.92	14.96±9.78	0.772
IL-5 (pg/mL)	7.07±3.18	9.00±7.45	0.954	8.78±6.56	3.76±2.7	0.433
IL-2 (pg/mL)	0.30±0.00	0.32±0.23	0.833	1.32±1.12	0.30±0.02	0.175
IFN- γ (pg/mL)	1.58±1.10	2.67±2.35	0.803	9.05±3.50	1.82±0.04	0.338

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

Tablo. 14. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Serum (OPUgünü) Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Serum (OPU günü)	AGONİST (n:32)			ANTAGONİST (n:34)		
	Ort ±SD			Ort ±SD		
	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri
IL-4 (pg/mL)	1.29±1.35	1.16±1.39	0.833	1.02±0.77	0.75±0.43	0.403
TNF-α, (pg/mL)	9.35±8.05	6.08±2.83	0.477	10.16±4.54	6.95±4.46	0.959
IL-6 (pg/mL)	59.54±11.68	56.52±17.80	0.744	58.18±28.73	57.41±34.76	0.851
IL-5 (pg/mL)	5.55±5.52	0.86±0.54	0.863	5.85±4.56	4.10±1.55	0.597
IL-2 (pg/mL)	0.73±0.43	1.28±0.87	0.734	1.50±1.23	0.38±0.23	0.463
IFN-γ (pg/mL)	6.02±1.97	5.21±2.63	0.431	7.09±1.22	5.75±2.97	0.224

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

Tablo.15. Klinik Gebelik Sonuçlarıyla Folikül Sıvı Sitokin Düzeylerinin Agonist Uzun ve Antagonist Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Folikül Sıvısı	AGONİST (n:32)			ANTAGONİST (n:34)		
	Ort ±SD			Ort ±SD		
	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri	Klinik gebelik var	Klinik gebelik yok	P değeri
IL-4 (pg/mL)	3.57±2.94	2.88±1.08	0.836	4.29±3.88	3.34±1.45	0.506
TNF-α (pg/mL)	30.11±15.65	29.64±23.87	0.744	7.76±4.56	4.45±3.62	0.801
IL-6 (pg/mL)	45.34±33.4	50.45±34.23	0.526	76.96±67.8	80.33±56.8	0.721
IL-5 (pg/mL)	1.39±0.33	0.35±0.17	0.833	6.82±5.76	4.50±1.07	0.746
IL-2 (pg/mL)	3.09±3.02	2.63±1.76	0.501	4.18±3.35	1.79±3.01	0.330
IFN-γ (pg/mL)	5.64±2.40	5.52±3.33	0.803	6.85±3.07	8.99±0.97	0.76

Wilcoxon Signed Ranks Testine göre

5.TARTIŞMA

Dişi üreme sisteminin normal gelişimi ve işlevleri, immün ve endokrin sistemlerle yakın bir ilişki içinde gerçekleşir. Menstrüel siklus ve gebelik sırasında görülen değişiklikler hipotalamus-pituiter sistem tarafından düzenlenir ve direkt olarak overyan dokuların ve uterus mukozasının hormonla indüklenmiş yeniden modellenmesinin sonucudur. Hücresel düzeyde hormonal etkiler, immunokompetan hücreler tarafından üretilen lenfohemopoetik sitokinlerin özel bir rol oynadığı pek çok peptid faktörün katılımıyla gerçekleşmektedir (121, 122, 123).

Üzerinde en iyi çalışılan konu, gestasyonun devamının ve normal seyrinin immünolojik yönleridir. İmmün sistemin, üreme sürecinin en erken evrelerinin (folikülogenez, oogenez ve embriyo implantasyonu) düzenlenmesindeki rolü üzerinde daha az çalışılmıştır. Yardımcı üreme teknolojilerinin, örneğin in vitro fertilizasyonun (IVF) kullanıma girmesi insanlarda bu süreçlerin immün düzenlenmesinin çalışılmasını mümkün hale getirmektedir. Overyan dokular ve endometrium, sayıları ve kompozisyonları ovulatuvar siklus boyunca değişen immün hücreler içerirler (124,125,126). Foliküler sıvı konsantrasyonu kandakinden çok daha yüksek düzeylere ulaşan bazı sitokinler içerir ki bu durum over fonksiyonunun immün düzenlenmede ki önemini desteklemektedir (127). İmmün sistem hücreleri ve bu hücreler tarafından üretilen sitokinler ovaryan fonksiyonun düzenlenmesiyle birlikte, endometriumun embriyo implantasyonuna hazırlanmasında (128) ve gebeliğin devamında (129) son derece önemli bir rol oynamaktadır.

Şurası çok açıktır ki immünite bozuklukları gebeliğin olmamasının ve IVF' de görülenler de dahil olmak üzere erken spontan abortusların ciddi bir sebebi olabilmektedir (130). Bu yüzden, fertilité düzeylerinin aksine kadınlarda sitokin düzeylerinin kompleks bir değerlendirmesi özel bir dikkat çekmektedir. Multipleks proteom analizinin gelişmesine ve pratiğe girmesine bağlı olarak, sitokin aracılı düzenleyici mekanizmaların daha yüksek düzeylerde çalışılması mümkün bir hale gelmiştir (130).

Sitokinler sıklıkla parakrin veya otokrin etki gösterdikleri için sitokinler intrafoliküler konsantrasyonların, ovarian fonksiyonlar üzerindeki rolü kan konsantrasyonlarına göre daha etkilidir. Sitokinlerin kan konsantrasyonları ekstraovarian üretim yerlerinden etkilenebileceği için folikül sıvısındaki sitokin düzeyleri ile anlamlı bir ilişki göstermeyebilir. Bundan dolayı

inanıyoruz ki sitokinlerin intrafoliküler konsantrasyonlarına özel ilgi duyulmakta ovarian fonksiyonlarda sitokinlerin rolü hakkında çalışmalar yapılmaktadır.

Çok sayıda çalışmada, IVF tedavisinden sonra gebe kalan ve gebe olmayan kadınların serum ve folikül sıvı sitokin konsantrasyonları arasında farklılıklar saptanmaya çalışılmıştır (131). Ancak az sayıda çalışmada, IVF için uygulanan farklı stimülasyon protokollerinde folikül sıvısı veya serum sitokin konsantrasyonları incelenmiştir. Serum/folikül sıvı sitokin düzeyleri ile IVF sonuçları arasındaki ilişki ile ilgili şüpheli bulguları göz önünde bulundurarak, IVF’de sitokin düzeylerinin uygulanan stimülasyon protokolüyle değişip değişmediğini çok sayıda sitokinin eş zamanlı değerlendirilmesi için hem serum hem de folikül sıvı örneklerini kullanarak değerlendirdik. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla, prospektif randomize olarak yapılmış olan uzun etkili agonist ve antagonistle stimüle edilmiş kadınlarda serum ve folikül sıvısı sitokin düzeylerini eş zamanlı bir biçimde karşılaştıran en büyük hasta popülasyonuna sahip olan bir çalışmadır.

Çalışmaya over stimülasyonuna yeterli yanıt veren ve normal üreme fonksiyonlarına sahip kadınları dahil ettik. (çünkü birçok infertilite sorunu artmış sitokin düzeyleri ile ilişkilidir). Sonuçlara göre, ister pre-ovülasyon (bazal serum), isterse oosit aspirasyon (post-stimülasyon) günü olsun iki stimülasyon protokolü arasında IL-4; TNF- α ; IL-6; IL-5; IL-2; serum ve intrafoliküler sitokin konsantrasyonları arasında gebelik sonuçlarını etkileyecek ciddi anlamlı farklılıklar yoktu.

Antagonist grupta klinik gebelik sonuçlarına bakıldığında IL-4 düzeylerini gebelik elde edilmeyenlere göre anlamlı daha yüksek olduğu saptanmıştır. Th2/anti- enflamatuvar sitokin olan IL-4 varlığı folikül sıvısında diğer sitokinlere göre daha az çalışılmıştır. Bu yüksek IL-4 düzeyleri ile klinik gebelik arasındaki ilişkiyi gösterecek başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Post-stimülasyon (OPU günü) ve intrafoliküler (IFN)- γ değerleri antagonist grupta, agonist gruba oranla anlamlı derecede düşük bulduk. İki stimülasyon protokolü arasında bazal serum, (IFN)- γ , düzeyleri arasında farklılık saptanmaması agonist ve antagonist protokollerin (IFN)- γ , düzeylerini farklı etkilediği düşünebiliriz.

Endokrin ve sitokin sistemi arasında bir bağlantının bulunduğu öne sürülmektedir. Sitokinlerin, foliküllerin gonadotropinlere karşı duyarlılığının hem stimülasyonunda hem de inhibisyonunda yer aldıkları öne sürülmektedir (131). Benzer şekilde, diğer araştırmacılar da sitokinlerin folikül gelişiminin olduğu kadar foliküler atrezinin düzenlenmesinde de önemli

bir rol oynadıklarını öne sürmektedirler (132). Biz bu varsayıma dayanarak, antagonist protokolü verilen kadınlarda folikül sıvı ve serum sitokin konsantrasyonlarının agonist uzun protokolü verilen kadınlarda farklı olabileceği hipotezini geliştirdik.

Folikül sıvısı geliştirmekte olan oosit için bir mikro-ortam sağlar ve oositin gelişiminin düzenlenmesi için gereken immünolojik faktörleri içerir. Belirli sitokinlerin ekspresyonundaki ve konsantrasyonlarındaki değişiklikler oosit ve embriyo kalitesini etkileyerek düşük bir implantasyon yeteneği ile sonuçlanabilir (133-134).

Çok az sayıda çalışma folikül sıvı sitokin konsantrasyonlarını ART'de kullanılan stimülasyon protokolüne göre incelemiştir. Büscher ve arkadaşları (135) uygulanan stimülasyon protokolüne bağlı olarak folikül sıvı TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarını incelemişler ve sadece IL-6 konsantrasyonlarını GnRH/agonist kullanılan grupta CC/gonadotropin uygulanan gruba göre anlamlı bir şekilde yüksek saptamışlardır. Fizyolojik olarak IL-6 salgılanması TNF' in yanı sıra IL-1'le uyarılmaktadır ve IL-6 seviye değişikliklerini TNF'in ve IL-1'in vücuttaki birçok enflamatuar olayda görev almasıyla ilişkilendirmişler. Ancak o çalışmada esas olarak 2 protokol, GnRH agonist/gonadotropin veya CC/gonadotropin protokolü uygulanmış ve antagonist protokolü kullanılmamıştır.

Başka bir çalışmada, folikül sıvısında IL-6 ve IL-8 düzeylerinin kullanılan hMG veya rFSH/hMG stimülasyon protokolünden etkilenmediği saptanmıştır (136). Asimakopoulos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (137) folikül sıvısı ve serum sitokin profili antagonist veya agonist uzun protokolü kullanımına göre incelenmiştir. Yazarlar bu çalışmada IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ' yı değerlendirmişler ve bu sitokinlerin benzer serum ve folikül sıvı konsantrasyonlarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde antagonist protokolü uzun agonist protokolü ile karşılaştırmışlar ancak bu çalışmada sadece 3 sitokini (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) incelemişlerdir. ART'de kullanılan stimülasyon protokolünün serum folikül sıvı sitokin konsantrasyonları üzerindeki etkisini değerlendiren, küçük hasta kohortlarıyla oldukça az sayıda çalışma yapılmıştır.

2 stimülasyon protokolünü ayrı-ayrı pre-stimülasyon ve post- stimülasyon sitokin düzeylerini karşılaştırdık. Post-stimülasyon agonist grubda stimülasyon öncesi serum TNF- α , değerlerini anlamlı azalmış bulduk. Daha önce 2 farklı stimülasyon protokolünü karşılaştıran çalışmalarda serum ve intrafoliküler TNF- α , düzeylerinde anlamlı fark bulunamamıştır.

Stimülasyon öncesi serum değerleri intrafoliküler değerlerle karşılaştırıldığında agonist grubta fark saptamadık. Antagonist grubda intrafoliküler IL-6 düzeylerini yüksek, IFN- γ düzeylerini anlamlı derecede düşük bulduk.

Post-stimülasyon (OPUgünü) serum ve intrafoliküler değerler karşılaştırıldığında her iki grupta IL-4 ve IFN- γ değerlerini intrafoliküler olarak yüksek bulduk.

IL-6 granüloza hücre steroidogenezi etkileyebilmektedir (138). Gonadotropin stimülasyonu esnasında E2 düzeylerinde görülen değişikliklerin serum IL-6 ve TNF- α düzeylerindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (139)

Amato ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (140). PCOS' lu kadınlarda serum IL-6 düzeylerinin erkek faktörü infertilitesi için IVF uygulanan normal ovülasyon olan kadınlarla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada, OHSS olgularında yükselmiş serum IL-6 düzeyleri bildirilmiştir (141). Tam tersine, yeni bir çalışmada serum IL-6 düzeylerinin E2 düzeyleriyle negatif yönde korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (139).

Fıçıcıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (PCOS olguları çalışmaya alınmamıştır) 2 stimülasyon protokolü arasında incelenen folikül sıvı sitokin konsantrasyonları açısından anlamlı fark saptamamışlar. ancak serum sitokin konsantrasyonu değerlendirildiğinde, antagonist sikluslarında agonist uzun siklularından anlamlı bir şekilde daha düşük IL-6 düzeyleri saptamışlardır(142).

Bizin çalışmamızda ise 2 stimülasyon protokolünü karşılaştırdığımız zaman serum ve intrafoliküler IL-6 düzeylerinde anlamlı bir fark saptamadık. Ancak iki grubu ayrı-ayrı değerlendirdiğimizde pre-stimülasyon öncesi serum değerleri intrafoliküler değerlerle karşılaştırdığımızda intrafoliküler olarak IL-6 değerlerini yüksek bulduk. Bu bulgu, antagonist protokolü verilen daha büyük hasta kohortlarında daha ileri düzeyde araştırılmalıdır.

IL-6 düzeylerini embriyo kalitesi, oosit matürasyonu, fertilizasyon, klinik gebelik sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda 2 grub arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Antagonist sikluslarında, bazı sitokinlerin IVF başarısı için gereken biomarkerlar olarak önemini gösterebilecek moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda hastanın yer aldığı ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sitokinlerden IL-4; IL-6; IL-5; IL-2; IFN- γ , tümör nekrotik faktörün TNF- α folikül sıvı ve serum konsantrasyonlarının IVF için kullanılan farklı stimülasyon protokollerine, yani GnRH uzun agonist ve antagonist protokollerine göre farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için yapıldı.

Sonuç olarak GnRH agonist ve GnRH antagonist ile kontrollü over stimülasyonu uygulanan normal cevap veren kadınlarda serum ve folikül sıvı örneklerinde sitokin profili genellikle bezerdir. Antagonist grubda serum ve intrafoliküler interferon gamma'nın, IFN- γ , düşük bulunması bu grubda klinik gebelik sonuçlarını, embriyo kalitesini, fertilizasyonu ve matürasyonu etkilememiştir.

Her iki grubun serum ve folikül sıvılarını ayrı-ayrı (kendi içinde) değerlendirdiğimiz zamanda daha yüksek ve düşük sitokin oranları saptadık. Bu değerlendirmede de benzer bir şekilde serum ve folikül sıvısı sitokin düzeyleri ile gebelik sonuçlarını, embriyo kalitesini, fertilizasyon ve matürasyon açısından bir ilişki saptanamadı.

Antagonist grubda gebelik elde edenlerde, gebelik elde etmeyenlere göre IL-4 düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulduk. Th2/anti- enflamatuar sitokin olan IL-4 varlığı folikül sıvısında diğer sitokinlere göre daha az çalışılmıştır. Bu yüksek IL-4 düzeyleri ile klinik gebelik arasındaki ilişkiyi gösterecek başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Antagonist sikluslarında, bazı sitokinlerin IVF başarısı için gereken biomarkırlar olarak önemini gösterebilecek moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda hastanın yer aldığı ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Speroff, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Lippincott Williams and Wilkins 7th Philadelphia. 2005: 320-345
2. 2005 Assisted reproductive technology ART report. [www.cdc.gov/ART/ART 2005](http://www.cdc.gov/ART/ART%2005)
3. Andersan AN, Goossens V, Ferraretti AP, et al. The European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum. reprod* 2008; 23: 756-71.
4. Aboul Enien WM, Lewis-Jones ID and Vince GS (2001) Follicular fluid cytokines and IVF outcome. *Middle East Fertil Soc J* 6, 206-11.
5. Loret de Mola JR, Goldfarb JM, Hecht BR, Baumgardner GP, Babbo CJ, Friedlander MA. Gonadotropins induce the release of interleukin-1b, interleukin-6 and tumor necrosis factor-a from the human preovulatory follicle. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:387-90.
6. Buscher U, Chen FC, Kentenich H, Schmiady H. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum Reprod* 1999;14:162-66.
7. Engel JB, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R, Diedrich K. GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *RBM Online* 2006;13:84-87.
8. Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ, Rinehart J, Rosenwaks Z, Scott RT Jr, Schoolcraft W, Shapiro DB, North American Ganirelix Study Group. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 2001;75:38-45.
9. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception: a Cochrane review. *RBM Online* 2007;14:640-49.

10. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD001750.
11. Lin Y, Kahn JA, Hillensjo T. Is there a difference in the function of granulosa-luteal cells in patients undergoing IVF either with GnRH agonist or GnRH antagonist? *Hum Reprod* 1999;14:885–88.
12. Metallinou C, Asimakopoulos B, Schro A, Nikolettos N. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reprod Sci* 2007;14:737–49.
13. Mosmann TR, Coffman RL: Th1 and Th2 cells; different patterns of lymphokine secretion lead to different properties. *Annu Rev Immunol* 2000; 7:145–73.
14. Romagnani S: Human Th1 and Th2: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12:256–57.
15. Romagnani S: T-cell sub-sets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85: 9-18.
16. Kwak-Kim J, Chung-Bang HS, Ng SC, et al. Increased T helper 1 cytokines responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18: 767–73.
17. Ginsburg ES, Xiao L, Gargiulo AR, Kung F, et al: T-Helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro, fertilisation-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 83:1659–64.
18. Erdmann AA, Jung U, Foley JE, Yoda Y, Fowler D: Co-stimulated /Tc2 cells abrogate murine marrow graft rejection. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 604–13.
19. Burns WR, Wang Y, Tang PC, et al: Recruitment of CXCR3+ and CCR5+ T-cells and production of interferon gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries. *Am J Transplant*, 2005; 5:1226–36.
20. Gramer DW, Walker Am, Schiff. Statistical methods in evaluating the outcome of infertility therapy. *Fertil Steril* 1979;32:80-6

21. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4177-88.
22. Fauser BC, Diedrich K, Devroey P, et al. Predictors of ovarian response: progress toward individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 1-14.
23. Ziebe S, Loft A, Petersen JH, et al. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:169
24. Seifer DB, Scott RT, Bergh PA et al. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle stimulating hormone. *Fertil Steril* 1999;72: 63-5.
25. Sills ES, Alper MM Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: Practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 146: 30-36.
26. Off JD, Guigley ME yen SSC. Hormonal Dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metob* 1987;57:792-6
27. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 13-16.
28. WHO manual for standardized investigation and diagnosis of the infertile couples. Cambridge, New York, Malbourne: Cambridge Universty Press, 1993
29. Silverberg KM. Ovulation induction in the ovulatory woman. *Semin Repord Endocrinol* 1996; 14: 339-49
30. Crosignani PG, Rubin BL. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod* 2000; 15: 723-32.
31. Demirtürk F, Çalışkan AC. Kadın İnfertilitesi. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite*. Erk A, Günalp S. çeviri editörü. 7. Baskı. 2007. p: 1013-23.

32. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004; 81: 1333-43.
33. Devroey P, Fauser BC, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 391-408.
34. Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility. *Fertil Steril* 2008; 89: 1-16.
35. Gulekli B, Child TJ. Initial investigations of the patients (female and male). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 401-12.
36. Den Hartog JE, Lardenoije CM, Severens JL, et al. Screening strategies for tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2008; 23: 1840-48
37. Krynicki E, Kaminski P, Szymanski R, et al. Comparison of hysterosalpingography with laparoscopy and chromopertubation. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996; 3: S22-3
38. Guzick DS, Sullivan MW, Amanson GD, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 70: 207
39. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364 (9447): 1789-99.
40. WHO laboratuvar el kitabı: insan semeni ve sperm servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Günalp S, Aktan E, Yücel A. editör. 4. baskı. 2002: p: 60-62.
41. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-23.
42. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, et al. The evaluation of morphological characteristic of human spermatozoa according the strict criteria. *Hum Reprod* 1990; 5: 586-92.
43. Aydos K. Erkek infertilitesi. *Temel Üroloji*. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. editör. 3. baskı. 2007. p: 986-93.
44. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Lippincott Williams and Wilkins 7 th edition Philadelphia. 2005: 340-67

45. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD001750.
46. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results, *Hum Reprod* 1988; 1(2): 81-87
47. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(2): 121-55
48. Swain EJ, Smith; Mechanism of oocyte maturation. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM editors. *In-Vitro Maturation of Human Oocytes, Basic Science to Clinical Application*, 1st ed. Montreal, Informa Health Care pres. 2007; p: 83-101
49. Lipscomb GH, Stovall TG, Ling FW, Nonsurgical treatment of ectopic pregnancy, *New Engl J Med* 343:1325,2000.
50. Ries A, Singson P, Bidus M, Barnes JG, Use of the endometrial pipelle in the diagnosis of early abnormal gestations, *Fertil Steril* 74:593,2000
51. Schats R, Schoemaker J. The use of GnRH agonists. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 483-91.
52. Bozdağ G, Gürkan T. Yardımcı üreme teknolojileri. *Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite*. Erk A, Günalp S. çeviri editörü. 7.Baskı. 2007. p: 1215-74.
53. Urman B, Yakın K. Yardımcı üreme teknikleri. *Reprodüktif endokrinoloji ve İnfertilite*. Çolgar U. editör. 1. baskı. 2006. p: 171-75.
54. Tarlatzis BC, Bili H. Antagonistic analogs of GnRH: preferable stimulating protocol. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. editor. 2001. p: 493-500.
55. Kovacs P, Matyas S, Boda K. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2003; 18: 2337-41.
56. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta* 2008; 29: 115-20.

57. Taner MZ, Sengül N. Over embriyoloji ve gelişim. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite Erk A, Günalp S. Çeviri Editörü. 7.Baskı. 2007. p:97-111.
58. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals *Reproduction* 2001; 122: 829-38.
59. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results, *Hum Reprod* 1988; 1(2): 81-87
60. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(2): 121-55
61. Çiçek. N. Temel üreme endokrinolojisi ve infertilite. Palme Yayıncılık 2008. 218-30
62. Smith GD. In vitro maturation of oocytes. *Curr Womens Health Rep.* 2001;2:143–51.
63. Tavmergen E, Akdogan A. Overde yaşam siklusu. Yen&Jaffe üreme endokrinolojisi. Günalp S.Çeviri editörü. 5. baskı. 2006. p:223-31.
64. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541: 259-74.
65. Swain EJ, Smith GD. Mechanism of oocyte maturation. In vitro maturation of human oocytes.2007. p:83-101
66. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 1994;164:1–9.
67. Özcan C. Embriyoner Gelişim. Delilbaşı L. editör. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar Ve Güncel Yaklaşımlar),1.baskı.2008;s:117–125
68. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:93–8.
69. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* 1995;10:2427–31.

70. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;2:429–47.
71. Cummins JM, Breen TM, Harrison KM, et al. A Formula for scoring human embryo growth rates in IVF: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3: 284-95.
72. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-42.
73. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, et al. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 2001; 75: 525-32.
74. Combelles CMK, Cekleniak NA, Racowsky C, et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 1006-16.
75. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and a derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15: 2190-96
76. Fisch JD, Sher G, Adamowicz M, et al. The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2003; 80: 1352-58.
77. Loi K, Prasath EB, Huang ZW. A cumulative embryo scoring system for the prediction of pregnancy outcome following ICSI. *Singapore Med J.* 2008; 49: 221-8.
78. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.

79. Scott L, Alvero R, Leondires M, et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394-2403.
80. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, et al. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertil Steril* 2005; 84: 900-10.
81. Robertson SA, Brännström M, Seamark RF: Cytokines in the rodent reproductive and the cytokineendocrine interaction. *Curr Opin Immunol* 1992;4:585– 590.
82. Adashi EY: The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocrinol Rev* 1990;11:454– 64.
83. Wang LJ, Pascoe V, Petrucco OM, et al: Distribution of leukocyte subpopulations in the human corpus luteum. *Hum Reprod* 1992;7:197– 202.
84. Brännström M, Pascoe V, Norman RJ, et al: Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 1994;61:488– 95.
85. Loukides JA, Loy RA, Edwards R, et al: Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1363– 67.
86. Harkin DG, Bignold LP, Herriot-Warnes DM, Kirby CA: Chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes towards human pre-ovulatory follicle fluid and serum using a 'sparse-pore' polycarbonate filtration membrane. *J Reprod Immunol* 1994; 27:151– 55.
87. Herriot DM, Warnes GM, Kerin JE: Pregnancy-related chemotactic activity of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1986;45:196– 201.
88. Brännström M, Norman RJ: Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 1993;8:1762– 75

89. Fakih H, Vijayakumar R: Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil Steril* 1990;53:515– 20.
90. Leung PCK, Steele GL: Intracellular signalling in the gonads. *Endocr Rev* 1992;13:476– 97.
91. Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW: Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lymphohematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. *Bioessays* 1991;13:535– 540.
92. Tabibzadeh S: Human endometrium: An active site of cytokines production and action. *Endocr Rev* 1991;12:272– 290.
93. Simon C, Mercader A, Frances A, et al: Hormonal regulation of serum and endometrial IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-1ra: IL-1 endometrial microenvironment of the human embryo at the apposition phase under physiological and supraphysiological steroid level conditions. *J Reprod Immunol* 1996;31:165– 84.
94. Giudice LC, Irwin JC: Roles of the insulin-like growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual:trophoblast interface. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17:13– 21.
95. Cohen PE, Zhu L, Pollard JW: Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice disrupts estrous cycles and ovulation. *Biol Reprod* 1997;56:110– 18.
96. Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT: Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 1994;1:277– 84.
97. Godkin JD, Dore JJ: Transforming growth factor beta and the endometrium. *Rev Reprod* 1998;3:1– 6.

98. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, et al: Leukaemia inhibitory factor and LIF receptor expression in human endometrium suggest a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3115.
99. Carson D, Bagchi I, Dey S, Enders E, Fazleabas A, Lessy B, Yoshinaga K: Embryo implantation. *Dev Biol* 2000;223:217– 237.
100. Giudice LC, Saleh W: Growth factors in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 1994;6:60– 69.
101. Salamonsen LA, Dimitriadis E, Robb L: Cytokines in implantation. *Semin Reprod Med* 2000; 18:299– 310.
102. Lim H, Song H, Paria BC, Rees J, Das SK, Dey SK: Molecules in blastocyst implantation: Uterine and embryonic perspectives. *Vitam Horm* 2002;64:43– 76.
103. Simon C, Martin JC, Meseguer M, Caballero-Campo P, Valbuena D, Pellicer A: Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:43– 53.
104. Formby B: Immunologic response in pregnancy. Its role in endocrine disorders of pregnancy and influence on the course of maternal autoimmune diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24:187– 205.
105. Wegman TG, Lin H, Guilbert L, et al: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353– 56.
106. Stanley ER, Guilberts LJ, Tushinski RJ, et al: CSF-1. A mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J Cell Biochem* 1983;21:151– 59
107. McCracken AS, Grant KE, MacKenzie IZ, Redman CW, Pardon HJ: Gestational regulation of granulocyte colony-stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biol Reprod* 1999; 60:790– 96.
108. Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Tobita M, et al: Identification and characterization of receptor for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9323– 26.

109. Pollard JW, Bartocci A, Arceci R, Orlofsky A, Ladner MB, Stanley ER: Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature* 1987;330:484– 86.
110. Saji F, Azuma C, Kimura T, Koyama Y, Ohashi K, Tanizawa O: Gene expression of macrophage colony stimulating factor and its receptor in human placenta and deciduas. *Am J Reprod Immunol* 1990;24:99– 104.
111. Beauchamp JL, Croy BA: Assessment of expression of the receptor for colony-stimulating factor-1 (fms) in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 1991;45:811– 17.
112. Hock DL, Huhn RD, Kemmann E: Leukocytosis in response to exogenous gonadotropin stimulation. *Hum Reprod* 1997;12:2143– 46.
113. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L: Detection of granulosa colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 2004;81:(suppl 1):789– 91.
114. Treng JF, Ryan IP, Milam TD et.al. Interleukin-6 secretion in vitro is upregulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:18
115. Braun DP, Gebel H, House R, et.al. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65:1125-9
116. Tsudo T, Harada T, Iwabe T, et.al. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2000; 73:2005-11
117. Beauchamp JL, Croy BA: Assessment of expression of the receptor for colony-stimulating factor- (fms) in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 1991;45:811– 17.
118. Parrott J, Skinner M: Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999;140:4262– 71
119. Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Suginami H, Iwai M, et al: The expression of c-kit protein in human adult and fetal tissues. *Hum Reprod* 1993;8:1955– 62.

120. A. A. Ostanin, B. I. Aizikovich, I. V, E. R. Chernykh, et al. Role of Cytokines in the Regulation of Reproductive Function. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2007. pp. 81-85,
121. Al-Harthi L, Wright DJ, Anderson D et al. The impact of the ovulatory cycle on cytokine production: evaluation of systemic, cervicovaginal, and salivary compartments. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 719-24.
122. S. R. Bornstein, H. Rutkowski, and I. Vrezas. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Feb 27;215(1-2):135-41
123. Brannstrom, M., R. J. Norman. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum. Reprod.* 1993; 8(10): 1762-75
124. Burke, F., M. Relf, R. Negus, F. Balkwill. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine.* 1993; 8: 578-85
125. Castilla JA, Sampalo A, Molina R, et al. Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am J Reprod Immunol* 1990; 22: 127-9.
126. N. J. Hannan, R. L. Jones, H. O. Critchley, et al. Coexpression of Fractalkine and Its Receptor in Normal Human Endometrium and in Endometrium from Users of Progestin-Only Contraception Supports a Role for Fractalkine in Leukocyte Recruitment and Endometrial Remodeling, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*2004; 89(12), 6119-29
127. Loukides, JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML. Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab.*1990;71:1363–67.
128. Machelon V, Emilie D. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. *Eur Cyt Netw.*1997; 8:137–43.
129. Mathur RS, Jenkins JM, Bansal AS. The possible role of the immune system in the aetiopathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome *Hum Reprod* 1997;12:2629-34
130. Raghupathy, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 1997; 18:478-82.

131. Gougeon A. Regulation intragonadique de la folliculogenese humaine: faits and hypotheses. *Ann Endocrinol* 1994;55:63–73.
132. Kaipia A, Hsueh A. Regulation of ovarian follicle atresia. *Ann Rev Physiol* 1997;59:349–63.
133. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002;17:1017–22.
134. Asimakopoulos B, Schöpfer B, Dawson A, Caglar GS, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. IGF-1 and epidermal growth factor levels in follicular fluid of women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using the multidose GnRH-antagonist protocol or the long GnRH-agonist protocol. *J Endocrinol Invest* 2006;29(5):258-70
135. Büscher U, Chen FC, Kentenich H, Schmiady H. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum Reprod* 1999;14:162–66
136. Hammadeh ME, Ertan AK, Georg MT, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between ovarian stimulation regimen and interleukin level in pre-ovulatory follicular fluid and their effect on ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:255–61.
137. Asimakopoulos B, Köster F, Felberbaum R, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. Cytokine and hormonal profile in blood serum and follicular fluids during ovarian stimulation with the multidose antagonist or the long agonist protocol. *Hum Reprod* 2006;21:3091–95.
138. Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocrine Rev* 1990;11:454–464.
139. Souter I, Huang A, Martinez-Maza O, Crabb Breen E, Decherney AH, Chaudhuri G, Nathan L. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1, TNF- α , and IL-6 in IVF cycles. *Fertil Steril* 2009;91:2012–2019.

140. Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Carella C, Izzo A. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol* 2003;101:1177–1182.
141. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, El Helw BA, Shaarawy M. Elevated levels of IL-2, soluble IL-2 receptor alpha, IL-6, soluble IL-6 receptor and VEGF in serum and ascitic fluid of patients with severe OHSS. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;87:81–85.
142. Ficicioglu C, Kumbak B, Akcin O, Attar R, Yildirim G, Yesildaglar N. Comparison of follicular fluid and serum cytokine concentrations in women undergoing assisted reproductive treatment with GnRH agonist long and antagonist protocols. *Gynecol Endocrinol*. 2010 26(3):181-6.