

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ UYGULAMASINDA
TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
KADINLARDA LUTEAL FAZ ENDOMETRİYUMUNUN OTOLOG
KOKÜLTÜR ENDOMETRİYUMUYLA İNCE YAPI DÜZEYİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI

Leyla BAHAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin BAYKAL
Prof. Dr. Semra KAHRAMAN

MERSİN – 2008

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ UYGULAMASINDA
TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN
KADINLARDA LUTEAL FAZ ENDOMETRİYUMUNUN
OTOLOG KOKÜLTÜR ENDOMETRİYUMUYLA İNCE YAPI
DÜZEYİNDE KARŞILAŞTIRILMASI

Leyla BAHAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin BAYKAL

Prof. Dr. Semra KAHRAMAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE.HE(LB)2006-3DR kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

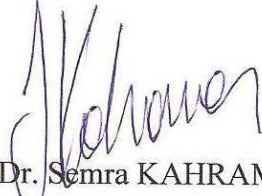
MERSİN – 2008


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulamasında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Kadınlarda Luteal Faz Endometriyumunun Otolog Kokültür Endometriyumuyla İnce Yapı Düzeyinde Karşılaştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.12. 2008


Prof. Dr. Tülin BAYKAL


Prof. Dr. Semra KAHRAMAN


Prof. Dr. Sait POLAT


Doç Dr. Banu Coşkun YILMAZ


Doç Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 07.01.2009..tarih 09/10 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Doç Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, gösterdiği büyük sabrı ve hiç esirgemediği emeğiyle bana bilim dünyasının kapılarını açan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Tülin Baykal'a ve kıymetli zaman ve emeğini benimle paylaşan sevgili hocam Prof. Dr. Semra Kahraman'a tezimin hazırlanması boyunca gösterdikleri titizlik, özveri ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitim sürecim boyunca yetişmem de emeği olan değerli Anabilim Dalı hocalarımız, Doç. Dr. Banu Coşkun Yılmaz'a, Doç. Dr. Necat Yılmaz'a ve Yrd. Doç. Dr. Ebru Ballı'ya doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora eğitimimin her döneminde bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sait Polat'a teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarından materyal toplanması ve diğer aşamalarda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen İstanbul Memorial Hastanesi Tüp Bebek ve Genetik Merkezi çalışanları, sevgili arkadaşlarım Emb. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı, Emb. Semra Sertyel, Emb. Necati Fındıklı, Emb. Zafer Candan, Bio. Semra Mılık, Ahmet Zorlu, Ebru Yuvacan, Asuman İşler'e çalışmama gösterdikleri sabır ve hassasiyetlerinden dolayı minnettirim. Tezimin Elektron Mikroskopik doku takip aşamasında desteklerini esirgemeyen Çapa Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalından değerli hocalarım Prof. Dr. Yurdağül Canberk, Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Leyla Tapul, Prof. Dr. Ayhan Bilir ve sevgili arkadaşlarım Bio. Ebru Karabulut, Bio. Fadime Aktar, Bio. Funda Onar, Günseli Tuygun ve Nevriz Dural'a teşekkür ederim. Biofizik Anabilim Dalından değerli hocam Doç. Dr. Ülkü Çömelekoğlu ve Bioistatistik Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Bahar Taşdelen ve Arş. Gör. İlter Helvacı'ya yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarıma, diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarımdan Dr. Nazan Eras Erdoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan annem ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Leyla BAHAR

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KADIN GENİTAL SİSTEMİ	4
2.1.1. Kadın Genital Sisteminin Gelişimi.....	4
2.1.1.1. Gonadların Gelişimi4	4
2.1.1.2. Genital Duktusların Gelişimi.....5	5
2.1.1.3. Dişi Genital Duktus ve Bezlerinin Gelişimi:.....5	5
2.1.2. Uterus.....6	6
2.1.2.1. Uterus Anatomisi.....6	6
2.1.2.1.1. Corpus Uteri.....6	6
2.1.2.1.2. Cerviks Uteri.....6	6
2.1.2.2. Uterusun Histolojisi.....7	7
2.1.2.2.1. Perimetrium.....7	7
2.1.2.2.2. Miyometriyum.....7	7
2.1.2.2.3. Endometriyum.....8	8
2.2. MENSTRUAL SIKLÜS HİSTOFİZYOLOJİSİ9	9
2.2.1. Normal Menstrual Siklüs.....10	10
2.2.1.1. Proliferatif (Foliküler) Faz.....10	10
2.2.1.2. Sekretuar (Luteal) Faz.....11	11
2.2.1.3. Menstrual Faz.....12	12
2.3. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....14	14
2.3.1. Fertilizasyon.....14	14

2.3.2. YÜT'nin Başarısı.....	15
2.3.3. İn Vitro Fertilizasyon.....	16
2.4. EMBRİYO İMPLANTASYONU.....	16
2.4.1. İmplantasyonun Moleküler Mekanizması.....	16
2.4.2. İmplantasyon Fizyolojisi.....	18
2.4.3. Endometriyal Reseptivite.....	19
2.4.4. Pinopodlar.....	22
2.4.5. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı.....	24
2.5. EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR.....	25
2.5.1. Endometriyal Kokültür Uygulamaları.....	25
2.5.2. Monolayer Endometriyal Kokültür.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1.KOKÜLTÜR PROTOKOLÜNÜN UYGULANMASI.....	29
3.1.1. Kokültür Sisteminde Kullanılanlar Listesi.....	29
3.1.2. Çalışma Gruplarının Tanımlanması.....	32
3.1.3. Endometriyal Biyopsi İşlemi.....	32
3.1.4. Endometriyal Epitel-Gland (EE) ve Stromal (ES) Hücre Elde Edilişi ve Kültürü.....	33
3.2. TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME.....	36
3.2.1. Endometriyal Doku ve Endometriyal Kokültür Hücre Topluluğunun Gruplandırılması.....	37
3.2.2. Dokuların Tesbiti ve Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Doku Takibine Alınması.....	37
3.2.3. Dehidratasyon.....	37
3.2.4. Resin İnfiltrasyonu.....	38
3.2.5. Dokuların Gömülmesi ve Bloklama İşlemi.....	38
3.2.6. Doku Bloklarından Kesit Alınması.....	39
3.2.7. Kontraslama.....	39
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. FERTİL ve TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYAL GLAND VE STROMASININ İNVERT MİKROSKOPLA GÖRÜNTÜLERİ.....	40

4.1.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Gland ve Stroma Görüntüleri.....	40
4.1.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Gland ve Stroma Görüntüleri.....	41
4.2. FERTİL VE TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYUM DOKUSU IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ.....	42
4.2.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Işık Mikroskobik Görüntüleri.....	42
4.2.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Işık Mikroskobik Görüntüleri	48
4.3. FERTİL VE TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYUM DOKUSU ELEKTRON MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ.....	51
4.3.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Elektron Mikroskobik Görüntüleri	51
4.3.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Elektron Mikroskobik Görüntüleri	57
4.4. ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR HÜCRELERİ YARI-İNCE KESİTLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	63
4.4.1. Fertil Grubun Endometriyum Kokültür Hücreleri Yarı-ince Kesitleri.....	63
4.4.2. TİB Grubunun Endometriyum Kokültür Hücreleri Yarı-ince Kesitleri:.....	65
4.5. ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR HÜCRELERİ İNCE KESİTLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	66
4.5.1. Fertil Grup Endometriyum Kokültür Hücrelerinin İnce Kesitleri.....	66
4.5.2. TİB Grubunun Endometriyum Kokültür Hücrelerinin İnce Kesitleri:.....	71
4.6. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇLARI.....	75
4.6.1. İstatiksel Değerlendirme Tablosu.....	75
4.6.2. İstatiksel Değerlendirme Grafikleri.....	76
4.6.2.1. Gruplara Göre Hücre Tipleri Dağılımı.....	76
4.6.2.2. Hücre Tiplerine Göre Grupların Dağılımı.....	77
5.TARTIŞMA.....	78
6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	90
7.KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** İnsan embriyosunda gonadların gelişiminin şematize görüntüsü.
- Şekil 2.2.** Uterus anatomisinin şematize görüntüsü.
- Şekil 2.3.** Uterusun luteal (sekretuar) faz histolojik görüntüsü. H.E. X20.
- Şekil 2.4.** Menstrual siklus boyunca oluşan değişikliklerin şematize görüntüsü.
- Şekil 2.5.** Embriyonun tutunma ve invazyonu.
- Şekil 3.1.** Endometriyal gland ve stromal kokültür hücrelerinin hazırlanması.
- Şekil 3.2.** Kokültür hücrelerinin gland ve stroma hücrelerine ayrıştırılması.
- Şekil 3.3.** Kokültüre endometriyal dokunun stereo mikroskop altındaki görüntüsü X10.
- Şekil 4.1.** Fertil grup endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X20.
- Şekil 4.2:** Fertil grup endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X40.
- Şekil 4.3:** TİB grubu endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X20.
- Şekil 4.4:** TİB grubu endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X40.
- Şekil 4.5:** Fertil grup endometriyum dokusu yüzey epiteli ve stroma görüntüsü X40.
- Şekil 4.6:** Fertil grup endometriyum dokusu ışık mikroskopik görüntüsü X20.
- Şekil 4.7:** Fertil grup endometriyumunda bez epiteli ve stromanın görüntüsü X20.
- Şekil 4.8:** Şekil 4.7'deki seçili alan içerisindeki endometriyumun bez epiteli X40.
- Şekil 4.9.** Fertil grup endometriyumunun epiteli ve stroması X40.
- Şekil 4.10:** Fertil grup endometriyum bez epitelinin görüntüsü X20.
- Şekil 4.11:** Fertil grup endometriyum bez epitelinin görüntüsü X40.
- Şekil 4.12:** TİB grubu endometriyum yüzey epiteli ve stromanın görüntüsü X20.
- Şekil 4.13:** Şekil 4.12'deki seçili alanın görüntüsü X40.
- Şekil 4.14:** TİB grubu endometriyumunun epitelyum ve stroması X20.
- Şekil 4.15:** TİB grubu endometriyumunun bez epitelinin görüntüsü X20.
- Şekil 4.16:** Şekil 4.15'teki seçili alanın görüntüsü X40.
- Şekil 4.17:** Fertil grup yüzey epitelinde mikrovilluslerin görüntüsü X20.000.
- Şekil 4.18:** Fertil grup endometriyum epiteli, pinopodlar X12.000.
- Şekil 4.19:** Fertil grupta lümende görülen pinopod parçaları X10.000.
- Şekil 4.20:** Fertil grup yüzey epitel hücrelerinde bazal yerleşimli çekirdekler X6000.
- Şekil 4.21:** Fertil grupta yüzey epitel hücreleri arasında hücre bağlantıları X20.000.
- Şekil 4.22:** Fertil grup endometriyum stroması X3000.

- Şekil 4.23:** Fertil grup salgı yapan bez epitel hücreleri X12.000.
- Şekil 4.24:** Fertil grupta salgı vakuolleriyle dolu bez epitel hücreleri X15.000.
- Şekil 4.25:**Fertil gupta salgı hücrelerinden oluşan bez epitel hücreleri X3000.
- Şekil 4.26:** TİB grubu endometriyum yüzey epiteli X7500.
- Şekil 4.27:** TİB grubunda yüzey epiteli ve pinopod benzeri yapılar X7500.
- Şekil 4.28:** TİB grubunda heterokromatik çekirdekli yüzey epitel hücreleri X6000.
- Şekil 4.29:** TİB grubunda yüzey epitelinin çekirdek lokalizasyonu ve silyumlar X6000.
- Şekil 4.30:** TİB grubunda endometriyal epitelin bazal laminası altında stroma X5000.
- Şekil 4.31:** TİB grubunda epitel hücreleri arasında interdigitasyonlar X12.000.
- Şekil 4.32:** TİB grubu stromal hücrelerin görüntüsü X5000
- Şekil 4.33:** TİB grubu bez epitel hücreleri X3000.
- Şekil.4.34:** TİB grubu bez epitel hücreleri X5000.
- Şekil 4.35:** TİB grubu bez epitel hücreleri X7500.
- Şekil 4.36:** TİB grubu bez epitel hücreleri ve stroma X6000.
- Şekil 4.37:** Fertil grup kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X20
- Şekil4.38:** Fertil grup kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X40.
- Şekil 4.39:** TİB grubu kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X20.
- Şekil 4.40:** TİB grubu kokültür hücrelerinin görüntüsü X40.
- Şekil 4.41:** Fertil grup vakuollü hücreler ve bağlantıları X5000 ve X7500.
- Şekil 4.42:** Fertil grup vakuollü hücreler X10.000.
- Şekil 4.43:**Fertil grup vakuollü hücre X15.000.
- Şekil 4. 44::**Fertil grup mikrovillüslü hücre X5000.
- Şekil 4.45:** Fertil grup mikrovillüslü hücre X7500.
- Şekil 4.46:** Fertil grup mikrovillüslü hücreler X12.000 ve X15.000.
- Şekil 4.47:** Fertil grup sitoplazmik uzantılı hücre X10.000.
- Şekil 4.48:** Fertil grup sitoplazmik uzantılı hücreler X10.000 ve X20.000.
- Şekil 4.49:**TİB grubu vakuollü hücre X15.000.
- Şekil 4.50:** Şekil 4.49'un seçili alanının görüntüsü X15.000.
- Şekil 4.51:** TİB grubu vakuollü hücre X10.000.
- Şekil 4.52:** TİB grubu mikrovillüslü hücre X10.000.
- Şekil 4.53:**TİB grubu sitoplazmik uzantılı hücre X10.000.
- Şekil 4. 54:** TİB grubu sitoplazmik uzantılı hücre X25.000.

ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Kokültürde Kullanılan Kimyasallar.

Tablo 3.2: Kokültürde Kullanılan Sarf Malzemeleri.

Tablo 3.3: Kokültürde Kullanılan Demirbaş Ekipmanlar.

Tablo 3.4: TEM Doku Takibinde Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler.

Tablo 3.5. TEM Endometriyal Doku Takibinde Kullanılan Ekipmanlar.

Tablo.4.1. Kikare Testine Göre İstatiksel Değerlendirme Tablosu

Tablo 4.2. Gruplara Göre Hücre Tipleri Dağılımı.

Tablo 4.3. Hücre Tiplerine Göre Grupların Dağılımı.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- AECC:** Otolog Endometriyal Ko-kültür (Autolog Endometrial Coculture)
- ART:** Yardımlı Üreme Teknikleri (Asiste Reprodüktif Teknikleri)
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- ECs:** Endometriyal Ko-kültür Hücreleri (Endometrial Coculture Cells)
- EGF:** Erken Gebelik Faktörü
- ER:** Östrojen
- ET:** Embriyo Transferi
- FSH:** Follikül Stimulan Hormon
- GnRH-a:** Gonadotropin Releasing Hormon Analogu
- HB-EGF:** Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor)
- HCG:** İnsan Koryonik Gonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin)
- HRT:** Hormon Replasman Tedavisi
- ICSI:** İntra-Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu
- IUI:** İntrauterin İnseminasyon
- IVF:** In Vitro Fertilizasyon
- LM:** Işık Mikroskobu (Light Microscopy)
- LH:** Luteinizan Hormon
- LIF:** Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor)
- Oİ:** Ovulasyon İndüksiyonu
- PGD:** Preimplantasyon Genetik Tanı
- PR:** Progesteron
- RİF:** Repeated İmplantation Failure
- SEM:** Tarayıcı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
- TEM:** Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy)
- TİB:** Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
- YÜT:** Yardımlı Üreme Teknikleri
- ZP:** Zona Pellusida
- MIS:** Mülleryan İnhibe eden madde (Müllerian Inhibiting Substance)

ÖZET

Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulamasında Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Olan Kadınlarda Luteal Faz Endometriyumunun Otolog Kokültür Endometriyumuyla İnce Yapı Düzeyinde Karşılaştırılması

Kültüre edilen embriyoların morfolojilerini geliştirmede ve implantasyon oranını artırmada Otolog endometriyal kokültür hücrelerinin başarılı olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda fertil ve Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) olan bireylerin endometriyum dokularının karşılaştırılması ile birlikte, bu dokulardan elde edilen endometriyal kokültür hücrelerinin embriyo gelişimini desteklemek ve implantasyon başarısındaki rolünü anlamak için ince yapısının analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, vaka grubunda 27 TİB (≥ 3) olan ve kontrol grubunda ise 9 fertil kadın bulunmaktaydı. Endometriyal dokular, araştırmanın içeriğiyle bilgilendirilen kontrol ve İn-vitro fertilizasyon (IVF) programına katılan hastalardan toplandı. Endometriyal doku örneklerinin bir kısmı ışık ve transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) incelenmek amacıyla bir kısmı ise kültüre edilmek için ayrıldı. Kültüre edilen endometriyal dokunun ışık ve TEM ile incelenmesi sonucunda insan endometriyal kokültür hücrelerinin 3 yeni tipi tanımlandı: Bu hücre tiplerinde ilk grup vakuollü, ikincisi mikrovillüslü ve üçüncü grup ise sitoplazmik uzantılı hücrelerdi. Fertil ve TİB gruplarında endometriyal kokültür hücrelerinin yapısal ve morfolojik özellikleri karşılaştırıldı. Vakuollü hücreler TİB grubunda en sık rastlanan hücreler olup, çok sayıda vakuol içeriyorlardı ve endometriyum salgı epitel hücrelerine benzer hücreler olarak değerlendirildi. Mikrovillüslü hücreler Fertil ve TİB gruplarında en az rastlanan hücre grubuydu. Sitoplazmik uzantılı hücreler ise, fertil grupta en çok görülen hücrelerdi, bu hücrelerin pinopod yapan epitel hücreleriyle benzer olduğu tahmin edildi.

Bu çalışma ile endometriyal kokültür hücrelerinin, embriyo implantasyon evresini düzenlemede önemli olduğu düşünüldü. Bu hücreler için yapılacak ileri çalışmaların, endometriyal reseptivite ve başarılı implantasyonun oluşmasında yer alan faktörleri anlamamızı kolaylaştırabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kadın infertilitesi, Endometriyal kokültür, TİB, TEM

ABSTRACT

The Comparison of Luteal Phase Endometrium with Autologous Co-Culture Endometrium on the Fine Structure Level on Women Who Have Repeated Implantation Failure during the Assisted Reproduction Techniques Application

The coculture of human embryos with human endometrial cells was described to be successful at improving embryo morphology, and the subsequent implantation rate. The main aim of our study was to investigate the particular role of endometrial coculture cells on the improvement of both embryo morphology and implantation rates, regarding to the fine structure level.

In this study, 27 women with repeated implantation failure (RIF; ≥ 3 previous IVF cycles failure) were involved in the study group and control group contained 9 fertile women. Endometrial tissues (ETs) were collected from patients undergoing IVF procedures after getting informed consent. Following the endometrial coculture, ETs were fixed and processed for light and transmission electron microscopy.

Three new types of human endometrial coculture cells were defined. The first group of cells contain vacuoles, second group microvillus, and third group cytoplasmic extension. These groups were examined by Transmission Electron Microscope (TEM). Structural and morphological properties of these cells were compared with their control group and the differences were observed. Cells, which included many vacuoles, had similar morphology with endometrium secretory epithelial cells. These cells were the most common observed cells of the TIB group. However, cells with microvillus were the least observed in both of the groups. In addition, cells with cytoplasmic extension were the most frequently seen in the fertil group. It has been estimated that they were similar to the epithelial cells which made pinopod.

It has been proven that endometrial coculture cells regulate embryo implantation stage in human endometrial tissue and these cells may advance our understanding of

factors involved in the establishment of endometrial receptivity and successful implantation.

Key Words: Female Infertility, Endometrial Coculture, RIF, TEM.

GİRİŞ

İnsan gelişimi bir oositin fertilize olmasıyla başlar. Fertilizasyon birbirleriyle ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir (1). Fertilize olmuş oosit, fertilizasyon sonrası gelişimine bağlı olarak genellikle 6. günden itibaren endometriyuma implantasyon sürecine girer (2). Bu dönemde, endometriyal stroma hücreleri, blastosistin varlığına yanıt verir ve farklılaşan metabolik aktiviteyle korpus luteum tarafından progesteron salgılanır. Stromanın sekretuar hücreleri desidual hücreler olarak, oluşan yanıt ise desidual reaksiyon olarak isimlendirilir. Endometriyal bezler genişler, lokal uterin duvarın kanlanması artar ve ödem meydana gelir. Östrojen ve progesteronun stromal hücreler üzerine bir dizi etkisiyle şekillenen desidual hücreler, blastosistin implantasyonunda önemlidirler. Geniş, soluk ve glikojenden zengin olan bu hücrelerin fonksiyonlarının tamamı aydınlatılmış olmamasına rağmen, embriyonun beslenmesi için elverişli, uygun bir çevre sağladığı bilinmektedir (3).

İnfertilite tedavisinde Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) adı verilen yöntemler kullanılmaktadır. YÜT, dışıdan alınan oositlerin, erkekten alınan spermiler ile laboratuvar ortamında fertilize edilmesi ve elde edilen embriyonun tekrar dışı genital sistemi içine yerleştirilmesi ilkesine dayanır. Günümüzde yardımcı üreme tekniklerinden en sık olarak İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) kullanılmaktadır (4). İyi kalite embriyo transferine rağmen, gebe kalmadaki başarısızlık, IVF uygulamalarında önemli bir klinik problemdir. İn vitro fertilizasyonun başarısını sınırlayan majör faktör, implantasyon yetersizliğidir. Bir blastosist, implantasyonun başlangıcı için reseptivite kazanmış bir endometriyumla etkileşime ihtiyaç duyar (5). IVF'un başarısı bunların uyumlu gelişimine bağlıdır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının altında, embriyo ve endometriyum bağlantılı problemler olduğu ileri sürülmektedir (6).

Üreme tıbbındaki son ilerlemelere rağmen, insan infertilitesine katkıda bulunan uterin reseptivitenin oynadığı rol hala açıklanamamış değildir. İmplantasyon döneminde uterus boşluğunu döşeyen epitelyal hücrelerin apikal membranları, mikrovillüslerini kaybeder, yerine geniş ve düz membran uzantıları gelişir (7). Pinositotik fonksiyonlarından dolayı bu uzantılara, 1973'te Enders ve Nelson "pinopod" adını

vermişlerdir (8,9,10). Birçok çalışmada; ovulasyon sonrası 6. ve 8. günler arasında, uterin reseptivite oluşmasının blastosist implantasyonunda çok önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu kısa ve kesin periyot 48 saatten daha azdır ve bu dönem “implantasyon penceresi” olarak tanımlanır (11). Pinopod ekspresyonunun, implantasyon penceresini lokalize etmede ve endometriyal reseptivitenin değerlendirilmesinde faydalı bir biyolojik belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (12,13).

In vivo ortamda erken embriyonik gelişme döneminde, sitokinler ve büyüme faktörleri yoluyla embriyo ve anne endometriyumu arasında güçlü bir etkileşim olduğu bilinmektedir (11). Son yıllarda kadının kendisinden alınan endometriyal hücrelerin kullanıldığı endometriyal kokültür çalışmaları yapılmaktadır. Otolog endometriyal kokültür (AECC) özellikle, 3 veya daha fazla IVF denemesine rağmen tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) olan kadınlar için faydalı bir tekniktir (14). AECC, ’ün, embriyoyu blastosist aşamasına götürmesi gibi, embriyo gelişimine destek olduğuna dair birçok çalışma rapor edilmiştir (15,16,17,18). Endometriyal kokültür hücreleri kültür ortamına, tipik embriyotrofik faktörler olan, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer proteinleri salgırlar (19). AECC sisteminde, endometriyal hücreler ile embriyo arasındaki direkt temasın da faydalı olabileceği bildirilmektedir (20,21). Ayrıca bu sistemde gelişen embriyoların implantasyon başarısının arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (17,18).

Spandorfer ve arkadaşları, tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda, endometriyumun rolünü belirlemek ve geliştirmek için ileri çalışmalar planlanmasının gerekliliğini vurgulamışlar ve AECC’den faydalanılacağı zaman, endometriyumun histolojik açıdan değerlendirilmesinin faydalı bir bakış açısı getirebileceğini ileri sürmüşlerdir (14).

IVF başarısını sınırlayan en önemli faktörlerden biri olan ve embriyo-endometriyum ilişkisine bağlı olarak ortaya çıkan implantasyon başarısızlığına yeni çözümlerin bulunması, infertilite tedavisinde çok önemli bir basamak olacaktır. Normal implantasyon ortamındaki endometriyum ile implantasyon başarısızlığı olan endometriyum arasındaki morfolojik farklılık yetersizliğin nedenlerinden biri olabilir. Ayrıca AECC sisteminde kültüre edilen embriyoların yüksek implantasyon oranına sahip olması, endometriyal kokültür hücreleriyle embriyo arasındaki etkileşimin bir

sonucu olarak açıklanabilir. Daha önce detaylı araştırılmamış olan endometriyal kokültür hücrelerinin morfolojik analizi ise bu sonuç için yeni ipuçları verebilir.

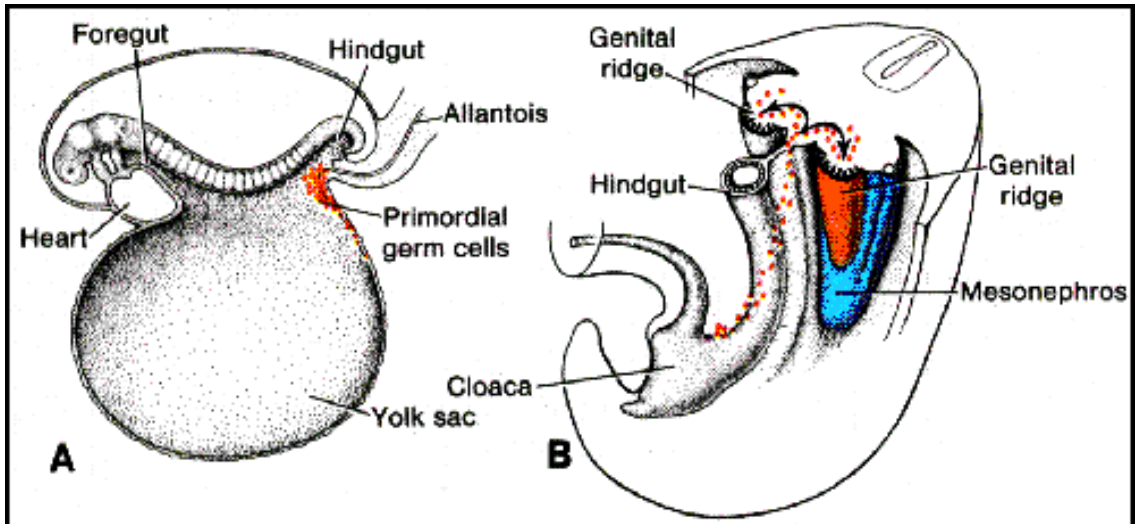
Bu amaçla çalışmamızda, iyi kalitede embriyo transferine rağmen gebelik oluşmayan, TİB olan bireylerin endometriyum dokuları ile bu dokulardan elde edilen kokültür hücrelerinin morfolojik yapılarının ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra fertil bireylerin endometriyum dokuları ve aynı dokulardan elde edilen kokültür hücreleri ile kontrol grupları oluşturulmuştur. Böylece gruplar arası farklılıkların belirlenmesi ve AECC'ün embriyo gelişimine ve implantasyon başarısına olan katkılarının TEM ve ışık mikroskopik düzeyde incelenerek ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Ayrıca, endometriyum kökenli infertilitenin ana sebeplerinden biri olan implantasyon başarısızlığının muhtemel nedenlerinin açıklanmasına katkı sağlanması da amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KADIN GENİTAL SİSTEMİ

2.1.1. Kadın Genital Sisteminin Gelişimi

2.1.1.1. Gonadların Gelişimi: Genital sistem erken dönemde her iki cinsten de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklanmamış safhası” olarak adlandırılır (Şekil 2.1.). Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık olan gonadal kabartı oluşur. Parmak şeklindeki primer seks kordonları, altındaki mezenşim içine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad; dışta yer alan bir korteks ve içte bir medulladan oluşmaktadır. Embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip olduğu zaman, farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır, medullası geriler (23-25).



Şekil 2.1. İnsan embriyosunda gonadların gelişiminin şematize görüntüsü. Farklanmamış gonad evresi (22).

2.1.1.2. Genital Duktusların Gelişimi: Dişi ve erkek embriyoların her ikisi de iki çift genital duktusa sahiptir. Mezonefrik duktus (Wolffian duktusu) erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli bir yer tutarken, paramezonefrik duktus (Müllerian duktusu) dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynamaktadır. 5.-6. haftalarda genital sistem farklılaşmamış safhada olduğundan, genital duktusların her iki çifti de bulunur. Paramezonefrik duktuslar, gonadların ve mezonefrik duktusların lateralinde gelişirler. Bunlar dişi üreme sistemi gelişiminde esansiyel bir role sahiptirler. Paramezonefrik duktuslar, mezonefrozların lateral yüzeylerinde, mezotelin longitudinal invaginasyonlarından oluşurlar. İnvaginasyonların kenarları birbirleriyle kaynaşır ve paramezonefrik duktuslar meydana gelirler. Bu duktusların huni şekilli kranial uçları, periton boşluğuna açılırlar. Paramezonefrik duktuslar embriyonun pelvik bölgesine ulaşmaya kadar, mezonefrik duktuslara paralel olarak, kaudal yöne doğru uzanırlar. Pelvik bölgeye ulaştıklarında, mezonefrik duktusları önde çaprazlarlar ve orta planda birbirleriyle birleşerek kaynaşır ve Y şekilli, “uterovaginal primordium”u oluştururlar. Bu tübüler yapı, ürogenital sinüsün arka duvarı içine uzanır, burada bir yükselti olan, “sinüs (müllerian) tüberkülünü” oluşturur (23-25).

2.1.1.3. Dişi Genital Duktus ve Bezlerinin Gelişimi: Dişi embriyolarında testosteron olmadığı için mezonefrik duktuslar gerilerken, Müllerian Inhibiting Substance (MIS) yokluğundan dolayı da paramezonefrik duktuslar gelişirler. Dişi genital yollarının çoğunluğu, paramezonefrik duktus tarafından oluşturulur. Tuba uterina'lar paramezonefrik duktusların birleşmemiş kranial bölümlerinden gelişir. Duktusların kaudal birleşmiş kısımlarından ise uterovaginal primordium farklılaşır. Bu yapı adından da anlaşılacağı gibi, uterus ve vaginanın üst kısmını oluşturur. Endometriyal stroma ve miyometriyum, komşu splanik mezenşimden gelişmektedir. Paramezonefrik duktusların birleşmesiyle eş zamanlı olarak, iki peritoneal katlantıda birleşir, böylece sağ ve sol kalın (broad) ligamentler ile rektouterin ve vesikouterin çukurlar meydana gelir. Uterus uzunluğu boyunca yanlarda, kalın ligamentler arasında, mezenşim prolifer ve differensiyel olarak gevşek bağ dokusu ve düz kastan oluşan, hücresel bir doku olan perimetriyum oluşturur (23-25).

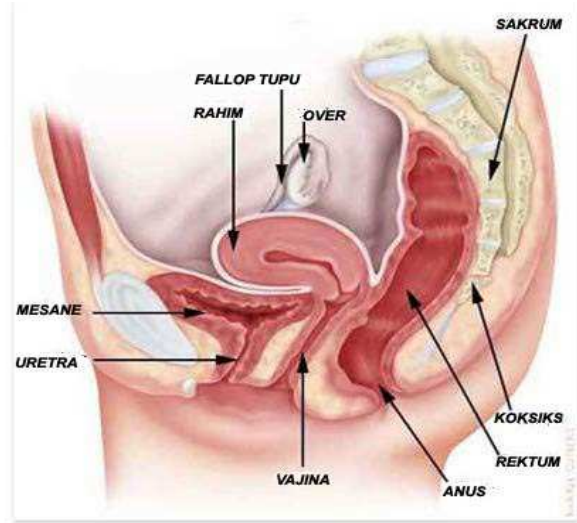
2.1.2. Uterus

2.1.2.1. Uterus Anatomisi

Rektum ve mesane arasında yerleşmiş, kalın musküler duvarlı bir kesedir (Şekil 2.2.). Erişkin bir kadında uterus mesanenin arkasında ve üzerinde yer alır. Mesane boş olduğunda uterus büyük ölçüde pubisin arkasındadır ve karın ön duvarında palpasyonu güçtür. Mesane doldukça normal anteversio pozisyonundaki bir uterus, daha vertikal bir konum alır ve pubisin üzerine çıkar. Perineal uçta vaginaya açılır. İki üst köşede ise tuba uterinalar, uterusu açılırlar. Uterus gebelik sırasında yapı, büyüklük ve pozisyonunu geniş çapta değiştirebilir, önden arkaya basık bir armut gibidir. 7.5 cm boy, 5 cm genişlik, 2.75 cm kalınlıkta ve 30-40 gram ağırlığındadır. Yapı ve fonksiyon bakımından korpus ve serviks diye iki kısma ayrılır, ikisi arasındaki daralmış kısma isthmus denir. İsthmusun iç kısmında ostium uteri internum bulunur (27,28).

2.1.2.1.1. Corpus Uteri: Karın boşluğuna serbest olarak uzanan tuba uterinanın uterusu giriş kısmının üstünde kalan yuvarlak bölümüne fundus denir. Korpus, fundustan isthmusa doğru daralır. Ön yüzü; mesaneye bakar, bu yüzü saran periton aşağıya doğru servikse kadar inerek mesane arka yüzüne atlar. Arka yüzü: çok konvekstir, periton bu yüzde aşağı inerek serviks ve vaginanın üst bölümünü sardıktan sonra rektum ön yüzüne atlar. Bu yüz ince barsak kıvrımları ile komşudur. Fundus, bütün yönlerde konvekstir. Üst uçlarında, tuba uterinalar uterusu açılırlar. Bunun biraz alt kısmına ligamentum teres uteri tutunmuştur. Üst kısmına ise ligamentum ovarii proprium tutunur. Bunların hepsi ligamentum latum uteri içindedirler (27,28).

2.1.2.1.2. Cervix Uteri: İsthmusun altındaki kısımdır, 2 cm uzunluğundadır. Vaginanın içine invaginasyon gösterir. Portio supravaginalis cervicis; önde mesaneden fibröz bir dokuyla ayrılmıştır. Portio vaginalis; vaginanın içine invagine olmuş kısımdır, ağzında ostium uteri bulunur. Ostium uteri, labium anterius ve labium posterius adlı iki dudakla çevrilidir. Arka dudakla vagina arasındaki çıkmaza, fornix posterior denir. Cavum uteri ise fundus kısmında bir üçgen şeklindedir, aşağıda bir kanal haline dönüşür. Canalis Cervicis Uteri, ortada daha geniş, uçlarda dardır. Ostium internum aracılığıyla kavum uteriye, ostium uteri aracılığıyla vaginaya açılır (27,28).



Şekil 2.2. Uterus anatomisinin şematize görüntüsü (26).

2.1.2.2. Uterusun Histolojisi

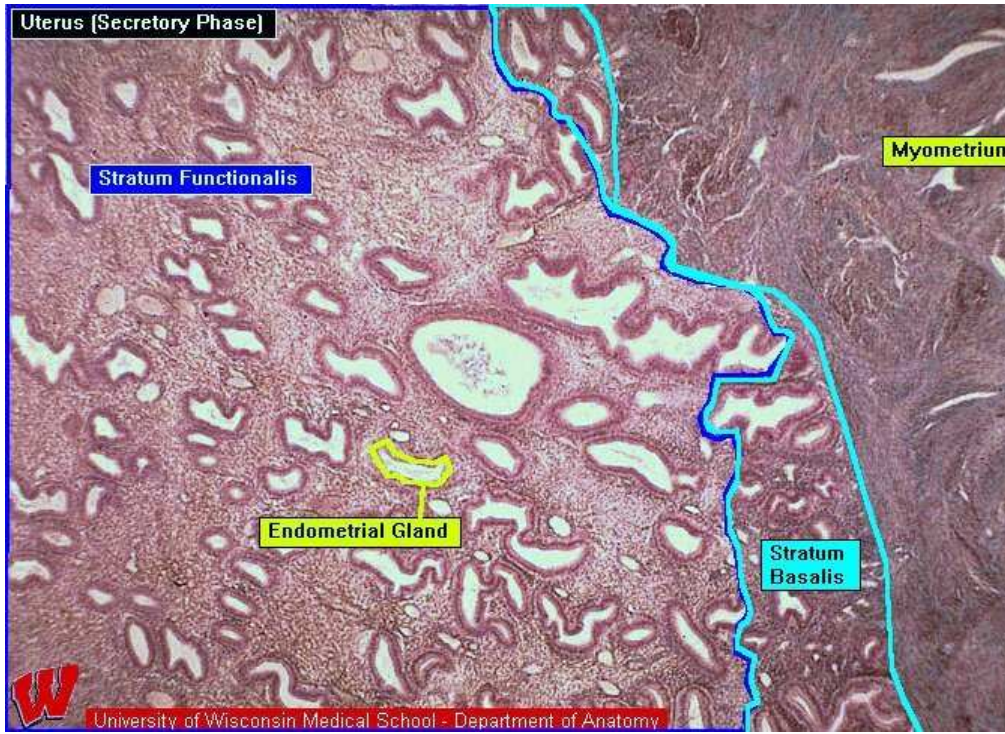
Embriyonun büyüdüğü ve geliştiği organdır. Histolojik olarak 3 tabakadan oluşur:

- 1) Dış tabaka: Perimetriyum adı verilir.
- 2) Orta tabaka: Miyometriyum denir ve kalın bir düz kas tabakasıdır.
- 3) İç tabaka: Endometriyum denilen çok özel ve önemli bir tabakadır.

2.1.2.2.1. Perimetriyum: İnce bir bağ dokusu ile desteklenmiş, tek sıra mezotel hücrelerinden ibarettir (29). Uterus gövdesinin arka kısmı ve fundus bu şekilde bir seroza tabakası ile çevrilmiştir. Uterus ön kısmının alt yarısı ise bağ dokusundan oluşan adventisya ile çevre dokulara tutunur (30,31).

2.1.2.2.2. Miyometriyum: Uterusun miyometriyumdaki 3 muskuler tabakası, 3 düz kas tabakasını içerir. En içte longitudinal seyirli, ortada sirküler ve oblik, dışta ise longitudinal seyirli düz kas tabakalarından oluşmuştur (Şekil 2.3.). Damarlanma açısından zengin orta tabaka kas liflerinin sirküler döşenmesine karşın, en iç ve en dıştaki tabaka uzunlamasına seyredir. Bu damardan zengin kısım, “stratum vaskulare” denilen arkuat arterlerin bulunduğu bölgedir. Perimetriyumun hemen altında yer alan ve uzunlamasına seyirli kas liflerinden oluşan ince dış tabaka ise “stratum supravaskulare” adını alır. Uterus servikse doğru daralır ve kas dokusu yerini fibröz bağ dokusuna

bırakır. Servikte miyometriyum, sadece az sayıda düz kas hücrelerinin olduğu ve elastik liflerin oluşturduğu sıkı düzensiz bağ dokusu içerir. Miyometriyal kas hücrelerinin sayı ve boyutu, östrojen seviyeleriyle bağlantılıdır. Östrojen olmadığında, miyometriyal kaslar atrofiye gider, bazı hücreler apoptoza yenik düşer. Gebelik döneminde, ince dış tabaka stratum supravaskulare’de, düz kas hücrelerinde sayıca artış ve büyüme izlenir. Bununla birlikte hücre sayısındaki artışın sadece düz kas hücrelerinin bölünmesinden mi, yoksa düz kas lifleri arasında diferensiyel olmamış hücrelerin farklılaşmasından mı oluştuğu açık değildir (30). Bu dönemde, düz kas hücreleri, protein salgılayan hücrelerin ve aktif kollajen sentezleyen hücrelerin ince yapı özelliklerini gösterir (29).



Şekil 2.3. Uterusun luteal (sekretuar) faz histolojik görüntüsü X20.H.E (32).

2.1.2.2.3. Endometriyum: Endometriyum, biyokimyasal faktörlerin çoğunun üretildiği ve damarsal yapı olarak değişen derecelerde kanlanan karmaşık bir dokudur. İmplantasyon boyunca endometriyumun kalitesinin anlaşılması için, steroid bağımlı mikroskopik görüntüler, noninvaziv endometriyal morfoloji ve kalınlık gibi makroskopik kriterler vardır. Ancak halen bu kriterler subjektif olup tartışılmaktadır (33).

Endometriyum; basit silindirik epitel ve lamina proprianın oluşturduğu, uterusun mukozal dökemesidir. Epitel; silyasız sekretuar silindirik hücreler ve silyalı hücrelerden oluşur (30). Menarştan önce, uterusun silindirik epiteli silyalıdır, fakat sonra hücrelerin çoğu silyaya sahip değildir (34). Lamina propriada, miyometriyuma kadar uzanan kıvrımlı basit tübüler bezler yerleşmiştir (30). Bezler arasında gevşek bağ dokusu olan stroma yer alır. Epitel, yüksek derecede hücresel ve çok sayıda kan damarı içeren bir stromaya dayanır. Mezenkim dokusuna benzeyen, sıkı düzensiz bağ dokusu çok sayıda yıldız şekilli mezenşimal hücreler, makrofajlar, lenfosit ve granüler lökositleri içeren, retiküler liflerden zengin özel bir bağ dokusudur. Pubertenin başlamasından menopoza kadar endometriyum periyodik, morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler gösterir. Ovaryumların sekretuar aktivitesine bağlı olarak 28 gün ara ile tekrarlanan bu değişiklikler “menstrual sıklüs” adını alır ve çeşitli hormonlarla kontrol edilir. Endometriyum 2 tabaka içerir (32).

- 1) Fonksiyonel tabaka; menstruasyonla atılan, kalın, yüzeyel tabakadır.
- 2) Bazal tabaka; derinde dar bir tabaka olup, menstrual sıklüs boyunca fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlayan tabakadır (30,31).

2.2. MENSTRUAL SIKLÜS HİSTOFİZYOLOJİSİ

İnsanda menstrual sıklüs, menarş ile başlamakta, menopoza kadar devam etmektedir. Bu süre içerisinde kadınlarda endometriyumun yüzeyel fonksiyonel tabakası menstrual sıklüs boyunca düzenli bir değişikliğe uğrar. Bu değişim aynı zamanda ovaryumda follüküllerin gelişmeye başladığının ve ovumu oluşturduğunun göstergesidir. Hipotalamus, gonadotropin tetikleyici hormon salgısı ile hipofizden Follikül Stimülant Hormon (FSH) ve Luteinizan Hormon’ların (LH) serbestleşmesine neden olur. Bu hormonlar da ovaryum follüküllerinden salınan östrojen, progesteron hormonları ile follüküllerin büyüme ve gelişimini ve aynı zamanda uterinal sıklüsün devamlılığını sağlar (35,36). Klinik çalışmalara göre ortalama 28 gün olan sıklüs uzunluğu, normalde 25 ile 35 gün arasında değişiklik gösterir. Tüm doğurgan yaşam süresince az değişiklik gösteren bu süre 36-40 yaş arasında kısaltmaya başlar. Bunun nedeni follüküler faz uzunluğundaki değişikliklerdir. Luteal faz, sıklüslerin %90-95’inde 10-16

gün sürer. Folliküler faz süresince, folliküller günde 1-2 mm büyürken, östrojen seviyeleri artar ve endometriyum kalınlaşır (36,37).

2.2.1. Normal Menstrual Siklüs

Menstrual siklüs; endometriyumun fonksiyonel tabakasındaki gelişimsel sürecin devamlılığıdır. Hipofiz ön lobunun uyarımı altındaki ovaryum hormonlarının (östrojen ve progesteron) etkisi endometriyumun menstrual siklüs esnasında döngüsel-yapısal değişimlere girmesine sebep olur. Pratik olarak menstrual siklüsün başlangıcı, menstrual kanamanın görüldüğü gün olarak alınır. Menstrual siklüs için birbiri ardına devam eden üç faz tanımlanmıştır ve bu fazlarda birinden diğerine ani değişiklikler olmaz (3,31).

2.2.1.1. Proliferatif (Folliküler) Faz: Menstrual fazdan sonra, uterus mukozası bezlerin bazal kısımlarını içeren küçük bir bağ dokusu tabakasından ve az sayıda spiral arterlerden ibarettir ve yaklaşık 1 mm kalınlıktadır. Östrojenlerin etkisiyle proliferatif faz başlar. Stratum bazaledeki stromal, endotelyal ve epitelyal hücreler hızla prolifer olmaya başlarlar ve çeşitli değişiklikler gösterirler:

Bezlerin bazal kısmındaki epitelyal hücreler, bezleri yeniden oluşturur ve endometriyal yüzeyi örtmek için göç ederler. Tüm proliferatif faz boyunca hücresel çoğalma devam eder. Böylece hem bezler hem de endometriyumun yüzey epiteli yenilenir. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de çoğalırlar, kollajen ve temel madde sentezi yaparlar, lamina propria içinde temel madde birikir. Bu durum endometriyumun bir bütün olarak büyümesine sebep olur. Spiral arterler, endometriyumu yenilemek üzere uzarlar. Bu arterler sadece hafif kıvrımlıdır ve endometriyumun üst üçte birine uzanmazlar. Proliferatif faz, ovulasyon sonrası güne kadar sürer, 28 günlük siklüsün 14 gününe kadar devam eder. Bu fazın sonunda endometriyum yaklaşık 3 mm kalınlığa ulaşır. Bezler, dar lümenli ve nisbeten düzdür, hafif dalgalı görüntüdedir. Epitelyal hücrelerin bazal kısımlarında glikojen birikimi vardır. Rutin histolojik doku takip aşamalarında, birikim olan bölgelerde glikojenin erimesi sonucu, bazal sitoplazmada boşluk görüntüsü oluşur (3). Bu fazın daha sonraki aşamalarında östrojen seviyesinin yükselmeye devam etmesi ile bezler kısmen kıvrıntılı olurken lümenleri de genişler.

Endometriyal bezlerde süren mitotik aktiviteyle silindirik hücreler, hücre yığınları oluşturduğundan, yalancı çok katlı görünüm alabilirler. Ovulasyon genellikle siklusun 14-16. günleri arasında gerçekleşir ve hipofizden salınan LH hormonu bu dönemde maksimum seviyededir (35).

2.2.1.2. Sekretuar (Luteal) Faz: Fonksiyonel tabakada progesteronun etkisi altında ovulasyondan sonra 1. veya 2. günde başlar. Endometriyum ödemli hale geçer ve yaklaşık 5-6 mm kalınlığa ulaşabilir. Bezler genişler ve tirbuşon gibi helezonik şekiller oluşturur (3). Endometriyal bez hücrelerinin lümeneye bakan yüzeylerindeki supranükleer salgı vakuollerinin görünümü belirgindir. Salgı materyali apokrin salgılama ile bez lümenine verilir. Bez hücrelerinin lümenal yüzeyleri düzensizleşir ve bozuk bir görünüm alır. Bezler kıvrıntılı hal alır ve lümenleri salgı ile genişler. İmplantasyon gerçekleşme ihtimalinde gelişmeyi desteklemek üzere, bez epitelinin ürettiği besleyici değeri yüksek mukoid sıvı ve özellikle de glikojene, ihtiyaç duyulur. Mitoz nadirdir, epitelyal hücrelerin hipertrofisi, damarlanma artışı ve endometriyumun ödemli hal aldığı gözlenir. Spiral arterler, uzar ve kıvrımlı hale gelir, endometriyum yüzeyinin yakınlarına kadar ulaşır. Östrojen ve progesteronun stromal hücreler üzerine etkisi, onların desidual hücrelere değişimini sağlamaktadır. Desidual reaksiyon, stromal hücrelerin geniş soluk renkli ve glikojenden zengin hücrelere dönüşümüyle sonuçlanır. Bu dönüşüm için en önemli uyarı, blastosistin implantasyonudur. Stromal hücrelerin kesin fonksiyonları bilinmemesine rağmen, embriyonun beslenmesi için elverişli bir çevre sağladıkları ve gebeliğin sonunda oluşturdukları özelleşmiş tabaka sayesinde, uterin duvardan plasentanın ayrılmasını kolaylaştırdıkları açıktır (3,35). Luteal fazda korpus luteum tarafından salgılanan progesteron hormon miktarı önemlidir. Progesteron miyometriyumun düz kas hücrelerinde kontraksiyonu inhibe eder, aksi halde embriyonun implantasyonunu tehlikeye sokabilir. Bu faz 16. günden 25 ve daha sonraki günlere kadar devam eder (35,38). Sekretuar fazın sonlarında endometriyumda 3 farklı bölge izlenmektedir:

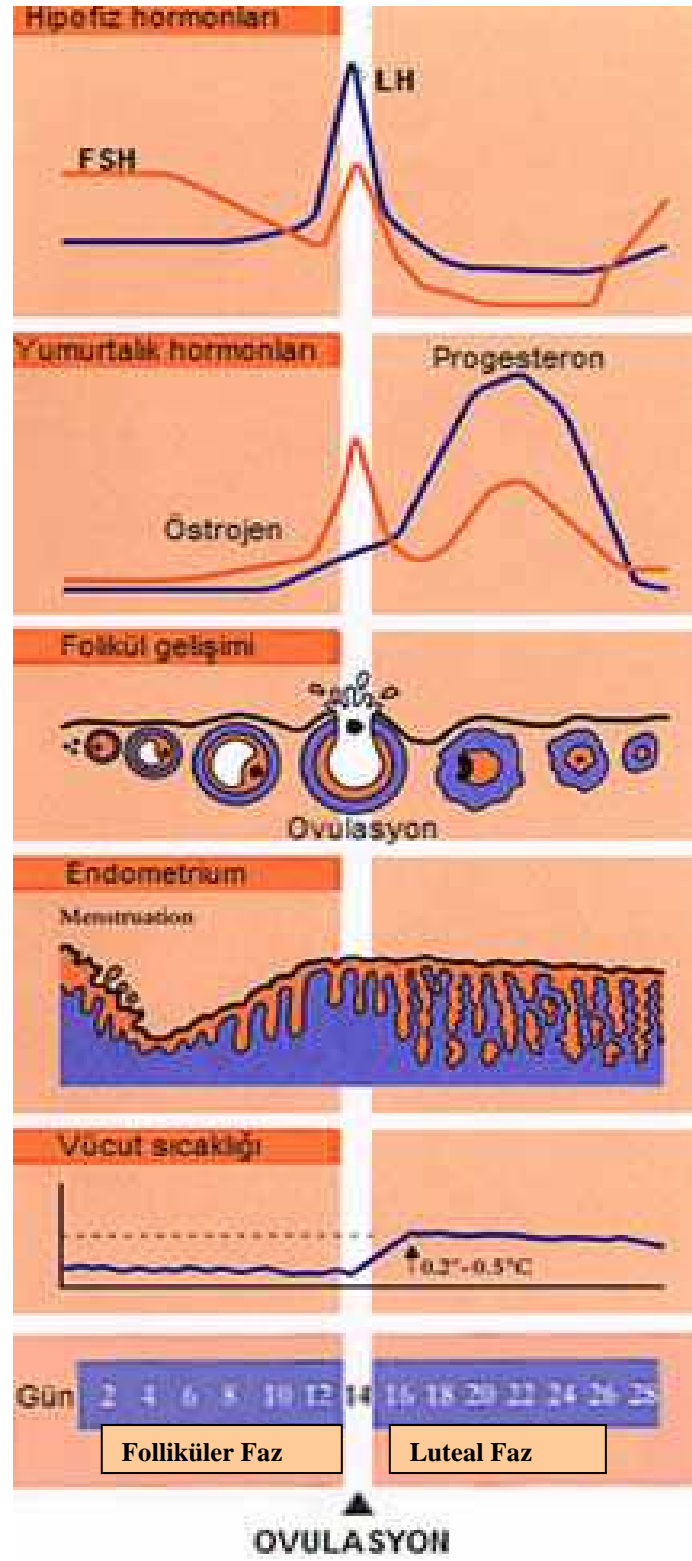
Kompakt tabaka: Hafif ödemli olan, yüzeye yakın ince bölümdür. Bezlerin düz boyun kısımlarını içerir.

Spongiyoz tabaka: Yoğun ödemli olan lamina propriyanın bağ dokusu ile birbirinden ayrılmış kıvrımlı bezleri içerir. Kompakt ve spongiyoz tabaka birlikte fonksiyonel tabaka olarak isimlendirilir. Bu iki bölüm menstruasyon sırasında atılan bölümlerdir.

Bazal tabaka: Bezlerin alt bölümlerini içeren ince tabakadır. Siklik değişime en az uğrayan bu bölüm, menstruasyonla atılmayan doğurucu tabakadır.

Fertilizasyon gerçekleşmez ise korpus luteum 10 gün hormon üretmeye devam eder. İskemik dönem progesteron seviyesinde düşmeye bağlı olarak oluşan, menstruasyondan hemen önceki kısa süreli dönemdir. Fonksiyonel tabakada, spiral arterlerde oluşan ani büzüşmeye bağlı olarak beslenme bozukluğu gelişir. Bunun sonunda endometriyumda solukluk ve büzüşme izlenir. Yoğunlaşan stromada ise lökosit infiltrasyonu meydana gelir (31).

2.2.1.3. Menstrual Faz: Fertilizasyon gerçekleşmez ise uterustan kanama oluşur ve menstruasyon başlar. Korpus luteumun fonksiyonunun, yaklaşık 14 gün sonra kendiliğinden durması sonucunda östrojen ve progesteron seviyeleri azalır (Şekil 2.4). Bu hormonların etkisiyle gelişmiş olan endometriyumda gerileme başlar ve endometriyum kısmi olarak dökülür. Kanamadan önceki 2 gün endometriyumun fonksiyonel tabakasında, spiral arterlerin duvarları aralıklı olarak kasılarak kan akımı engellenir. Oluşan iskemi endometriyumun fonksiyonel tabakasının nekrozuna neden olur. Kıvrımlı arterlerde çok kısa süre bir kez dilatasyon oluşur ancak yine de önceki olaylar nedeniyle damarlar zayıf düşer. Kasılan damarların yukarısında bulunan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Damar duvarlarındaki parçalanma sonucunda açığa çıkan kana, nekrotik endometriyum dokusu ve bezlerin sekresyonu eklenir. Endometriyum kısmen ayrılmış bir hale gelir. Dökülen miktar kadınlar arasında farklılık gösterir, hatta aynı kadında farklı dönemlerde bile değişkenlik gösterir. Endometriyumun tüm fonksiyonel tabakası dökülse de, bu süreç 3-4 gün devam eder. Normal bir menstrual periyotta, bazı kadınlarda daha çok olmasına rağmen, yaklaşık 35 ml kan kaybedilir. Menstrual fazın sonunda endometriyumdan geriye, endometriyum bezlerinin bazal uçlarını içeren bazal tabaka kalır. Buradan bez hücrelerinin çoğalması ve bunların yüzeye göç etmeleriyle proliferatif faz ve siklus tekrar başlar (30,38).



Şekil 2.4. Menstrual siklus boyunca oluşan değişikliklerin şematize görüntüsü (39).

2.3. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ (YÜT)

2.3.1. Fertilizasyon

Fertilizasyon, tuba uterinaya atılan haploid sayıda kromozom içeren metafaz II ovumun, yine haploid sayıda kromozom içeren spermium ile birleşmesi olayıdır (40). Over, silyalı silindirik epitel ile döşeli tuba uterinanın dalgalanan fimbriyelerine kapalıdır. Ancak peritoneal sıvı, ovaryan yüzeyi boydan boya geçer ve tuba uterinanın infundibular kısmına ovule olan ovumun taşınmasını sağlar. Oositler Graaf follikülünden serbest kaldıktan sonra 12 saat içinde fertilize olabilir. Koitus, prostatik üretradan seminal sıvının salınımını uyarır ve vaginanın arka forniksine boşalmasını sağlar (41). Fertilizasyondan önce spermilerin epididimal bir olgunluk süreci geçirmeleri gerekmektedir. Bu süreç “epididimal maturasyon” olarak adlandırılmaktadır. Akrozom antijenlerinin sunulabilir hale gelmesi için akrozom membranının ortadan kalkması gerekmektedir. Doğal yollarla servikal mukus içerisinde gerçekleşen bu olay “kapasitasyon” olarak adlandırılmaktadır. Her iki olay da internal fertilizasyona uygun evrimsel bir adaptasyon süreci olarak değerlendirilebilir. Kapasitasyon ısı bağımlı bir olay olup 37-39°C vücut ısısı gerektirir. Kapasitasyon sonucunda sperm yüzeyindeki glikoproteinler ayrılarak reseptörler ortaya çıkmaktadır. Bu olayda arylsulfataz, fucosidase, taurine gibi enzimler rol almaktadır. Sperm hareketliliğini tuba uterinanın mekanik özellikleri dışında diğer fizyolojik özellikler de belirleyebilir. Yapılan çalışmalarda tuba uterina epitelinin gerek sperm motilitesi gerekse embriyo gelişiminden sorumlu glikoprotein yapısında bazı faktörler salgıladığı gösterilmiştir. Leukemia inhibitory factor (LIF) bunlar içinde en önemli örneklerden biridir. Yapılan çalışmalarda tuba uterina epitelinin LIF’ü, sürekli ve yüksek konsantrasyonda salgıladığını gösterilmiştir (40).

Korona radiatadaki folliküler hücrelerin birbirinden ayrılması için sadece spermin akrozomundan salınan hyaluronidaz enzim aktivitesi yeterli değildir. Tubal mukozal enzimler de hyaluronidaza yardım eder (42). Tuba uterina ampullasına gelen spermilerin oositle birleşmesinde rol oynayan üç temel düzenek vardır. Bunlar; spermin vitellin tabakaya tutunması, akrozom reaksiyonu ve membranların kaynaşması şeklinde sıralanabilir. Normal fertilizasyon sürecini takiben ilk 24 saat içerisinde embriyoda iki

adet pronukleus görülür. Pronukleusların görülmesi laboratuvar ortamında fertilizasyonun morfolojik bir göstergesidir (40).

Pronukleusların zarları parçalanır, kromozomlar kalınlaşır ve mitotik hücre bölünmesi için düzenlenir. Fertilize olmuş oosit veya zigot tek hücreli bir embriyodur. Her bir pronukleustaki 23 kromozomun birleşmesiyle 46 kromozumlu bir zigot oluşur (3). İmmün sistemi baskılayıcı bir protein olan erken gebelik faktörü (EGF), trofoblastik hücrelerden salgılanır ve fertilizasyondan 24-48 saat sonra anne serumunda ortaya çıkar. EGF, gelişimin ilk 10 günündeki gebelik testlerinin en önemlisidir (43).

2.3.2. YÜT'nin Başarısı

1978 yılında bildirilen ilk başarılı IVF gebeliğinden sonra IVF-ET uygulamaları her geçen gün giderek artan bir kullanım alanı bulmakta ve infertilite tedavisi için YÜT uygulamaları yaygınlaşmaktadır. Ancak, günümüzde yeni tekniklerin ve imkanların gelişmesine rağmen YÜT başarı oranları halen istenilen seviyede değildir ve literatürde %5-60 gibi çok değişik oranlar bildirilmektedir (44). Bu konuda her geçen gün yeni parametreler değerlendirmeye alınmakta ve bazılarının gerçekten etkisi kanıtlanırken, bazılarının da etkileri tartışılmaya açık kalmaktadır.

Ciddi tubal hasar, ciddi erkek faktörü gibi diğer tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda YÜT ilk tedavi olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu infertilite tedavilerinin başarısız olduğu açıklanamayan infertilite olgularında, son seçenek olarak YÜT kullanılabilir. Fonksiyonel uterusu bulunmayan hastalarda YÜT, taşıyıcı annelere embriyo transferi yapılarak kişinin kendi genetik devamlılığına olanak sağlar. Kalıtsal genetik hastalığı olan çiftler YÜT ve Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) adayı olabilirler (45).

2.3.3. İn Vitro Fertilizasyon

Çiftlerin ortalama %15'i infertilite problemiyle karşılaşmaktadır. Bu çiftlerde, %50 oranında kadın faktörü, % 40 oranında primer erkek faktörü ve %10-15 oranında açıklanamayan infertilite söz konusudur (44). YÜT'den biri olan IVF uygulamaları ilk olarak tamir edilemeyen tubal hasarı olan çiftlere yardımcı olmak adına geliştirilmiş ise de günümüzde pek çok endikasyon için kullanılmaktadır. IVF, laboratuvar koşullarında overlerden toplanıp, fertilize edilen oositten oluşan embriyonun uterus içerisine yerleştirildiği bir tekniktir. IVF endikasyonları olarak, tubal faktör, endometriozis, erkek faktörü, açıklanamayan infertilite ve immünolojik infertilite sıralanabilir (45,46).

Bunun yanında; over rezervi normal ancak müllerian agenezi, ciddi intrauterin yapışıklık, histerektomi geçirme gibi uterin problemi olan çiftlerde de taşıyıcı annelik sistemi ile kendi oositlerinden yapılan YÜT uygulamaları ile gebelik elde edilebilmektedir. Bu gün için IVF uygulamalarında %30 oranında canlı doğum oranı elde edilebilmektedir (45,46).

IVF uygulamalarında başarıyı etkileyen önemli faktörlerden biri ileri anne yaşıdır. Ovaryan cevabın azalması, gelişen follikül ve elde edilen oosit sayılarının yeterli ve uygun kalitede olmaması ve oositlerde kromozomal anomali riskinin artışı yaşa bağlı olarak ortaya çıkan olumsuzluklardır. Özellikle, 35 yaş üstü olgularda gebelik oranları bu sebeplerden dolayı dramatik olarak düşmektedir. Örneğin, 40 yaş altında 3'den fazla follikülü olan kadınlarda canlı doğum oranlarının %32'lerden, 40 yaş üzerinde 3'den az follikülü olanlarda %4'lere düşmesine neden olmaktadır (47).

2.4. EMBRİYO İMPLANTASYONU

2.4.1. İmplantasyonun Moleküler Mekanizması

Doğal sıklıslerde, gelişen embriyo ve olgunlaşan endometriyum arasında kendiliğinden oluşan bir uyum vardır. IVF sıklıslerinde azalmış implantasyon oranlarından, ovo-endometriyal uyumsuzluk sorumludur. Östrojen ve progesteronun fizyolojik rolünün birçok taslağı çıkarılmasına rağmen, bu moleküler ağ ve faaliyetlerinin çoğu henüz aydınlatılabilmış değildir. Bu konuda belirlenen moleküller;

sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazları (MMP), adezyon molekülleri, ekstrasellüler matriks komponentleri ve homeoboks element içeren genlerdir (48).

Endometriyumda çeşitli yapısal, hücrel ve moleküler olaylar dizisi implantasyon penceresi ile kontrol edilir ve bu durumun sonucunda endometriyal reseptiviteyi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilir (49). Blastosist ve endometriyal epitelin adeziv etkileşimin ve blastosistin stroma içine penetrasyonu için gerekli olan moleküler olayların aynı anda ortaya çıkması gerekmektedir. Blastosistler, endometriyal epitel ile sadece implantasyonun pencere döneminde etkileşime girebilirler (50). Bunu belirleyen ise, korpus luteumdan salgılanan progesteronun endometriyumdaki etkileri ve bunları takip eden gebeliğin 4'üncü günündeki küçük bir östrojen pigidir (49,51).

Çözünebilir HB-EGF, blastosist aşamasına ulaşma ve implantasyon yüzdesini artırmaktadır. İnsan endometriyumu HB-EGF mRNA'sında menstrual devreden bağımsız değişiklikler gözlenir. Bu madde, luteal evrede artmakta, implantasyondan hemen önce en yüksek olmakta ve ardından düşmektedir. Protein ise stromanın çoğalma safhasında görülmekte, fakat orta luteal fazda endometriyal epitelin apikal yüzeyinde ortaya çıkmaktadır. İnsan HB-EGF'sinin implantasyondaki rolünün, farelerdeki benzerliği olasıdır (50,52).

Prostaglandin ve prostasiklin (PGI-2) sentezinde kilit bir enzim olan siklooksijenaz 2 (COX-2) erken implantasyon mekanizmaları için gereken bir dizi sinyalleşme yollarında önemlidir (53). COX-2 den yoksun dişilere, PGI-2 eklenmesi, desidual reaksiyon ve implantasyonun meydana gelmesinde çok etkili olmuştur. Bu durumda hücre-matriks ve hücre-hücre yapışmasını içeren önemli fizyolojik olayların çoğunda PGI-2'nin; bir COX-2 ürünü olduğu ve implantasyon için gerekli uterin stromal değişikliklerin meydana gelmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (52).

İntegrinler; transmembran glikoproteini olup, embriyolojik gelişmeye katılır. $\alpha_5\beta_3$ integrin ve onun ligandı osteopontin, trofoblastla ilk etkileşimde, endometriyum lümen epitel yüzeyinden immünohistokimya ile pozitif tesbit edilmiştir. Epitelyal lokalizasyon ve ekspresyonuna bakarak $\alpha_5\beta_3$ 'ün, embriyonik tutunma için potansiyel bir reseptör olabileceği söylenebilir (54). İntegrinler, en iyi çalışılan adezyon grubudur, β_3 ekspresyonu; bir IVF programının başarısını tahmin etmek için faydalı olabilir (55). İntegrin $\alpha_5\beta_3$ ekspresyonunun artması, endometriyal reseptivite için bir işaretidir. Literatüre bakılınca, $\alpha_5\beta_3$ integrin, klinik için oldukça umut vericidir (56). İntegrin ve

pinopodların ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, farklı hormonal stimülasyon protokolleriyle değişmez (57). Selektinler; lökosit transendotelial trafiğinde çok önemlidir. L-selektin, damarlanmada lökositlerin yapışmasında gereklidir. Kadherinler; kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon mekanizmasından sorumlu glikoproteinlerin bir grubudur. Menstrual siklusun özellikle orta-sekretuar fazında insan endometriyal epitelinde progesteronla kalsitonin salınımı uyarılır. Kalsitonin implantasyonda potansiyel bir düzenleyicidir. Artmış hücre içi kalsiyum salınımını izleyen, endometriyal kalsitonin artışı, E-kadherin ekspresyonunu düzenleyebilir ve blastosist yerleşiminde etkili olabilir. İmmünglobulinler; endometriyumun hem stroma hemde epitelyal hücrelerinden salındıkları için, patofizyolojide önemlidirler. İntersellüler Adezyon Molekülü-1; iki farklı seviyede aktive olarak "endometriozis" patogenezinde rol oynar. Bu molekülün yüksek yapışma potansiyeli de, endometriozisin sık tekrarlama nedenini açıklar (58). Musinler (MUC); adezyon sağlayan moleküllerin aksine anti-adeziv etkili bir gruptur. Endometriyal musinlerin salınımı ilginçtir. Musin ailesinden olan MUC1, embriyo implantasyon için doğru yer ve doğru zamanı bulana kadar embriyoyu kovan bir moleküldür. Bu durumda lokal aktivasyon mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Embriyonun, MUC1 engelini aşmak için, eksprese ettiği tetikleyici faktörler olabilir (59). Sitokinler; çok sayıda fizyolojik role sahip küçük multifonksiyonel glikoproteinlerdir. Bu moleküllerin davranışları, vücuttaki implantasyon ve immün fonksiyonla ilgili çoğu süreçle bağlantılıdır. Sitokinler ve kimokinler, implantasyon bölgesinde trofoblast farklılaşmasında ve trafiğinde rol oynarlar, implantasyon ve plasentasyonda önemli bir potansiyele sahiptirler (60).

2.4.2. İmplantasyon Fizyolojisi

İmplantasyon fizyolojisinin düzenlenmesinde steroid hormonların yeri büyüktür. Dolayısıyla endometriyumun morfolojik değişiklikleri de steroid hormonların etkisi altındadır. Doğal bir menstrual siklusun folliküler fazda salgılanmaya başlayan progesteronun etkisiyle sekretuar değişiklikler gözlenir. İlk sekretuar değişiklikler siklusun 15-16. günlerinde başlar ve başarılı bir implantasyonun oluşması için gerekli olan uterin reseptivite dönemine kadar sürer (61). Uzun zamandır steroid hormonların implantasyonun fizyolojisini ne düzeyde etkilediği sorusuna yanıt bulmak için birçok

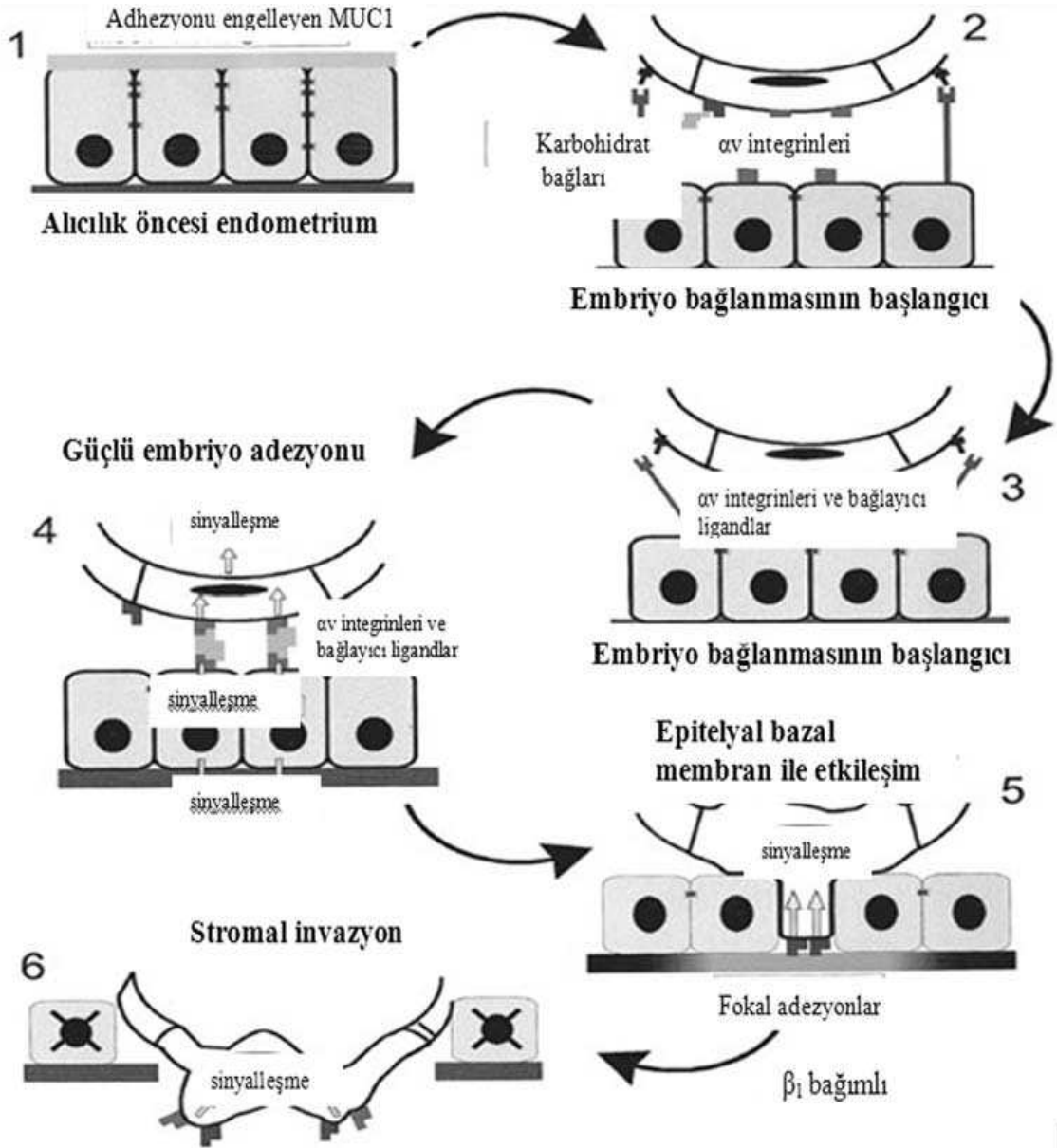
çalışma yapılmıştır. Ancak çoğunlukla immünohistokimyasal yönde yapılan bu araştırmaları ince yapı düzeyinde destekleyen çalışmalar oldukça yetersiz kalmıştır. Östrojenin endometriyumdaki östrojen ve progesteron reseptörlerini (ER, PR) arttırdığı ve progesteronun ise luteal fazda ER ve PR'lerini azalttığı bilinmektedir (62-64). PR'lerin kaybolmaması implantasyon penceresinin gecikmesine yol açmakta ve bu durum ekzojen progesteron verilmesiyle düzeltilebilmektedir (65). ER ve PR'lerinin siklüsün 20. gününden sonra kaybolmasıyla overin etkisinin azalması, stromanın ve implante olacak embriyonun endometriyumda yaptıkları değişikliklerin implantasyonda önemli rol oynadıklarını düşündürmektedir. Mekanizma ne olursa olsun ER ve PR'lerinin implantasyonun başlamasında kritik bir rolü olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda steroid hormonların etkisinin endometriyal morfoloji üzerine direk etkileri de yine pinopodlar ve diğer yapılar değerlendirilerek gözlenmiştir. Simon ve arkadaşları son zamanlarda implantasyon üzerine östrojenin etkisi için follikül stimule eden hormon (FSH) ile step-down rejimin uygulanmasını önermişlerdir. Böylece folliküllerde yüksek düzeyde yanıt oluşup, implantasyon öncesi dönemde östrodiol seviyeleri azalır ve endometriyal reseptivite gelişebilir (66).

2.4.3. Endometriyal Reseptivite

Endometriyum, puberteden menopoza kadar olan süre içinde belirli periyodlarla en büyük değişikliğe uğrayan tabakadır ve üreme fizyolojisinde çok önemli bir yere sahiptir. Çeşitli deneysel çalışmalarda, endometriyumun implantasyon için hazırlandığı gösterilmiş ve bu dönem implantasyonun pencere dönemi olarak isimlendirilmiştir. Endometriyumdaki çeşitli yapısal, hücrel ve moleküler olaylar implantasyon penceresini oluşturur ve böylece endometriyal kabul edişi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkar (67-69).

İmplantasyon başarısızlığı; IVF gebelik oranlarında başarıyı etkileyen en büyük engellerden biridir (70,71). Çok sayıda protein ve moleküller endometriyal gelişmeyi etkileyebilir, ancak onların implantasyon sürecine katkısı ve klinik kullanıma geçişi, yeterince anlaşılamamıştır. İnsan endometriyumu fertilitate belirleyici bir faktör olarak düşünülebilir (72). İnsan embriyosunun implantasyon süreci, endometriyum ve embriyo arasında uygun bir diyaloga ihtiyaç duyar. Maternal açıdan, reseptif endometriyum bir

ön koşul gibidir (73). İmplantasyon; blastosist ve endometriyal tabakalar arasında kendiliğinden gelişen dinamik bir süreç olmasına rağmen, implantasyon penceresi boyunca endometriyumun hazırlanması tamamen maternal kaynaklıdır. Aksine sağlıklı kadınların infertilitesinin en büyük sebebi, üreme tıbbının henüz çözümlenememiş olan implantasyon başarısızlığıdır. Gerçekte, IVF'de implantasyon oranı %25-30 civarındadır (74). Yetersiz endometriyal reseptivite, implantasyon başarısızlığının yaklaşık üçte ikisinden sorumludur (75). IVF'de tekrarlayan implantasyon başarısızlığı kompleks bir konudur ve tamamen anlaşılammıştır (76). Embriyonik anöploidi, uterin kavite anomalileri ve değişmiş endometriyal reseptivite potansiyel sebepler olarak rapor edilmiştir (77). Embriyo, transfer öncesi morfolojik olarak bazı kriterlere uygun olmalıdır. Ancak buna rağmen anöploidi olabilir ve implantasyonu etkileyebilir (56). Transformasyon ve stromal desidualizasyon oluşan sekretuar faz endometriyumunda belirleyici hormon progesteron iken, proliferatif fazın dominant hormonu östrojendir (78). İmplantasyonda; ovaryan steroidlere yanıt olarak oluşan uterin duyarlılık: prereseptif, reseptif ve nonreseptif şeklinde üç fazda programlanır. Bilindiği gibi blastosist, endometriyumun benzersiz morfolojik ve moleküler değişimleriyle karakterize reseptif fazda implante olur (79,80).



Şekil 2.5. Embriyonun tutunma ve invazyonu. “Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation”adlı makaleden alınmıştır (80).

2.4.4. Pinopodlar

Pinopodlar; implantasyona hazırlanan endometriyumun yüzey epitelinde görülen en belirgin morfolojik parametrelerden biridir. Endometriyum yüzey epitelinde pinopod oluşumu ve miktarı, implantasyon ve gebelik oranlarını doğru orantılı olarak etkileyecek önemli bir kriterdir (13). Öncelikle blastosistin endometriyuma implante olabilmesi için çeşitli aşamalardan geçmesi gerekmektedir. Pinopodlar, endometriyumun blastosistle ilk karşılaştığı yapılar olabilir. Endometriyal dokunun hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak değişimleri sonucu oluşan bu yapılarla blastosist arasında özel etkileşimler olduğu düşünülmektedir (80,81). Pinopodların sayı olarak en çok, görüntü olarak en büyük, yer yer kubbemsi ve dolgun yapılar olarak görüldüğü dönemi, “implantasyon penceresi” olarak değerlendirilmiştir (82). Pinopodların, implantasyon bölgesindeki endometriyal sıvı üzerinde etkili olabilecekleri böylece adezyon ve invazyon sürecini kolaylaştırabilecekleri üzerinde durulmaktadır (83). Hücre uç kısımlarının içleri blastosisti kabul edip besleyecek mukoid özellikte bir materyalle dolu olan çok sayıda vakuol içermesi sonucu hücre apikalinin değişime uğrayarak pinopod denilen hücre uzantılarını oluşturduğu üzerinde durulmuştur. Bu dönemde mikrovillüsler azalırken pinopodların arttığı gözlenmiştir. Ratlarda reseptivitenin olduğu dönem boyunca uterin kaviteye uzanan epitelyal hücrelerin mikrovillüslerini kaybettiği ve yeni membran uzantıları geliştiği gözlenmiştir (84,85).

Pinopodlar, ışık mikroskopik mikrograflarda dahi kolaylıkla gözlenebilir (86). Ancak ışık mikroskopunda diğer yapılar pinopodlar için yanıltıcı olabilir (87). Pinopodlar, embriyonun endometriyuma yaklaşması ve tutunabilmesi aşamasında çeşitli moleküllerin ekspresyonunu gerçekleştirmektedir ve bu durumu açıklayan bazı araştırmalar yapılmaya devam etmektedir. Taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) tesbit edilen pinopodların yüzeyinde, immünohistokimyasal boyama ve konfokal mikroskopi ile heparin bağlayan epidermal büyüme faktörün (HB-EGF) varlığı bulunmuştur. HB-EGF’in transmembran formu hücre adezyon ve göçüyle bağlantılıdır ve muhtemelen pinopod transmembranı içinde ortaya çıkar (88,89). İleriki yıllarda HB-EGF’nin immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi implantasyon penceresi için bir markır olabilir (85). Pinopod ekspresyonunda ilerleme veya gerilemenin oluşması hormonal tedaviye ve bireyin kendine özel yanıtına bağlıdır (13).

Orta luteal fazdan geç luteal faz boyunca pinopodlara rastlanabilir, ancak pinopodlardan ziyade endometriyal apikal yüzeyde morfolojik değişikliklerin oluşmasının büyük önem taşıdığını belirten araştırmacılar vardır (90). Elektron mikroskopla ince yapısı incelenen pinopodların yapıları ve görüntüleri progesteron düzeylerine bağlıdır (91). Menstrual siklus boyunca pinopodların bir ekspresyon düzeneği meydana getirmesi bu oluşumların implantasyon markırı olabileceği fikrini desteklemektedir. Endometriyumda blastosist implantasyonuna hazırlanmak üzere ovaryan hormonların etkisi altında bazı değişiklikler oluşur (92). Blastosist implantasyonu için uterin reseptiviteyi oluşturan hücrel ve moleküler olayların rat ve farelerde progesteron ve östrojen tedavisinin etkilerine bağlı olduğu söylenmektedir. İnsan ve Rhesus maymunlarında endometriyumun sekretuar olgunlaşmasının östrojensiz, yalnızca progesteron salınımına bağlı olduğu, tek başına progesteronun implantasyonu desteklediği vurgulanmaktadır (93,94). Birçok araştırmacı da uterin reseptivite ve pinopod ekspresyonunun kesinlikle progesteron bağımlı olduğunu ve östrojenin yüksek dozunun pinopod formasyonunu ve blastosist implantasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (84,95). Yine birçok çalışma ile hormonal tedavinin uterin reseptivitenin zamanlamasını ilerletebilen veya geciktirebilen etkisi olduğu ve pinopod ekspresyonunu ve blastosist implantasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Develioğlu ve arkadaşlarının 1999 raporlarına göre histolojik tarihleme kriteri, östrojen ve progesteron reseptörü ve pinopod görüntülerinin zamanlaması ile kontrollü ovaryan stimülasyon arasında önemli bir ilişki vardır. Reseptivitenin endometriyal görüntüsünün daha erken ortaya çıktığı ve bu durumdan human koryonik gonodotropin (HCG) verilmesinden sonra artan progesteron seviyesinin sorumlu olduğu belirtilmiştir (96). Buna karşın Gonodotropin Releasing Hormon analogu (GnRH-a), östrojen ve progesteron ile Hormon Replasman Tedavisi (HRT) uygulananlarda pinopod ekspresyonunun daha geç olarak 22. gün civarında olduğu rapor edilmiştir (97). Luteal faz ortasında her 2-3 günde bir doğal ve HRT sikluslerinden alınan endometriyal örnekler, pinopod görünme zamanlaması, kadınlar arasında 5 gün kadar çeşitlilik olduğunu göstermiştir (98). Pinopodların yaşam süresi üzerine 48 saati geçmeyeceğini belirten Nikas (99) ve arkadaşları yanı sıra Acosta ve ark. (2000) siklus sonuna doğru pinopod benzeri uzantıların en az yedi gün yer aldığını rapor etmişlerdir (100).

2.4.5. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının etiyolojisi henüz aydınlatılabilmemiş değildir ve muhtemelen sorunun nedeni birden fazladır. TİB etiyolojisi uterus, endometriyum ve tuba uterinallara ait sorunlar, embriyo kusurları ve diğer etkenler olmak üzere üç grupta incelenebilir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının tanımı ardışık üç IVF/ICSI-ET siklusunda veya toplam 10 adet iyi kalitede embriyonun transferini takiben gebelik oluşmaması olarak kabul edilmektedir (101). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen başlıca faktörler arasında oosit/embriyo kalitesi ve endometriyum yer almaktadır (102). İmplantasyon başarısızlığı üreme tıbbının henüz çözülmemiş önemli bir problemi olup, bu durumdan yetersiz endometriyal reseptivitenin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (103, 75).

Endometriyumun tarihlenmesini tanımlayan bir çalışma Noyes ve arkadaşları (104) tarafından elli yıldan daha fazla bir zaman önce yapılmıştır. Morfolojik kriterleri gösteren bu makalenin infertilite literatüründe en çok atıf yapılan makale olması dikkat çekicidir (105). Şu an başvuru kitapları da infertil çiftlerin değerlendirilmesinde rutin olarak luteal faz endometriyal histolojinin incelenmesini tavsiye etmektedirler (61,100).

2.5. EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR

2.5.1. Endometriyal Kokültür Uygulamaları

IVF’de kullanılan in vitro kültür sistemleri, in vivo şartlara mümkün olduğunca benzer ortam koşulları sağlamayı amaçlayan sistemlerdir (17, 77, 106, 107). Bu sistemlerden sıralı, tek, kondisyonel ve kokültür sistemleri aktif olarak günümüzde kullanılmaktadır. Endometriyal kokültür sistemi ilk Barnat ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır ve bu sistemin embriyo gelişim parametrelerini iyileştirdiği ve oosit donasyonu vakalarında gebelik oranında da artış sağladığı kaydedilmiştir (107,108). Simon ve arkadaşları benzer şekilde, insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini sağlayan ve kültür ortamına embriyonik parakrin moleküllerin salınımını indükleyen endometriyal epitel hücrelerinden oluşan bir kokültür sistemi tanımlamışlardır (17). Joo B.S.ve arkadaşlarının çalışmasında ise endometriyal kokültür sisteminin embriyo gelişimini desteklemesini embriyo ve helper (destek) hücreleri arasında hücreden hücreye direkt temasın varlığına bağlı olduğu iddia edilmiştir. Ayrıca medyumlardan geriye kalan toksik zararlı maddelerin ve reaktif oksijen türlerinin kokültür hücreleri tarafından elimine edildiği ve aynı hücrelerin besleyici maddeleri kültür ortamına salarak embriyo gelişimini olumlu etkilediği gösterilmiştir (109). Rubio ve arkadaşları implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda endometriyal kokültür uygulamaları ile daha yüksek implantasyon ve gebelik oranları elde etmişlerdir (110). Kumtepe ve ark. birçok ko-kültür çalışmalarında transfer edilen embriyoların gelişmiş iç hücre kitlesi yapısına sahip olduklarını, gebelik sonuçları ve devam eden gebelik oranlarında anlamlı bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir (111).

Bununla birlikte, kokültürün etkinliğiyle ilgili karşıt görüşlerde vardır. Fabbri ve arkadaşları kokültüre alınan embriyoların uterusu transferinden sonra gebelik oranlarının gerçek artışıyla sonuçların çelişebileceğini belirtmişlerdir (112). Plachot M. ve arkadaşları; kokültür sonucunda, granüloza hücrelerinin embriyo gelişimini olumlu etkilemesine rağmen, TİB olan bireylerde gebelik oranlarında bir gelişme sağlamadığını vurgulamışlardır (113). Menezo, Urman ve Balaban ise buna ek olarak canlı blastosistleri daha kapsamlı inceleyebilmek için kokültür veya sıralı medyum kullanımı

konusundaki tercihin bugün hala tartışmalı bir konu olduğuna dikkat çekmişlerdir (77,114).

Kokültür yöntemi her ne kadar uygulaması nisbeten zor, titizlik ve tecrübe gerektiren zorlayıcı unsurlar içerse de, TİB olan vakalar için başarıyı artırdığı bilinmektedir. Embriyonun; eskiden beri kullanılmakta olan geleneksel medyumlardan oluşan besiyerleri yerine, anne endometriyumundan elde edilen otolog endometriyal dokuda kültüre edilmesinin, gebelik oranını olumlu olarak etkilediğini bildiren birçok araştırmada (13, 106, 115), otolog endometriyal kokültür tercih edilmiştir. Bazı araştırmacılar çalışmalarında kokültür hücreleri arasında ortaya çıkan etkileşimin morfolojik yansımalarını değerlendirmişlerdir (110,116-119). Daha önce kokültür sistemleriyle çalışan araştırmacıların bir kısmı insan hücreleri haricinde hücrelerle kokültür çalışmaları yapmışlardır (120-123). Daha sonra insan üreme sistemi kaynaklı olarak tuba uterina (124,125), tuba uterina-endometriyum sıralı kokültürleri (125,126), endometriyum (127,128), kümülüs-granüloza hücreleri (129-131) gibi farklı hücre grupları da kullanılmıştır.

Günümüze kadar yapılmış olan kokültür hücrelerine ait ultrastrüktürel çalışmalar, genellikle oosit granüloza hücreleri ile yapılmıştır (132). Nottola ve arkadaşları da kültüre edilmiş granüloza hücrelerinin bazı biyolojik özellikleri ve ince yapısı hakkında incelemelerde bulunmuşlardır (117,132).

2.5.2. Monolayer Endometriyal Kokültür

IVF’de kullanılan in vitro kültür koşulları her ne kadar kabul edilebilir iyi embriyo gelişim ve gebelik oranları sağlasa da bugün hala istenen yeterlilikte değildir. Bu nedenle, embriyo kalitesini geliştirmeye yönelik ileri çalışmalarda modern kokültür teknikleri kullanılmaktadır (133,134). Bu sistemlerinin en büyük avantajı, kokültür hücrelerinin ortama embriyotrofik maddeleri salması ve ortamdaki toksik maddelerin kültür medyumundan uzaklaştırmasıdır (20). Besleyici maddeler, büyüme faktörleri, sitokinler embriyotrofik faktörleri oluştururken, kültür medyumunda ortaya çıkan amonyum, serbest radikaller, ağır metaller de atılması gereken toksik ajanları oluşturmaktadır. Monolayer kokültürlerin özelliklerinden biri medyumda ortaya çıkan embriyotrofik faktörlerin hücre tipine spesifik olmamasıdır. Aynı zamanda kültür

ortamındaki zararlı elementlerin elimine edilmesi de bu hücre tiplerinin genel özelliği sayılabilir. Ayrıca monolayer kokültür hücrelerinin genel etkilerinin yanı sıra hücre tipine spesifik belirli etkileri de olabilir (135). Monolayer kokültür hücrelerinin asıl işlevi, blastosist aşamasına kadar embriyoların in vitro koşullarda kültüre edilebilmesini ve sonucunda yüksek implantasyon başarısını sağlayabilmesidir. Bu işlevini, insan embriyosunun in vitro koşullardaki metabolizmasını düzenleyerek gerçekleştirebilmektedir (136). Serum destekli medyumlarla kokültürün kıyaslandığı prospektif randomize çalışmalarda da somatik hücreler ile kokültüre edilen embriyoların blastosiste ulaşma oranlarında artış görülmüştür (137). Buna karşın, kokültür sistemleri ve geleneksel medyumlar arasında fark olmadığını belirten çalışmalar da vardır (138,139).

Her ne kadar günümüzde IVF'de kullanılan ticari kültür sistemleri in vivo koşulları sağlamaya çalışsa da, üreme sistemi hücrelerinin sekrete ettiği büyüme faktörleri ve potansiyel parakrin sinyaller yönünden eksiklerdir (108). Dinamik bir organizma olan embriyo, hem otokrin hemde çevresinden gelen parakrin sinyallere yanıt verebilir. Grup halinde kültüre edilen insan embriyolarında morfolojik karakterlerinin daha iyi geliştiği ve bu durumun, embriyolardan açığa çıkan faktörler ile sağlandığı belirtilmiştir. Embriyodan çıkan parakrin sinyallerin, endometriyal stromal hücreleri uyarak insülin benzeri bağlayıcı protein (insülin-like binding protein) sentezini uyardığı gösterilmiştir (140).

Monolayer kokültür sistemlerinde, helper hücreleri denilen farklı tipte hücreler kullanılmaktadır. Kullanılan hücrelerden biride insan endometriyal stromal hücreleridir. Bu hücrelerin in vivo ortamdaki embriyonun implantasyonunda, fizyolojik rollerinin bilinmesine rağmen, kokültür sistemlerindeki işlevsel mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (140,141).

Kokültür sistemleri birbirleriyle kıyaslandığında AECC sisteminin etik, medikal ve pratik açıdan kolaylaştırıcı özelliklerinin daha fazla olduğu söylenebilir (142). Endometriyal kokültür hücreleri, insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültüre edilebilmesini desteklemesinin yanı sıra, embriyonun parakrin salınımını da uymaktadır. Bu hücreler, β_3 integrin subünitleri gibi adeziv moleküllerin salınımını düzenleyerek endometriyal reseptivitenin gelişimini de sağlamaktadır (143,144). TİB olan kadınlarda ise, bu kültür sistemi, transfer sonrası embriyo ve endometriyum

arasında daha iyi bir uyum oluşmasını sağlayacak embriyonik genom ekspresyonunu düzenlemektedir.

IVF de blastosist transferi, implantasyon ve gebelik açısından, klivaj dönemi embriyo transferlerine göre daha başarılıdır. Bu nedenle özellikle çoğul gebelik riskini azaltmak ve gebelik şansını arttırmak için blastosist dönemi embriyo transfer stratejisi benimsenmektedir (145). AECC uygulamaları blastosiste kadar embriyonun kültüre edilebilmesini sağlaması nedeniyle tercih sebebidir. Aynı zamanda iyi kalite embriyonik gelişim sağlanarak, X veya Y bağlantılı hastalıklar ve tek gen hastalıkları için embriyo biyopsisi yapılabilmesine olanak vermektedir. Bunlar gibi birçok avantajına rağmen, endometriyal kokültürle ilgili bilinenler IVF vakalarında endometriyal reseptivite gelişiminin daha iyi anlaşılması açısından yetersizdir (142).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KOKÜLTÜR PROTOKOLÜNÜN UYGULANMASI

3.1.1. Kokültür Sisteminde Kullanılanlar Listesi

Tablo 3.1: Kokültürde Kullanılan Kimyasallar

<u>Ko-Kültür Malzemeleri</u>	<u>Marka</u>	<u>Seri-No</u>
Penisilin/Streptomisin (100X)	GIBCO	15070-063
EBSS	SIGMA	REF E2888
Tripsin-EDTA	GIBCO,Grand Island, NY	03-053-1B
Kollojenaz tip 2	SIGMA	C 6885-100MG
%0,25 Tripsin-EDTA sol.	GIBCO-BRL	25200-056
High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-HG)	GIBCO-BRL	11960-044
RPMI1640 With L-Glutamine	Biological Industries	01-100-1B
L-Glutamin Solution 200mM	Biological Industries	03-020-1C
Serum Substitute Supplement	Irvine Scientific Santa Ana	99193
RBC Lysis Solution	5 PRIME GmbH	2301300
Non-Esansiyel aminoasit solüsyonu (NEAA;100X)	GIBCO	11140-035
Fosfat Dengeli Tuz Solüsyonu Ca-Mg içermeyen	GIBCO	14190-091

Tablo 3.2: Kokültürde Kullanılan Sarf Malzemeler

<u>Ko-Kültür Malzemeleri</u>	<u>Marka</u>	<u>Seri-No</u>
Cam Pastör Pipeti	Isolab	10803002
15 ml Polystyrene Conical Tube	BD Falcon- Blue Max™	35 2095
Falcon 2ml Pipet	Serological Pipet	35 7507
Falcon 5ml Pipet	Serological Pipet	35 7543
Falcon 10ml Pipet	Serological Pipet	35 7551
Tissue Culture Dish	Falcon Primaria™ Tissue Culture Dish	35 3803
Tissue Culture Flask	Becton Dickinson	35 3023
Tissue Culture Dish	Nunc™ Surface	176742
Falcon Center-Well Organ Culture Dish	Becton Dickinson	35 3037
Endo Cell Pipelle	Wallach Surgical Devices, INC	720218
Minisart filter 0.20µm	Sartorius	16555
Tissue Culture Flask	Becton Dickinson	3014
6-kuyucuklu hücre kültürü kabı	Nunc™	795152
75 cm ² lik hücre kültür flaskı	Falcon	35 3024
25 cm ² lik hücre kültür flaskı	Falcon	35 3014
50 ml vida kapaklı konik tüp	Falcon	35 2070

Tablo 3.3: Kokültürde Kullanılan Demirbaş Ekipmanlar

<u>Ekipmanlar</u>	<u>Marka</u>	<u>Tanıtcı Bilgi</u>
Stereo Mikroskop	Zeiss	Stemi2000
Işık Mikroskobu	Olympus	BX50
Mikro Manipülatör Sistem İnvert Mikroskop	Narisige/Olympus	Ix70
Su arıtma cihazı	Millipore	F4AN62458B
Laminal Flow Kabin	K System	
Su Banyosu	Nuve	Bath 5NP
Santrifüj	Heraeus	40 064-065
İnkübatör	Heraeus	BB6220
İnkübatör	Heraeus	Cytoperm2
Mikropipetör 100µl	Eppendorf	A 015
Mikropipetör 20µl	Eppendorf	0-32
Hassas Terazî	Electronic Balance	AX200
Kabin içi İnkübatör	Labotect	
Vorteks	Velp Scientific	14813
Buzdolabı	Bosch	0157

3.1.2. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Çalışmamızın ilk kısmında, iki grup oluşturuldu. Vaka grubu olarak, İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Genetik Tanı Merkezi'ne infertilite nedeniyle başvuran ve TİB endikasyonu konan toplam 27 bireyin endometriyumlarından alınan biyopsi örnekleri toplandı. Kontrol grubunu ise yine İstanbul Memorial Hastanesi YÜT ve Genetik Tanı Merkezi'ne çeşitli başka nedenlerle başvuran 9 bireyden alınan biyopsi örnekleri oluşturdu. Biyopsi örnekleme yapılmadan önce bireyler detaylı şekilde bilgilendirildi ve onamları alındı. Bu çalışma İstanbul Memorial Hastanesi Etik Kurulu tarafından onay alınarak yapıldı.

TİB vakalarının ve fertil (kontrol) grubun ortalama yaşları sırasıyla 32 ± 7.3 (min.:22-maks.:40) ve 33 ± 5.2 (min.:22-maks.:40) idi. Çalışmamızda TİB endikasyonu, 3 veya daha fazla YÜT denemesinde, implantasyon başarısızlığı nedeniyle gebe kalamama durumu olarak tanımlandı. Her iki grupta, anemnez alınırken özellikle menstrual periyod süresi ve periyodun düzenliliği sorgulandı. Tüm bireylerin menstrual periyodları 27-28 gündü ve düzenliydi. Endometriyal biyopsi yapılabilmesi için bireylerin menstrual siklusun orta luteal fazında olması gerekiyordu. Bunun tespitinde dikkate alınan kriterler menstrual siklusun 19-21. günde olması, ultrasonografi (USG) kontrolünde korpus luteumun gözlenmesi ve endometriyum kalınlığıydı (7-9mm).

3.1.3. Endometriyal Biyopsi İşlemi

Endometriyal biyopsi işlemi ameliyathanede, steril koşullarda bireyler sedatize edildikten sonra gerçekleştirildi. İşlemden önce negatif basınçlı pipelle uterin kaviteden doku aspire edilmesi sağlandı. Ortalama 20gr endometriyal doku örneği alındı ve %2 heparin ve 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin içeren Early's Balanced Salt Solution (EBSS) içine konuldu. Doku parçaları ameliyathaneden bekletilmeden IVF laboratuvarına getirildi ve işleme alındı. Doku parçalarının yaklaşık 2/3 kadarı endometriyal kokültür işlemine kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan kısmı ise elektron mikroskopik doku bloklarının hazırlanmasında kullanıldı.

3.1.4. Endometriyal Epitel-Gland (EE) ve Stromal (ES) Hücre Elde Edilişi ve Kültürü

Memorial Hastanesi IVF laboratuvarında endometriyal epitel-gland ve stromal hücre elde edilişi ve kültürü için Barmat ve arkadaşlarının kullandığı yöntemin laboratuvar koşullarına adapte edilmiş protokolü kullanıldı (18,106,107,108). Protokol aşağıda detaylı şekilde açıklanmıştır:

- 1.** Ameliyathaneden steril koşullarda kadın hastalıkları ve doğum uzmanı tarafından alınan endometriyal biyopsi örneği, steril 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin içeren Early's Balanced Salt Solution (EBSS) veya %0.9 izotonik sodyum klorür içinde IVF laboratuvarına getirildi ve doku örnekleri bekletilmeden işleme alındı. Tüm işlemler laminal flow altında steril koşullarda gerçekleştirildi (Şekil 3.1.).
- 2.** Endometriyal dokular birkaç kez 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin içeren EBSS ile kanın uzaklaştırılması için yıkandı.
- 3.** Yıkama sonrası doku parçaları mekanik olarak makas ile yaklaşık 1mm³ lük küçük parçalara bölündü ve parçalar otomatik pastör pipet yardımı ile 15ml'lik santrifuj tüplerine (Falcon,#2095) transfer edildi.
- 4.** Sonraki enzimatik ayrıştırma için, doku parçalarının üzerine 10ml kollajenaz Tip II 0,25% ilave edildi. Doku parçaları içeren tüpü 37°C 'deki çalkalamalı su banyosunda 10 dk. bekletildi.
- 5.** Süre sonunda parçalanmış dokular otomatik pastör pipeti ile birkaç kez homojenize edilip 5 dk. oda ısısında bekletildi (gravite sedimantasyon) ve süre sonunda çöken doku parçalarının üzerindeki süpernatant çekilerek başka bir tüpe transfer edildi.
- 6.** Diğer tüpe transfer edilen süpernatant 5 dk 400g'de santrifüj edildi. Santrifuj sonrasında süpernatant atıldı ve dipteki hücre pelletinin üzerine 1 ml L-Glutaminli Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medyumuna kondu ve tüp stroma 1 olarak etiketlendi.
- 7.** İlk tüpdeki dibe çöken enzimatik yolla tamamiyle parçalanmamış doku parçalarının üzerine ise tekrar 5 ml kollojenaz Tip II 0,25% ilave edildi ve 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 5 dk. bekletildi.
- 8.** Aynı işlem 3 kez daha tekrarlandı. Her seferinde süpernatant tüpten alınarak santrifüjlendi ve stromal hücreler ayrıştırıldı, enzimatik yolla tamamen ayrıştırılmayan

ve özellikle gland içeren dokular ise kollajenaz Tip II 0,25% maruz bırakıldı. Bu işlemler sonunda 3 adet tüp stromal 2-3-4 olarak etiketlendi.

9. Dördüncü işlem sonunda tüpün dibinde kalan ve kar tanelerine benzeyen gland hücre gruplarının üzerine 10 ml 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin içeren EBSS eklendi ve pipet ile homojenize edildi (Şekil 3.2.).

10. Homojenize edildikten yaklaşık 15-20 saniye sonra 10ml lik solüsyonun 8 ml' si pipetle alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Tüp 400g' de 5 dk. santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Bu işlemin amacı daha saf bir gland hücre grubu elde etmektir.

11. Gland olarak kalan hücre peleti, 25cm² lik hücre kültür flaskına (Falcon;3014) 3 ml'lik ko-kültür medyumu ile ekildi. Bu medyum L-Glutaminli RPMI solüsyonuna %10'luk hasta serumu ve 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin eklenerek oluşturuldu. Ekimi yapılan flask 37°C de, %5CO₂ içeren inkübatöre uzun süreli kültür için konuldu.

12. Stromal 1,2,3 ve 4 olarak etiketlenen tüplerin içerikleri tek bir tüpte toplandı ve 400g' de 5 dk santrifüj edildi.

13. Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve yüksek oranda stromal hücre içeren pelletin üzerine 1 ml RBC (Red Blood Cell Lysis)-Alyuvar parçalayıcı solüsyon eklenip 5 dk. oda ısısında beklenildi.

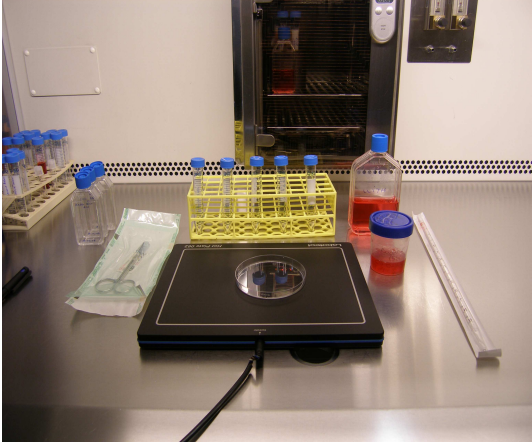
14. Endometriyal doku örneğinin yetersiz olduğu olgularda madde 11 ve 13' de belirtilenin aksine elde edilen toplam gland ve stromal hücreler homojenize edilerek tek bir adet 25cm² lik hücre kültür flaskına (Falcon;3014) ekildi.

15. Süre sonunda, tüpe alyuvar parçalayıcı solüsyonu inaktive etmek için 1:1 oranında kokültür medyumu kondu ve tüp 400g' de 5 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.

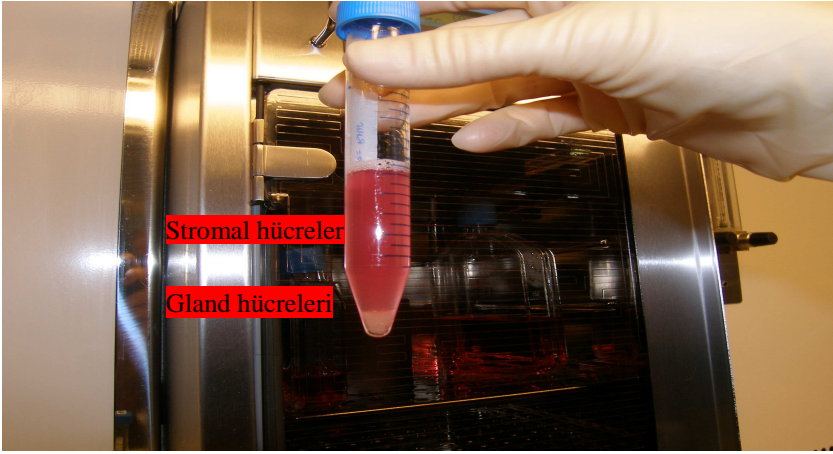
16. Kalan pelletin üzerine ise 3ml'lik kokültür medyumu eklendi ve 25 cm² lik kültür flaskına ekim yapıldı. Ekimi yapılan flask 37°C de, %5CO₂ içeren inkübatöre uzun süreli kültür için konuldu (Şekil 3.3.).

17. Kültürlerin medyumu her 3 günde bir, günlük olarak hazırlanmış ko-kültür medyumu ile değiştirildi.

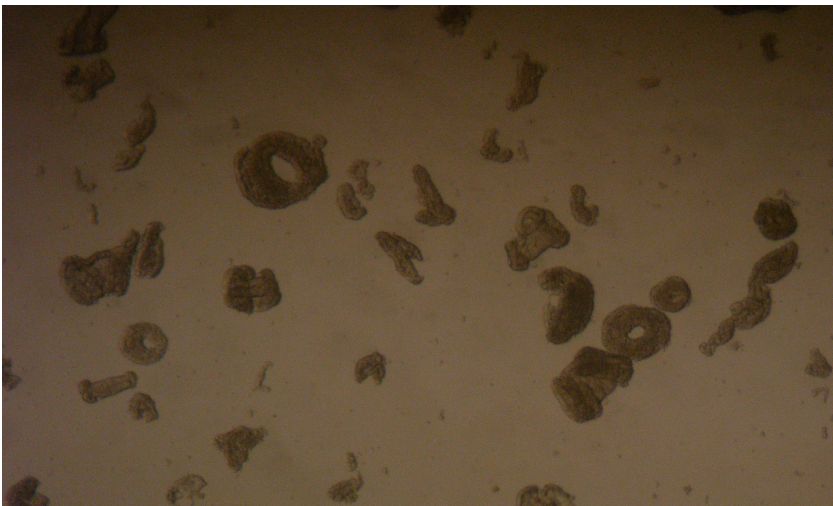
18. 1. hafta sonunda flaskların yaklaşık %90' nını kaplayan gland ve stromal hücreler zeminden tripsin-EDTA ile kaldırıldı.



Şekil 3.1. Endometriyal gland ve stromal kokültür hücrelerinin hazırlanması.



Şekil 3.2. Kokültür hücrelerinin gland ve stroma hücrelerine ayrıştırılması.



Şekil 3.3. Kokültüre endometriyal dokunun stereo mikroskop altındaki görüntüsü X10.

(Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3. için Memorial Hastanesi YÜT ve Genetik Merkezi AR-GE laboratuvarının izni alınmıştır).

3.2. TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME

Tablo 3.4. TEM Doku Takibinde Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

<u>Kimyasalın Adı</u>	<u>Özelliği</u>	
Gluteraldehit	%25 EM Grade 450ml	EMS cat:16400
Osmium Tetroksit	0,1gr. 1kt./10Adet	EMS Cat:19110
Tampon	D-PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	EC B 4004L
Plastik	Araldit 212 kit	AGAR
Propilen Oksit	Propilen Oxide 450ml.	MERCK
Kurşun Sitrat	Lead Citrate 100gr	EMS
Uranil Asetat	Uranil Acetate 25gr	EMS
Distile Su	DS cihazıyla hazırlandı	G/F/L
Grid	EMS	Cat:G300-Cu
Boya	Toluidin Blue 50gr	22050

Tablo 3.5. TEM Endometriyal Doku Takibinde Kullanılan Ekipmanlar

Kullanılan Ekipman İsimleri	Marka ve Özellikleri	
Işık mikroskobu	Olympus	BX50
Transmisyon Elektron Mikroskop	Jeol	1011
Ultramikrotom	Leica	Reichert/M26
Etüv	Elektro-mag	5040BP
Distile su cihazı	G/F/L	2001/4
Rotator	Falc	F205
Santrifüj	Micro22R	D-78532
Fotoğraf -kamera	Nikon	Coolpix 5000 digital kamera

3.2.1. Endometriyal Doku ve Endometriyal Kokültür Hücre Topluluğunun Gruplandırılması

Çalışmanın endometriyal doku kesitleri 4 gruba ayrılarak değerlendirildi:

- 1- Fertil (kontrol) grubun endometriyum dokuları
- 2- Fertil grubun kokültüre endometriyum hücre topluluğu
- 3- TİB (vaka) grubu endometriyum dokuları
- 4- TİB grubu kokültüre endometriyum hücre topluluğu

Elektron mikroskopik doku takibi için Asena K, Reza M ve arkadaşlarının kullandığı yöntemin laboratuvar koşullarımıza adapte edilmiş protoköli kullanıldı (110,146).

3.2.2. Dokuların Tesbiti ve Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Doku Takibine Alınması

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular, öncelikle, kan, mukus, akıntı sıvısından temizlenmek üzere, hassasiyetle 100IU/ml penisilin, 0.1mg/ml streptomisin ve 0.25µg/ml amfoterisin içeren Early's Balanced Salt Solution (EBSS) ile birkaç kez yıkandı. Tesbit edilmek üzere, 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 1. tesbit solüsyonumuz olan % 2.5'lük hazırlanan gluteraldehit içine konuldu. Yaklaşık 4-6 saat tesbit edilen dokular, tampon solüsyonu içine alınarak yıkandı. Her yıkama 10 dk. olmak üzere 3 kez tampon solüsyonunda yıkandı. Sonrasında yeni tampona alındı, gece boyunca tamponda bekletilerek, fazla tesbit solüsyonunun dokudan uzaklaştırılması sağlandı. Ertesi gün tamponu uzaklaştırılan dokular, ikinci tesbit solüsyonu içine kondu. %1'lik osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu içinde 1,5 saat tesbit edildi. Dokuların siyaha yakın koyu renk alması, bu süre sonunda yeterli tesbitin sağlanmış olduğunun göstergesi olarak kabul edildi. Dokuların tesbit edilme işleminin amacı, dokunun hücre yapısını canlı haline en yakın şekilde korumaktır. Tesbit işleminin ardından PH'yı nötralize ederek doku hasarını en aza indirmek için, dokular tampona alındı ve 3 kez 10'ar dk. tamponda bekletildi. Bu aşamaya kadar olan tüm işlemler buzdolabında (+4 °C) gerçekleştirildi.

3.2.3. Dehidratasyon:

Bu işlem doku içindeki serbest suyun bir solventle çıkarılması için yapıldı ve bu amaçla artan oranlarda etil alkol kullanıldı.

Sonraki aşamalarda doku takibi aşağıdaki şekilde uygulandı:

- 1- % 30 etil alkolde +4 °C’de 10 dakika.
- 2- % 50 etil alkolde +4 °C’de 10 dakika.
- 3- % 70 etil alkolde +4 °C’de 10 dakika.
- 4- % 90 etil alkolde oda ısısında 10 dakika süreyle rotatorda.
- 5- % 100 etil alkolde oda ısısında 10 dakika süreyle rotatorda.
- 6- % 100 etil alkolde oda ısısında 10 dakika süreyle rotatorda.
(Etil alkol ve gömme materyali arasında geçiş sıvısı olarak propilen oksit kullanıldı).
- 7- Propilen oksitte oda ısısında 15 dakika süreyle rotatorda.
- 8- Propilen oksitte oda ısısında 15 dakika süreyle rotatorda.

3.2.4. Resin İnfiltrasyonu:

Propilen oksit ve gömme materyalinin aşamalı olarak dokulara infiltrasyonunu sağlamak üzere, propilen oksit ve rezin karışımları uygulandı:

- a- Propilen oksit (3/4) + Gömme materyali (1/4) : 1 saat, rotatorda.
- b- Propilen oksit (2/4) + Gömme materyali (2/4) : 1 saat, rotatorda.
- c- Propilen oksit (1/4) + Gömme materyali (3/4) : 1 saat, rotatorda.
- d- Saf rezine konularak gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı.

3.2.5. Dokuların Gömülmesi ve Bloklama İşlemi:

Gömme Materyali: Araldite CY212 R1030 kullanıldı:

Araldite	CY212	20 ml
Sertleştirici	DDSA	22 ml
Hızlandırıcı	BDMA	1,1 ml
Plastikleştirici	Dibutil Fitalat	1ml

Ertesi gün dokular taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak polietilen kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 36 saat bırakılarak, polimerizasyonu sağlandı. Bu süre sonunda polimerize olan doku blokları, içinde buldukları polietilen kapsüllerin bistüri ile kesilmesi sonucunda çıkarıldı.

3.2.6. Doku Bloklarından Kesit Alınması:

Öncelikle her gruptaki tüm doku bloklarından 500-600nm kalınlıkta yarı-ince kesitler alındı ve toluidin mavisiyle boyandı. Kesitler; X10'luk, X20'lik ve X40'lık büyütmelemlerle ışık mikroskop (Olympus) ile incelendi, kesitlerin anlamlı bölgeleri belirlenerek ince kesit alma aşamasına geçildi. Her gruptan 9'ar olgu seçildi

Doku bloklarından, ultramikrotom (Leica Ultracut) ile cam bıçak kullanılarak ortalama 70 nm kalınlıkta kesitler elde edildi ve bakır gridlere alındı.

3.2.7. Kontraslama:

Uranil asetat ve kurşun sitrat, doku kesiti sayısına uygun olacak şekilde, boyama kabının kuyucuklarına damlatıldı. Gridlerin doku bulunan mat yüzeyleri, uranil asetat içeren kuyucuklara bırakıldı. 5 dk. sonra ilk konulan gridden başlanarak sırayla distile suda çalkalanan gridler kurutma kağıdı ile fazla suyu alınarak kurşun sitrat içeren damlaların üzerine bırakıldı. Burada da 5 dk. tutulan gridler tekrar distile sudan geçirildi ve grid kutusundan alındığı numaralara yerleştirildi. Kesitler, kontrastlandıktan sonra incelenmek üzere Jeol 1011 transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirildi ve resimleri çekilerek, bilgisayara kaydı gerçekleştirildi.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME:

Endometriyum kokültür yarı-ince kesitleri (500-600 nm), toluidin mavisiyle boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus BX50) incelendi. Fertil gruba ait 6, TİB grubuna ait 10 farklı bireyden elde edilen endometriyal kokültür hücrelerine ait kesitlerin fotoğrafları çekildi. Preparatlar, ışık mikroskobunda X20'lik ve X40'lık büyütmelemler ile incelenerek hem fertil hemde TİB grubunda 3 tip hücre ayırt edildi. Bireylerin her birine ait beşer fotoğraf ve her fotoğraftan 100 hücre sayıldı. Her fotoğraftaki hücre tiplerinin rakamsal olarak değerleri not edildi, fotoğrafların tamamı değerlendirilerek her hücre tipinin aritmetik ortalaması elde edildi. Hücre tiplerine ait sayısal değerler ile çalışmanın istatistiksel analizi yapıldı. Fertil ve TİB grupları arasında, hücre tipleri frekansları açısından gözlemlenen farklılıkların anlamlı olup olmadığını tesbit etmek için istatistiksel metod olarak "ki-kare analizi" uygulandı.

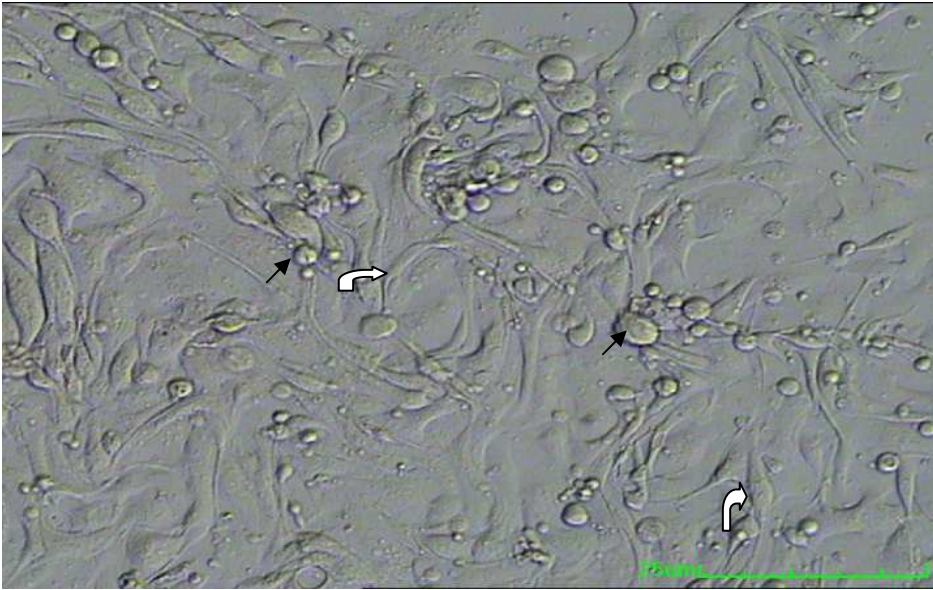
4. BULGULAR

4.1. FERTİL ve TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYAL GLAND VE STROMASININ İNVERT MİKROSKOPLA GÖRÜNTÜLERİ

4.1.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Kokültür Gland ve Stroma Görüntüleri



Şekil 4.1. Fertil grup endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X20. Siyah ok; gland hücreleri, bükülü ok; stromal hücreler.



Şekil 4.2. Fertil grup endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X40. Siyah ok; gland hücresi, bükülü ok; stromal hücre.

4.1.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Gland ve Stroma Görüntüleri



Şekil 4.3. TİB grubu endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X20. Siyah ok; gland hücresi, bükümlü ok; stromal hücre.



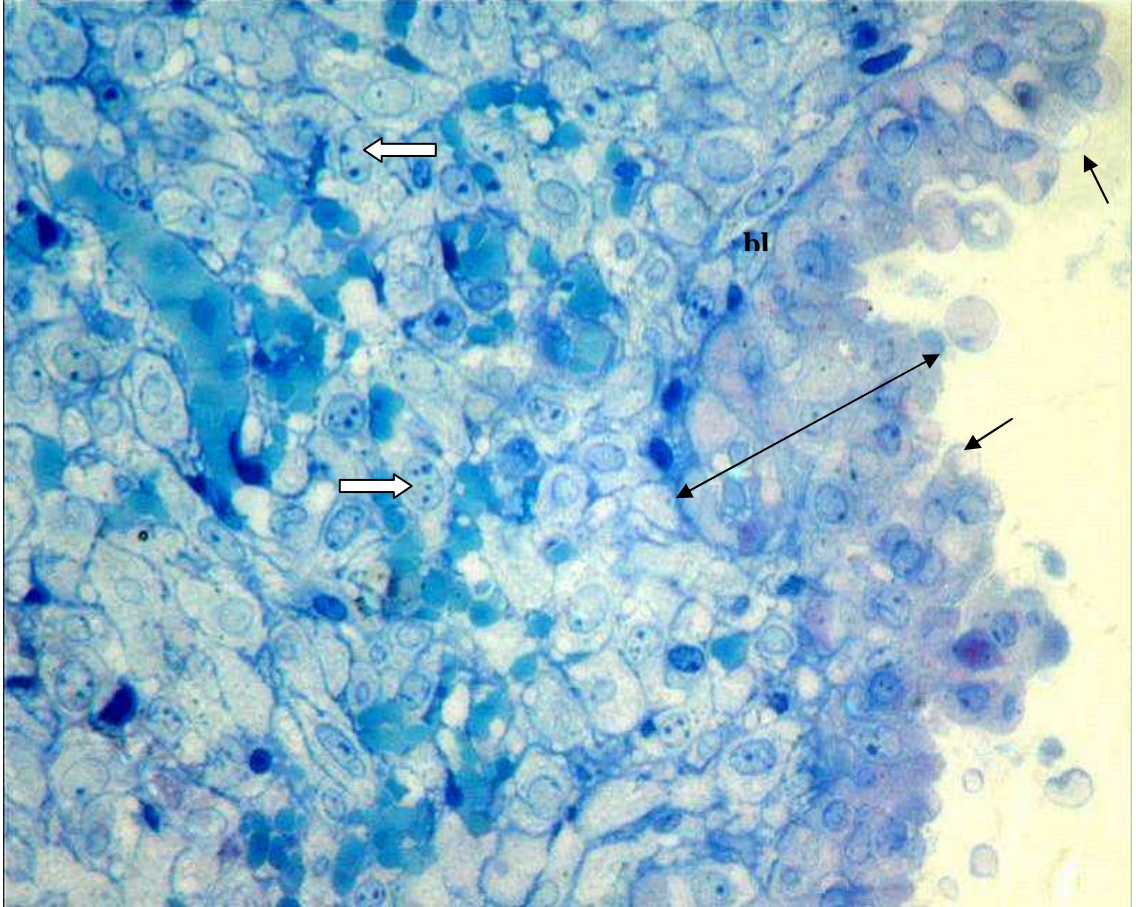
Şekil 4.4. TİB grubu endometriyum dokusu kokültür gland ve stroma görüntüleri X40. Siyah ok; gland hücresi, bükümlü ok; stromal hücre.

Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4.'deki fotoğraflar Memorial Hastanesi YÜT ve Genetik Merkezi Ar-Ge laboratuvarında, fertil ve TİB gruplarının yaklaşık 7-10 gün kültüre edilen endometriyum dokularından elde edildi. Fotoğraflar invert mikroskopla X20'lik ve X40'lık büyütmelemlerde çekildi. Şekil 4.1. ve 4.2.'de fertil gruba ait fotoğraflar görülmekte olup kültür tabağını %90 oranında kaplayan kokültür hücreleri izlendi. Şekil 4.3. ve 4.4. 'te görülen TİB grubuna ait fotoğraflardaki hücrelerin fertil gruptakine benzer şekilde hücre sayısı olarak iyi gelişim gösterdiği fark edildi. X20'lik ve X40'lık büyütmelemlerde her iki grupta da endometriyal gland ve stromal hücreler belirgin olarak izlendi.

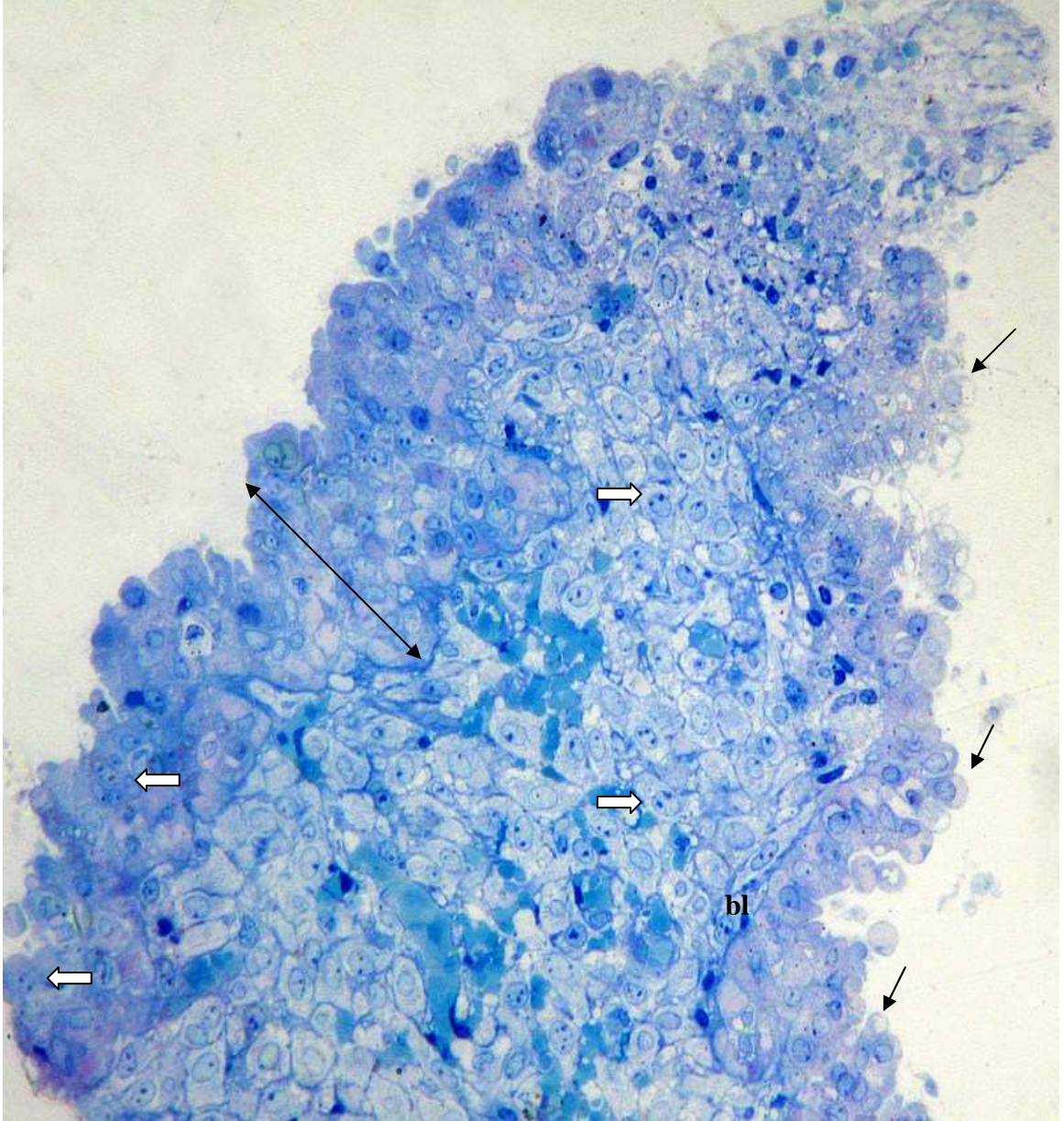
4.2. FERTİL VE TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYUM DOKUSU IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ

4.2.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Işık Mikroskopik Görüntüleri:

Apikalde yüzey epitelinin silindirik hücrelerden oluştuğu ve hücrelerin birbiri ardı sıra, bitişik bir düzende sıralandığı gözlemlendi. Epitel kalınlığı, tek katlı basit silindirik görünüme kıyasla, belirgin derecede yüksek silindirik görünümdeydi. Epitel hücrelerinin toluidin mavisiyle boyandıktan sonra çoğunun açık renkte ve aktif hücre görünümünde olduğu saptandı (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Sağlam ve süreklilik gösteren epitel hücrelerinin lümene bakan yüzlerinde, uç kısımlarda daha belirgin ve çok olan vakuol yapısında oluşumlar belirlendi. Yüzey epitel hücrelerinin çoğunluğu salgı vakuolleri ile dolu, lümene uzanan pinopod yapılarına sahipti. Hücrelerin çekirdekleri de ökromatik yapıda ve bir kısmı çift çekirdekçik içeriyordu. Epitel hücreleri ile stroma arasında düzenli bir bazal lamina gözleniyordu (Şekil 4.6).

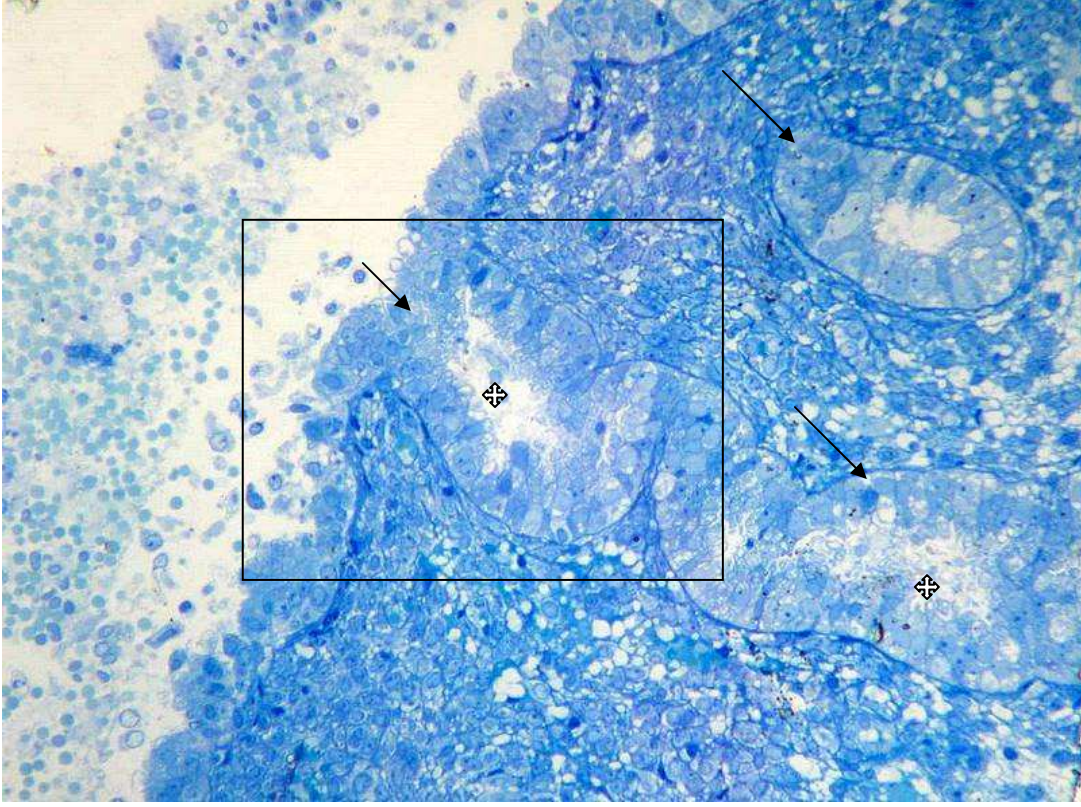


Şekil 4.5. Fertil grup endometriyum dokusu yüzey epiteli ve stroma görüntüsü X40. Stromada desidua benzeri hücreler izlenmekte. Beyaz ok; desidua benzeri hücreler, çift yönlü ok; endometriyum yüzey epiteli, siyah ok; pinopodlar, bl; bazal lamina.

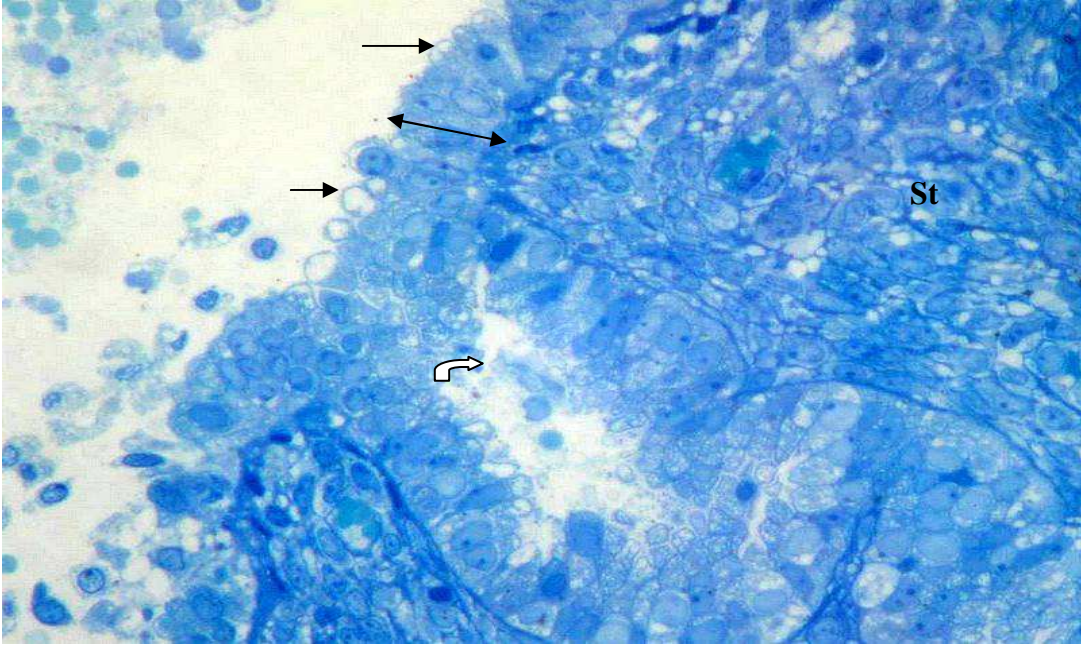


Şekil 4.6. Fertil grup endometriyum dokusu ışık mikroskopik görüntüsü X20. Yüzey epiteli ve stromadaki desidua benzeri hücreler. Çift yönlü ok; endometriyum yüzey epiteli, sağ o; desidua hücreleri, sol ok; çift çekirdekçikli epitel hücreleri, siyah ok; pinopod, bl; bazal lamina.

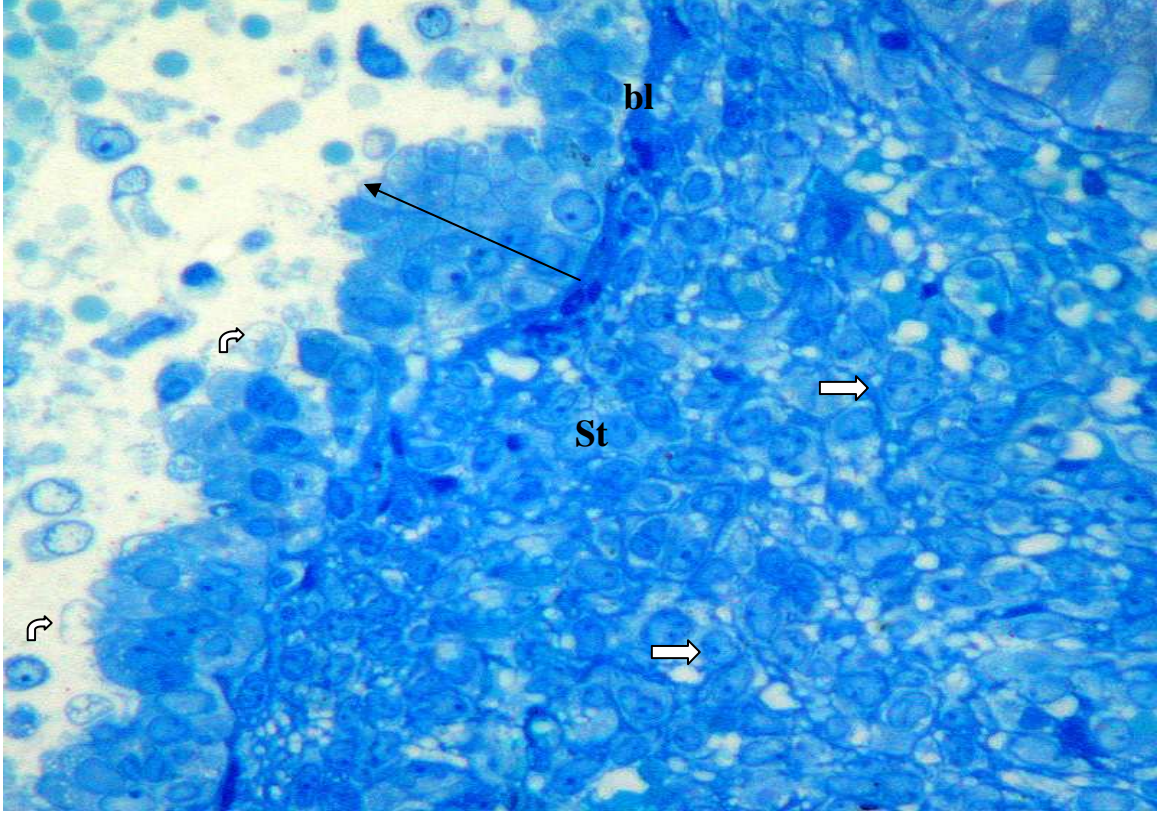
Bazal lamina altında oldukça yoğun ve çok sayıda hücre içeren stroma yer alıyordu. Stromal hücrelerin çok sayıda ve daha aktif oldukları fark edildi. Çoğu alanda stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüştüğü belirlendi (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.9). Yoğun stroma arasında yer alan ve lümenine açılan kıvrımlı tübüler bezlere de sıklıkla rastlandı (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. Fertil grup endometriyumunda bez epiteli ve stromanın görüntüsü X20. Siyah ok; düz ve kıvrımlanan tübüler yapıdaki endometriyal bez, yıldız; bez lümeni.

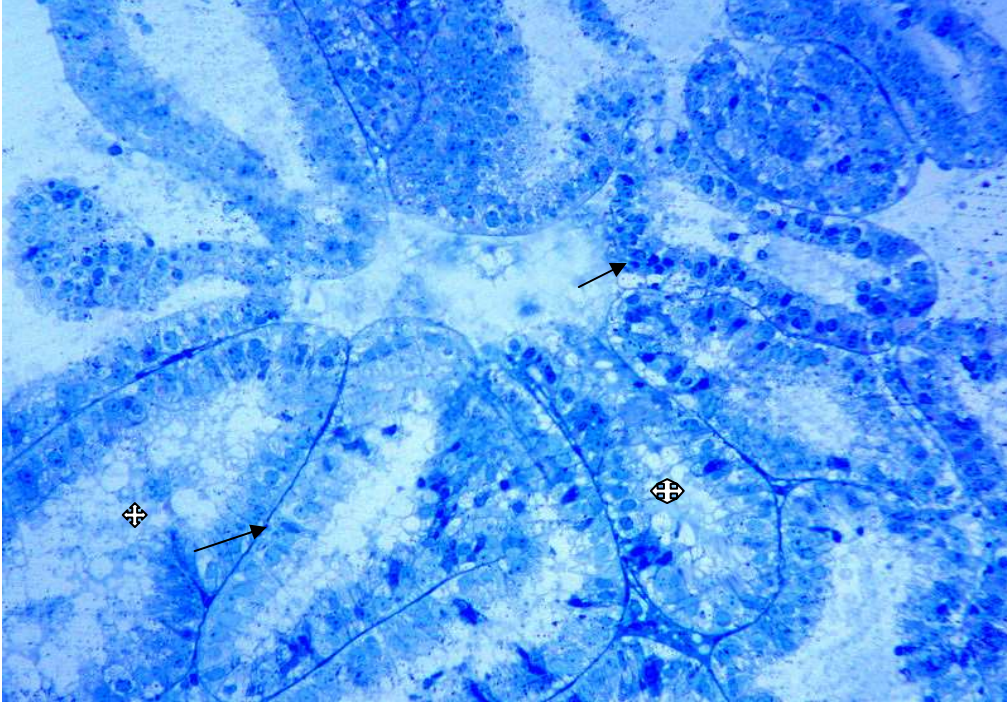


Şekil 4.8. Şekil 4.7'deki seçili alan içerisindeki endometriyumun bez epiteli X40. Siyah ok; pinopod, çift yönlü ok; yüzey epiteli, bükülü ok; tübüler bez lümeni, St; stroma.

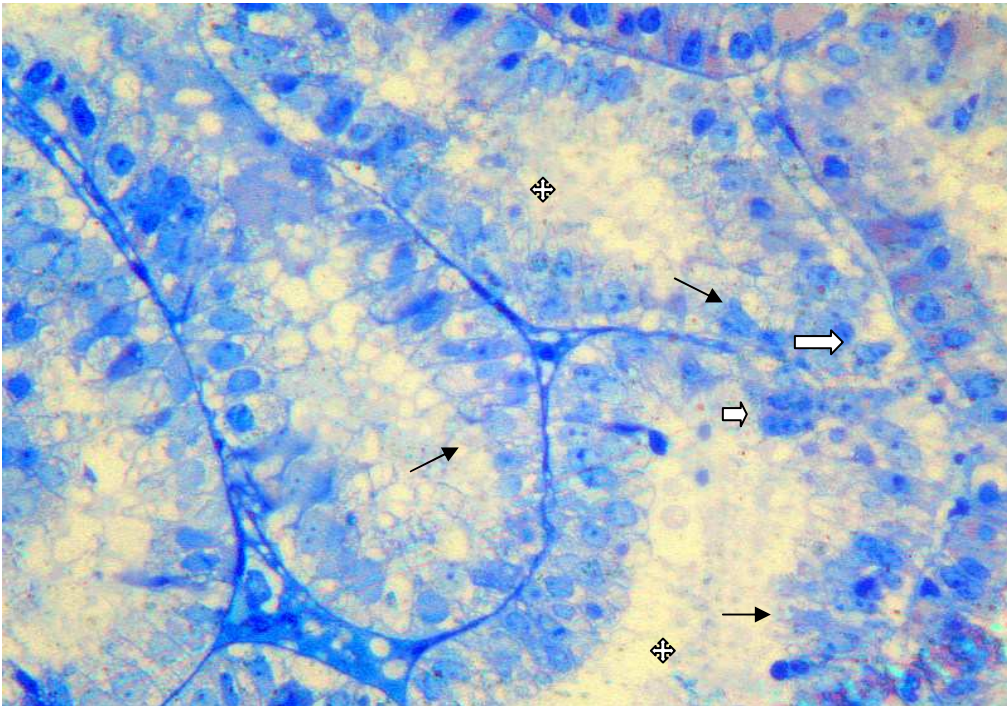


Şekil 4.9. Fertil grup endometriyumunun epiteli ve stroması X40. Siyah ok; yüzey epiteli, beyaz ok; stromanın desidual hücreleri, St; stroma, bükülü ok; pinopod, bl; bazal lamina.

Stromanın diğer dikkat çekici yanı ileri derecede kıvrımlanan ve adeta yer yer birbirine yapışarak bulunduğu bölgeyi tamamen dolduran endometriyum bezleriydi. Bezleri döşeyen salgı hücrelerinin sitoplazmaları salgı vakuelleriyle doluydu, aktif hücre görünümündeydi. Çoğu bezlerin lümeni aktif hücrelerin salgıları ile tamamen dolu bir görünüme sahipti. Ökromatik çekirdeklere sahip olan bu hücrelerin bir kısmı çift çekirdekçik içeriyordu (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



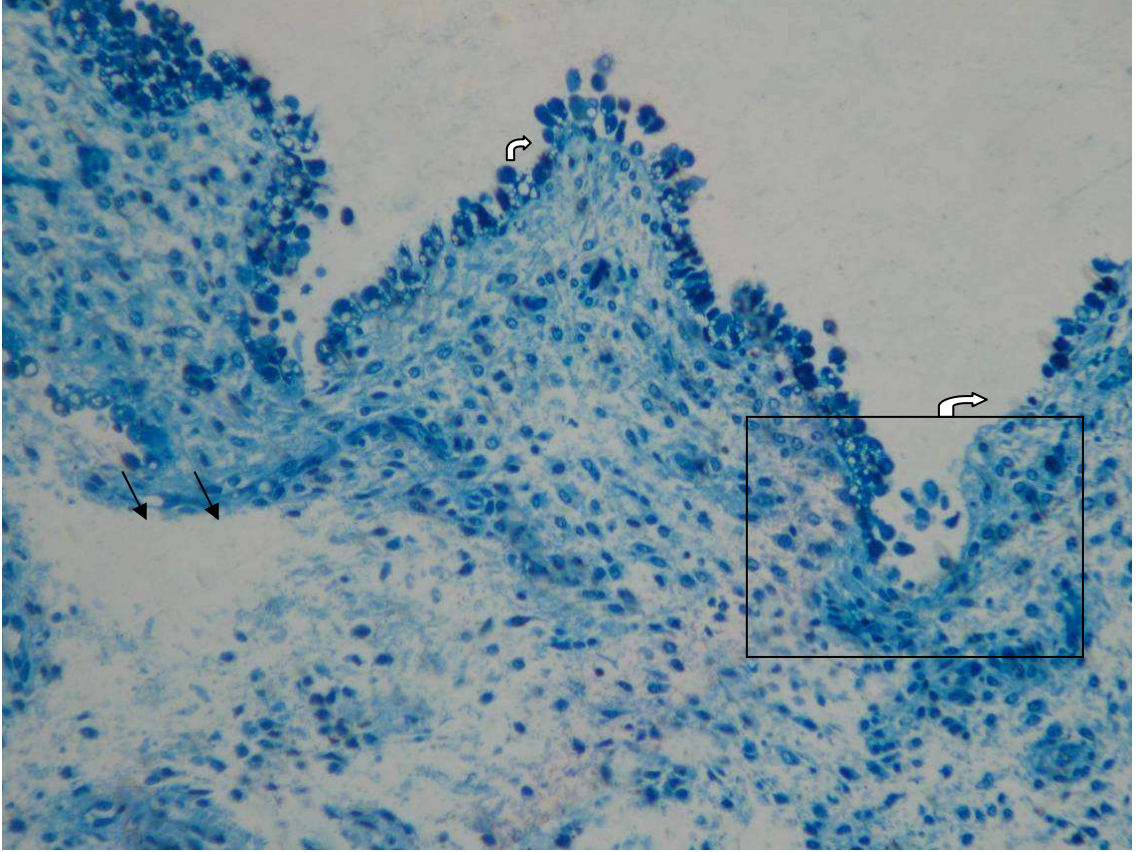
Şekil 4.10. Fertil grup endometriyum bez epitelinin görüntüsü X20. Siyah ok; salgı yapan hücrelerin oluşturduğu ileri derecede kıvrımlanan bezler, dörtlü ok; salgıyla dolu bez lümeni.



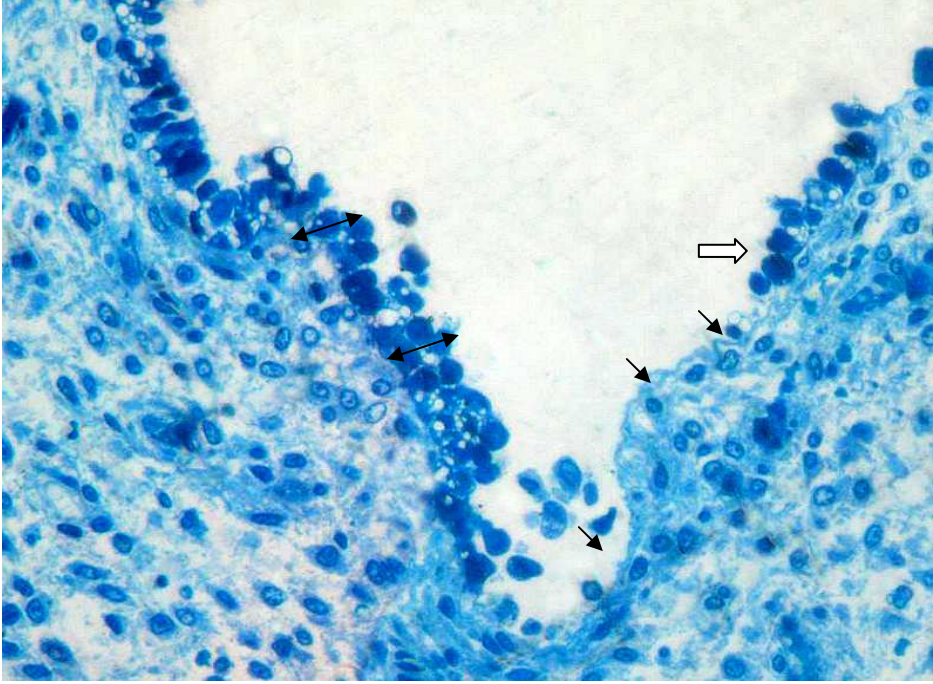
Şekil 4.11. Fertil grup endometriyum bez epitelinin görüntüsü X40. Siyah ok; bez lümenine salgısını boşaltan hücreler ve salgı vakuelleri, dörtlü ok; salgıyla dolu lümen, beyaz ok; çift çekirdekçikli hücreler.

4.2.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Işık Mikroskopik Görüntüleri:

Endometriyum lümenine bakan yüzey epiteli, alçak silindirik görünümlü, ardışık olmayan düzensiz bir izlenim vermekteydi. Epitel hücrelerinin apikal yüzeyde devamlılık sağlayamadığı, yer yer dökülmelerin olduğu ve hücrelerin birbiriyle bağlantılarının azaldığı dikkat çekti. Epitel kalınlığı nisbeten daha inceydi. Çok sayıda epitel hücrelerinin toluidin mavisiyle yoğun boyandığı görüldü. Bu hücrelerin çekirdeklerinin heterokromatik olduğu gözlemlendi, çekirdekçikleri genellikle belirgin değildi, nadiren tek çekirdekçikli olanlarına rastlandı (Şekil 4.12, Şekil 4.13).

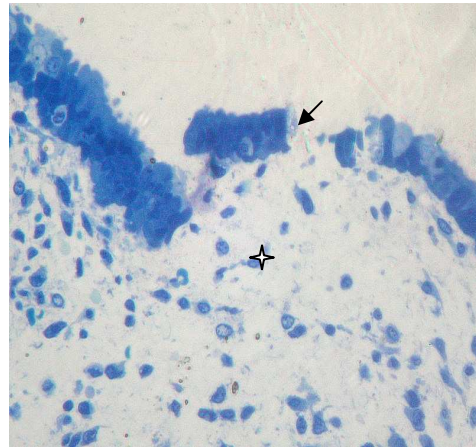
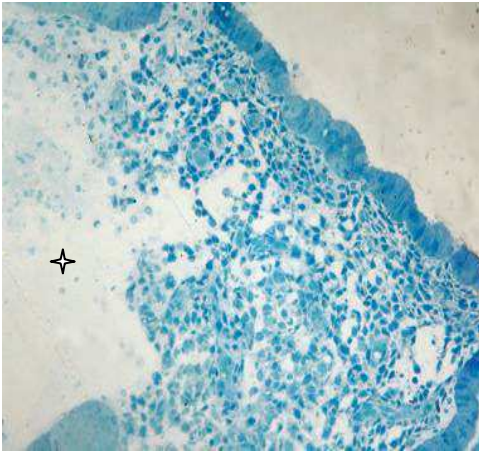


Şekil 4.12. TİB grubu endometriyum yüzey epiteli ve stromanın görüntüsü X20. Siyah ok; hücresel olarak fakir stromal alan, bükülü ok; bütünlüğü bozulmuş yüzey epiteli.



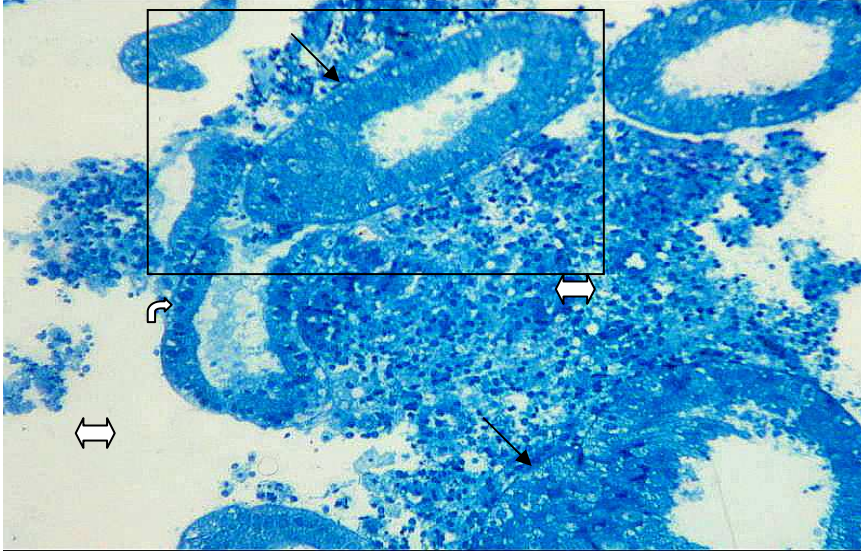
Şekil 4.13. Şekil 4.12.deki seçili alanın görüntüsü X40. TİB grubu endometriyum yüzey epiteli ve stromanın görüntüsü. Çift yönlü ok; yüzey epitel hücrelerinin kalınlığı, siyah ok; yüzey epitel hücrelerinin bütünlüğünün bozulduğu bölge, beyaz ok; heterokromatik çekirdekli yüzey epitel hücreleri.

Bazal lamina altında stromanın, bazı bölgelerde daha hücreli bazı bölgelerde ise hücreden fakir ve düzensiz olduğu gözlemlendi, bazı alanlarda ise hiç hücreye rastlanmadı (Şekil 4.14).

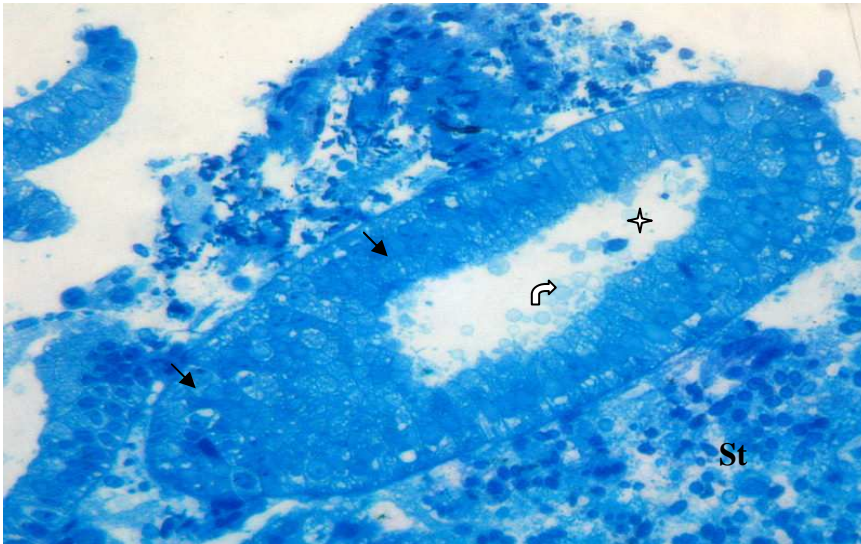


Şekil 4.14. TİB grubu endometriyumunun epitel ve stroması X20. Sol üst resimde yıldızlı bölgede hücreden fakir alan gözlenmektedir. Sağdaki resimde siyah okla dökülen yüzey epiteli izlenmektedir. Yıldız; hücreden fakir stroma, siyah ok; dökülen yüzey epitel bölgesi.

Stromada varlığını gösteren salgı bezleri sayıca azdı. Bezlerin bir kısmı düz, bir kısmı hafif kıvrımlı idi. Bezleri döşeyen hücreler ise basit silindirik tipteydi ve oldukça koyu boyanmışlardı. Epitel hücrelerinin çekirdekleri çoğunlukla hiperkromatikti (Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.15. TİB grubu endometriyumunun bez epitelinin görüntüsü X20. Siyah ok; az kıvrımlı ve düz bez yapıları, bükülü ok; hiperkromatik çekirdekli hücreler, çift yönlü ok; hücresel açıdan yoğun ve fakir stromal alanlar.

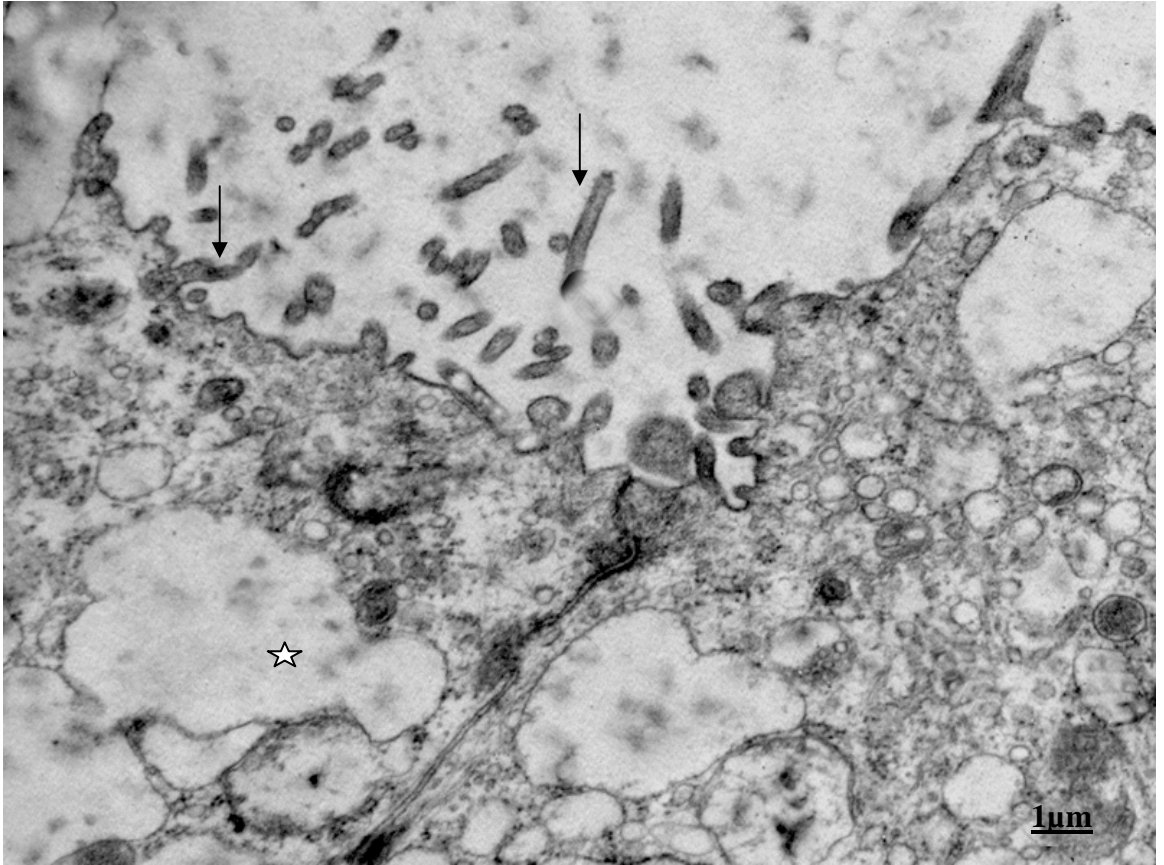


Şekil 4.16. Şekil 4.15'teki seçili alanın görüntüsü X40; TİB grubu endometriyum bez epitelini ve stroma. Bez epitelinin salgı yapan hücreleri izlenmektedir. Yıldız; bez lümeni, St; stroma, bükülü ok; salgı materyali, siyah ok; salgı hücreleri.

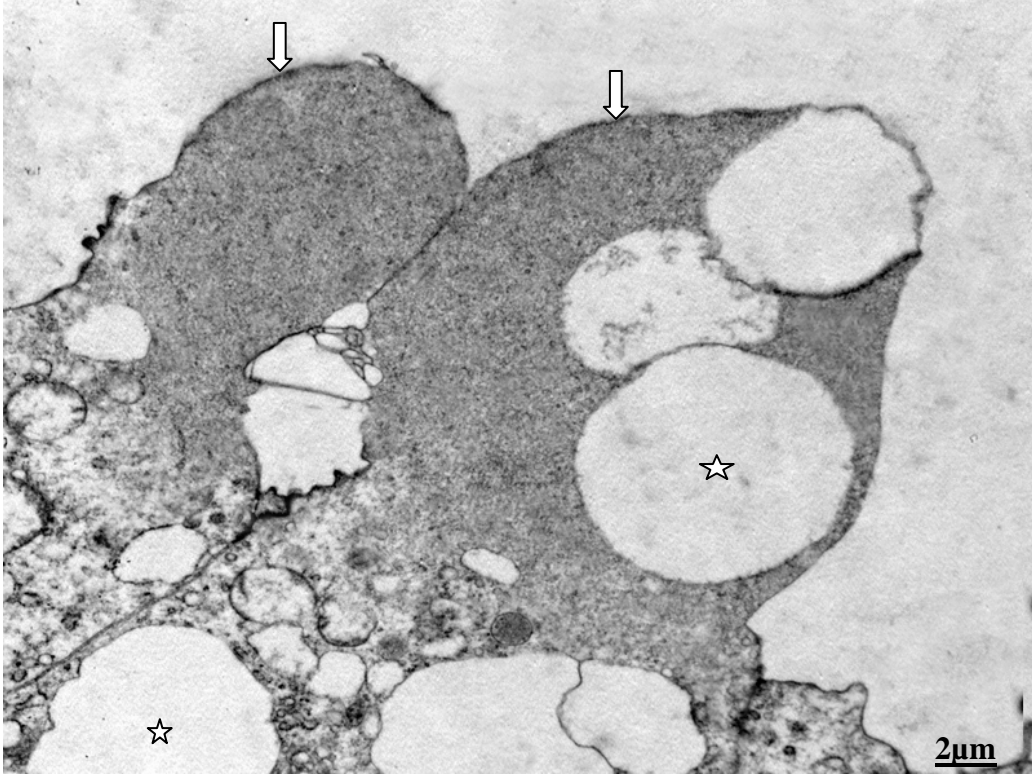
4.3. FERTİL VE TİB GRUBU BİREYLERİN ENDOMETRİYUM DOKUSU ELEKTRON MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ

4.3.1. Fertil Grup Endometriyum Dokusu Elektron Mikroskopik Görüntüleri:

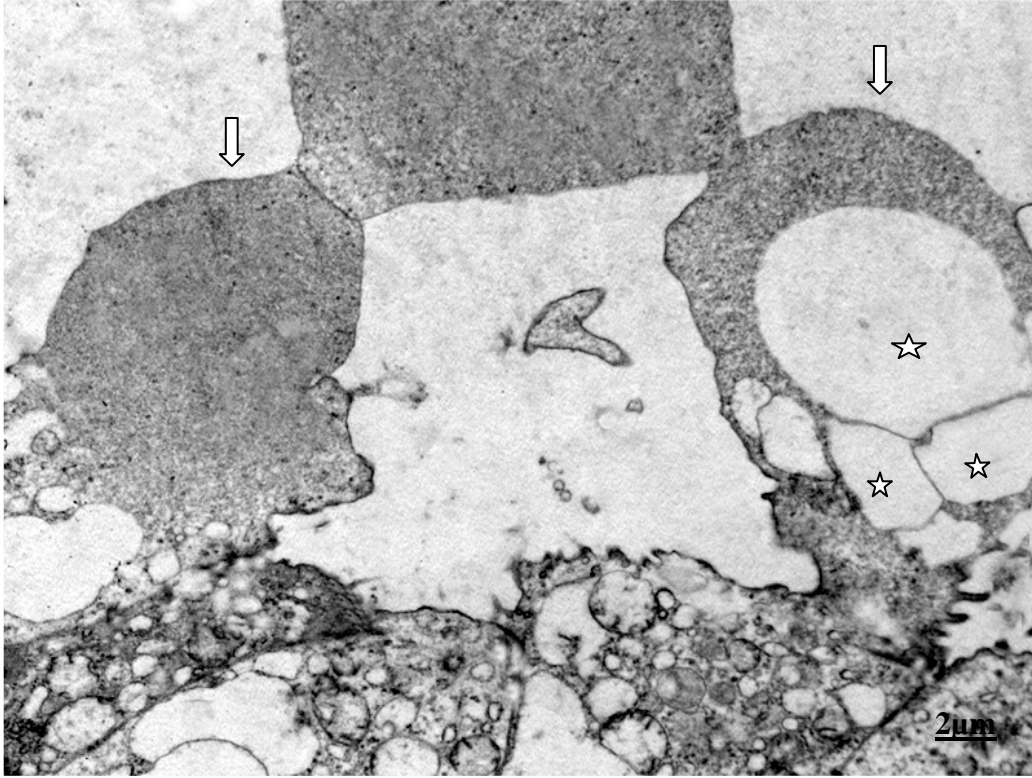
Endometriyum yüzey epitel hücrelerinde; lümene bakan kısımları çok girintili çıkıntılı ve düzensiz görünümdeydi. Hücrelerin bir kısmının apikal yüzeyinde mikrovillüsler vardı (Şekil 4.17). Bir kısmındaysa salgı vakuolleri ve salgı içeriğiyle dolu pinopod adı verilen sitoplazmik uzantılar gözlemlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Fertil grup yüzey epitelinde mikrovillüslerin görüntüsü X20.000. Siyah ok; mikrovillüs, yıldız; vakuol.

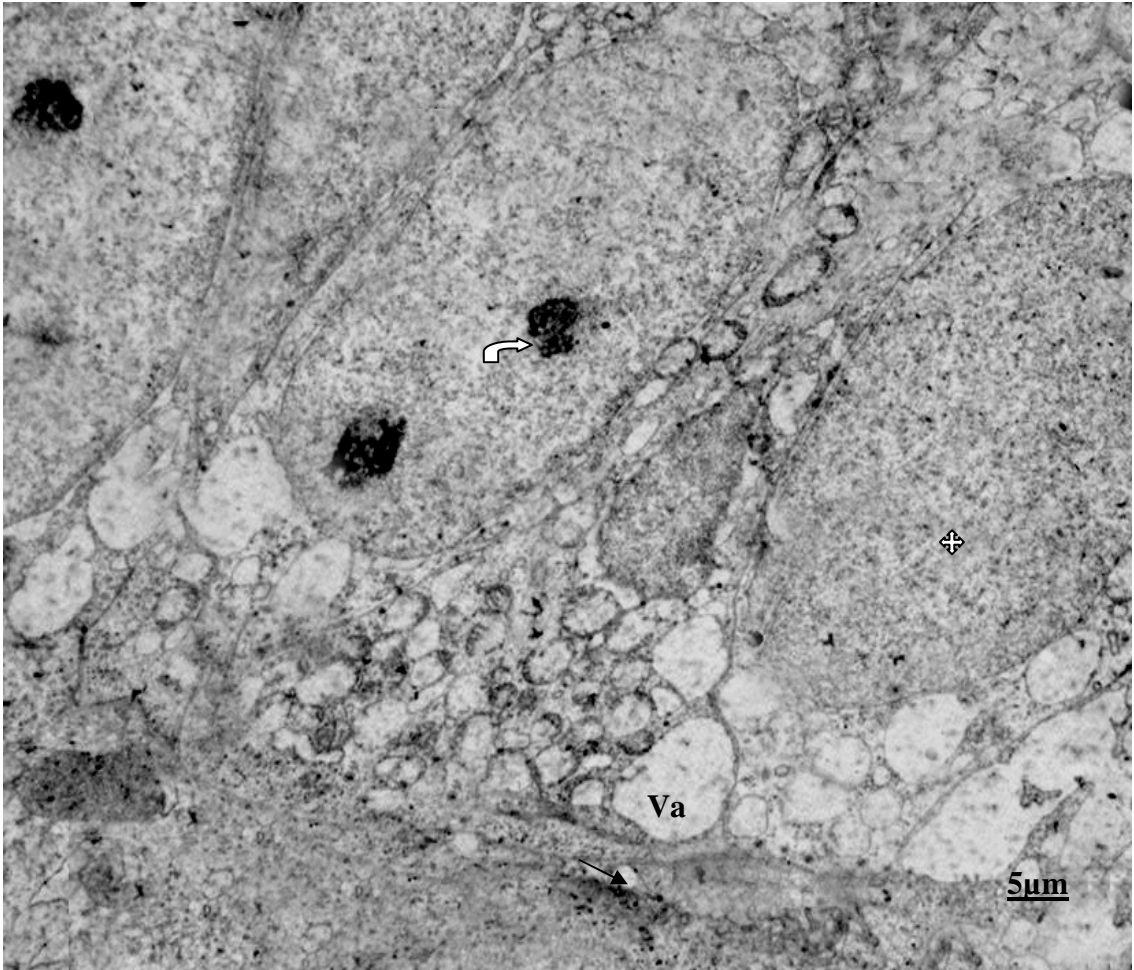


Şekil 4.18. Fertil grup endometriyum epiteli, pinopodlar X12.000. Beyaz ok; pinopod, yıldız; vakuol.

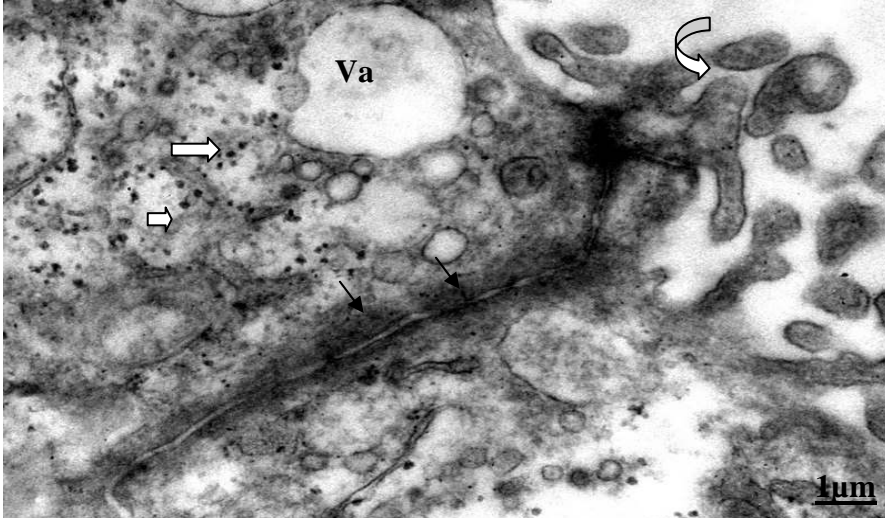


Şekil 4. 19. Fertil grupta lümeninde görülen pinopod parçaları X10.000. Beyaz ok; pinopod ve parçaları, yıldız; vakuol.

Lümen içinde salgı materyali olarak, hücrelerle bağlantısını yitirmiş sitoplazmik uzantı (pinopod) parçaları bulunmaktaydı (Şekil 4.19). Salgı vakuolleri hücrelerin bazal ve supranuklear bölgelerinde de yer almaktaydı. Supranuklear bölge ve pinopod içindeki vakuollerin daha iri oldukları ve birbirleriyle birleşerek dev vakuoller oluşturdukları dikkati çekmekteydi (Şekil 4.18, 4.19, 4.20). Epitel hücrelerinin çekirdekleri iri, oval ve bazal yerleşimliydi. Ökromatik olan bu çekirdekler belirgin çekirdekçiklere sahipti (Şekil 4.20). Hücreler arası sınırlarda bağlantı kompleksleri gözlemlendi (Şekil 4.21).

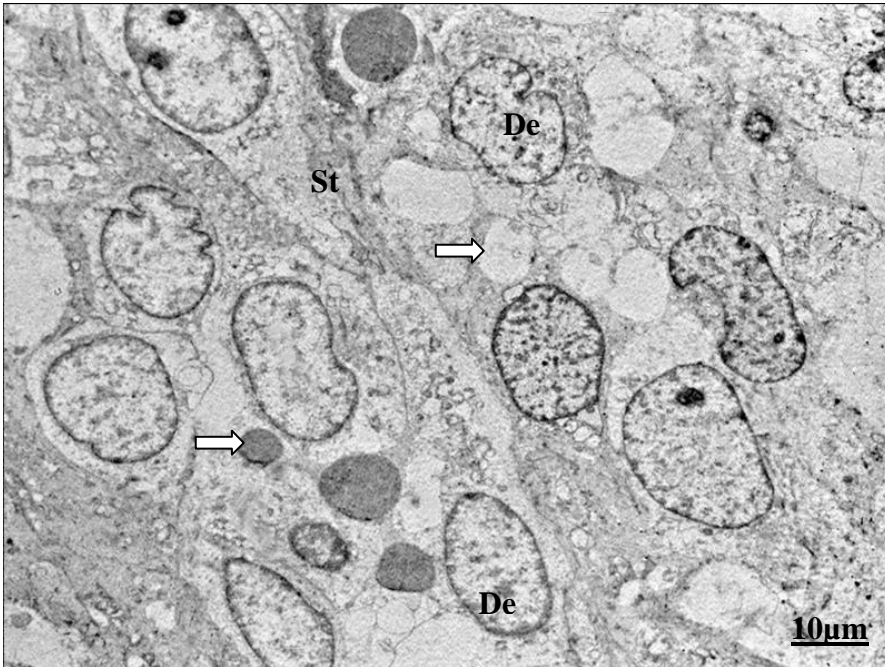


Şekil 4.20. Fertil grup yüzey epitel hücrelerinde bazal yerleşimli çekirdekler X6000. Hücre bazalinde çok sayıda vakuoller gözlenmekte. Dörtlü ok; çekirdek, bükülü ok; çekirdekçik, siyah ok; bazal lamina, Va; vakuol.



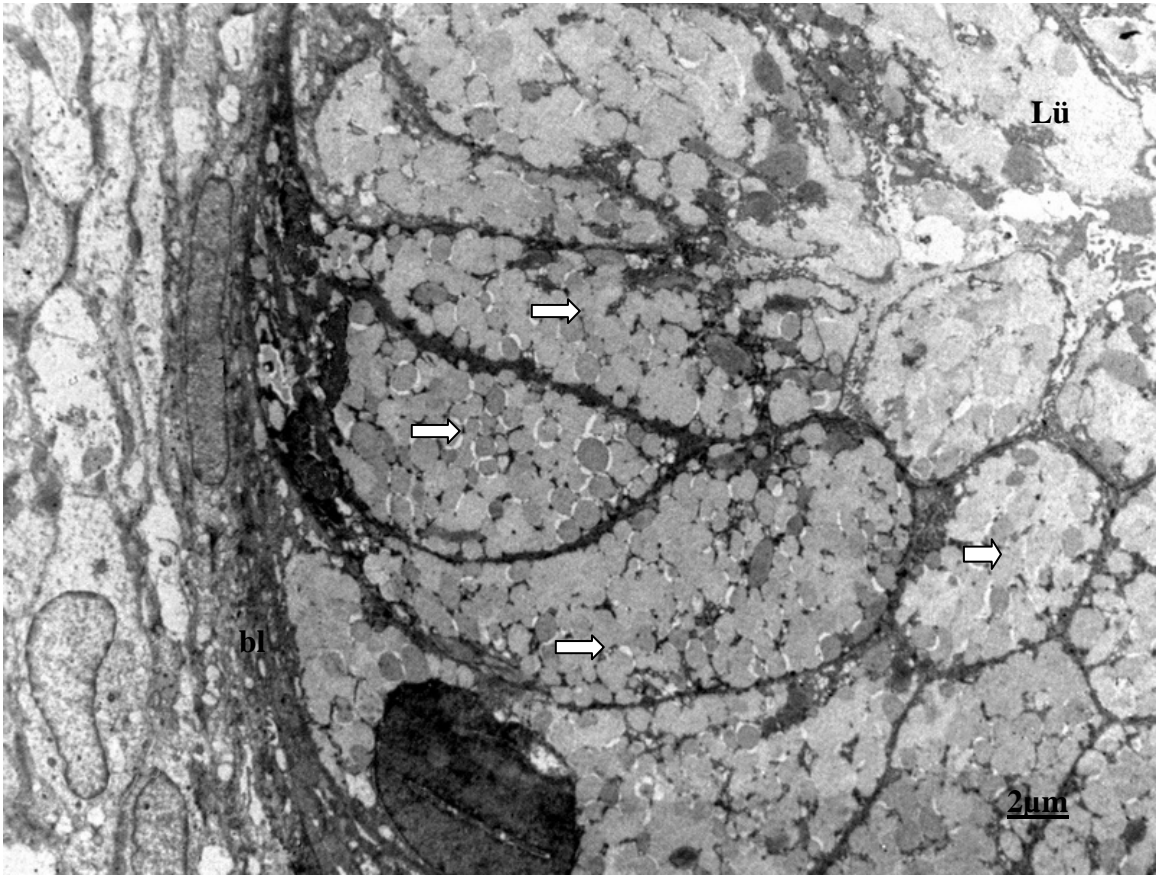
Şekil 4.21. Fertil grupta yüzey epitel hücreleri arasında hücre bağlantıları X20.000. Bükülü ok; mikrovillüs, siyah ok; hücre bağlantıları, beyaz ok; sitoplazma içinde dağılmış glikojen tanecikleri, Va; vakuol.

Bazal lamina altında yer alan stroma, hücre yoğunluğu açısından zengindi. Stromada ökromatik çekirdekli desidual reaksiyon gösteren hücreler yaygındı. Bu hücrelerin sitoplazmalarında irili ufaklı salgı vakuolleri gelişigüzel dağılmış olarak görüldü (Şekil 4.22).

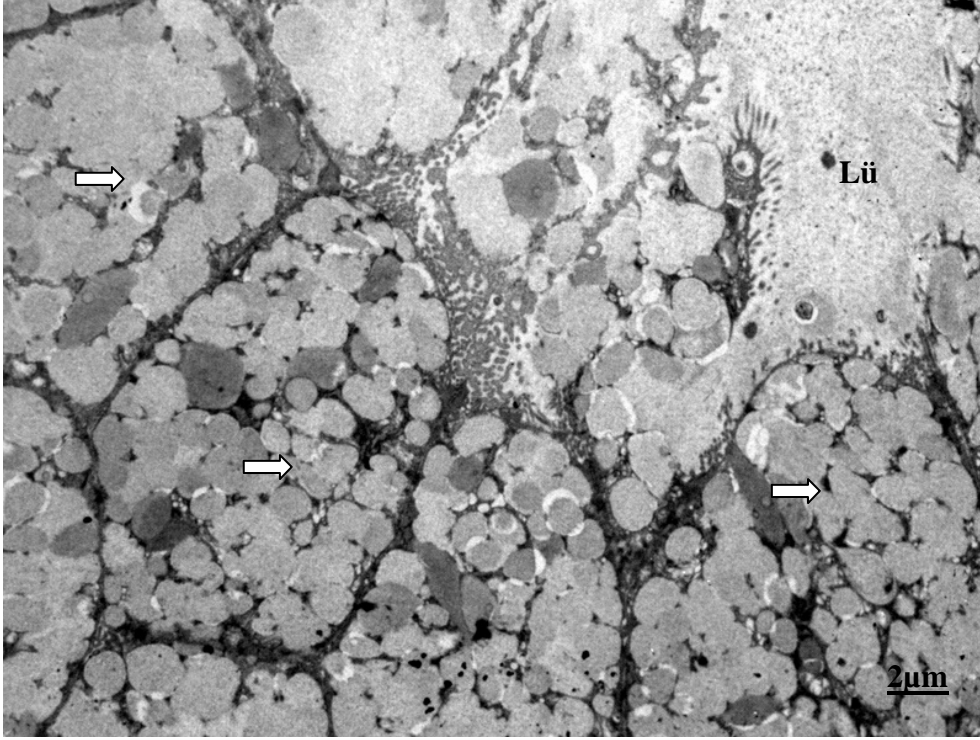


Şekil 4.22. Fertil grup endometriyum stroması X3000. Desidua benzeri stromal hücreler izlenmekte. De: Desidual hücre çekirdekleri, St; stroma, beyaz ok; lipid ve diğer salgı vakuolleri.

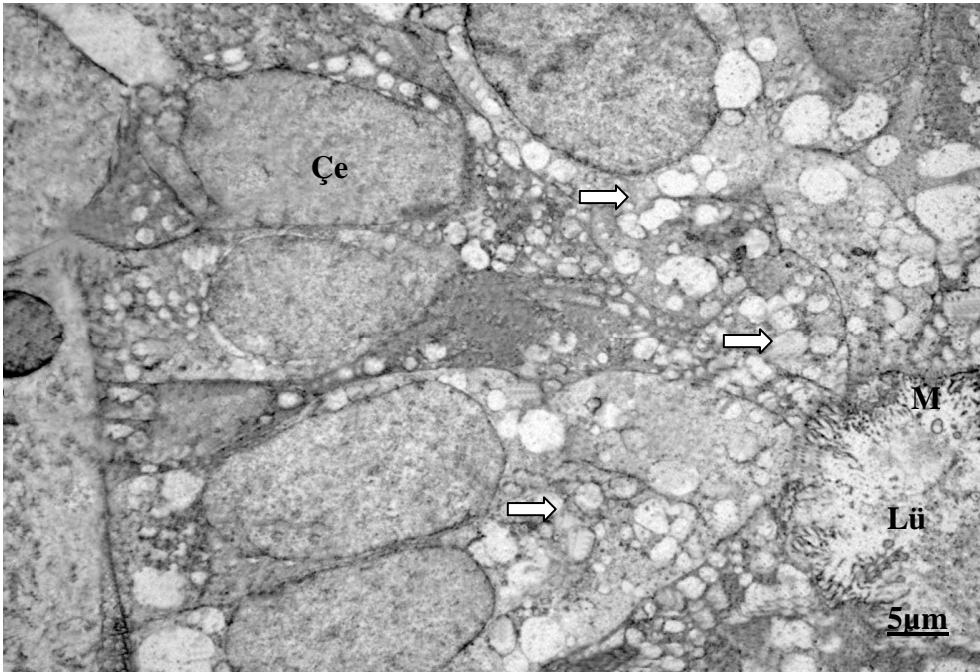
Bez epitel hücreleri, ileri derecede salgı yapma özelliğinde ve oldukça fazla sayıda idi (Şekil 4.23, Şekil 4.24). Epitel hücrelerinin lümeneye bakan yüzeyinde düzensiz mikrovillüsler izlenmekteydi (Şekil 4.25). Salgı hücrelerinin çekirdeğinin çevresi ve daha çok apikal sitoplazma çok sayıda salgı vakuolleri ile doluydu. Aynı zamanda lümen, salgı materyallerinden oldukça zengin görünümdeydi. Salgı hücrelerinin oval yapıdaki önkromatik olan çekirdekleri hücrenin bazaline yakın yerleşimde izlenmekteydi (Şekil 4.25).



Şekil 4.23. Fertil grup salgı yapan bez epitel hücreleri X12.000. bl; bazal lamina, beyaz ok; salgı vakuolleri, Lü; bez lümeni.



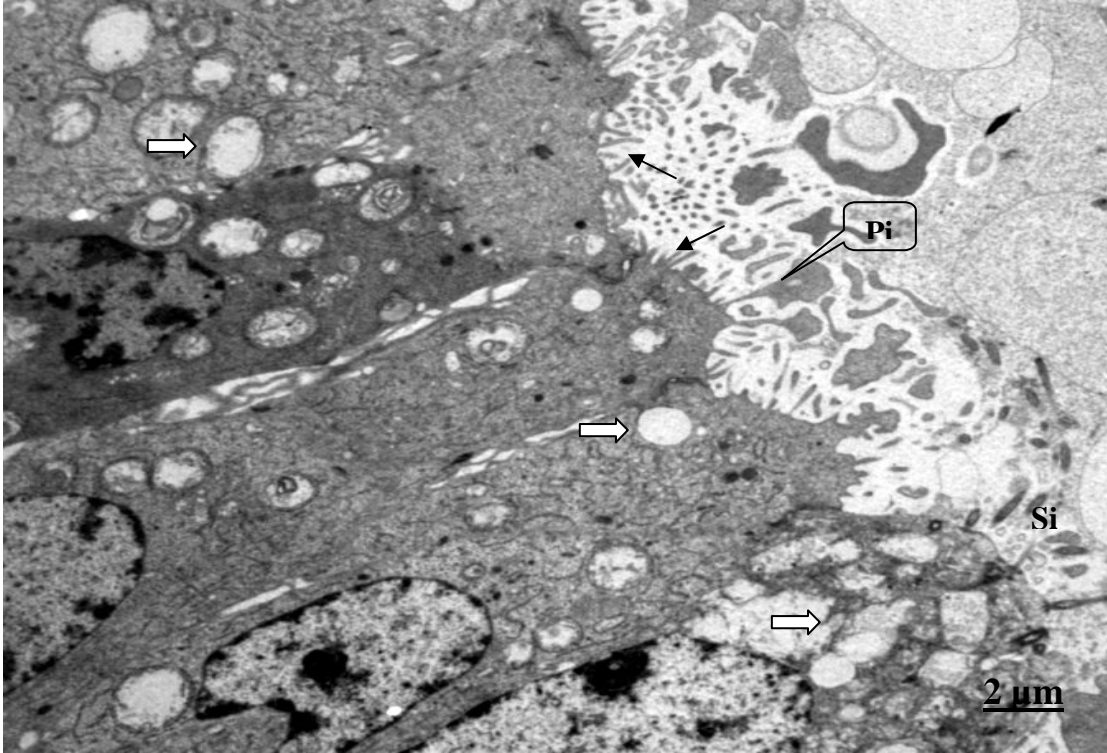
Şekil 4.24. Fertil grupta salgı vakuolleriyle dolu bez epitel hücreleri X15.000. Beyaz ok; salgı vakuolleri, Lü; bez lümeni.



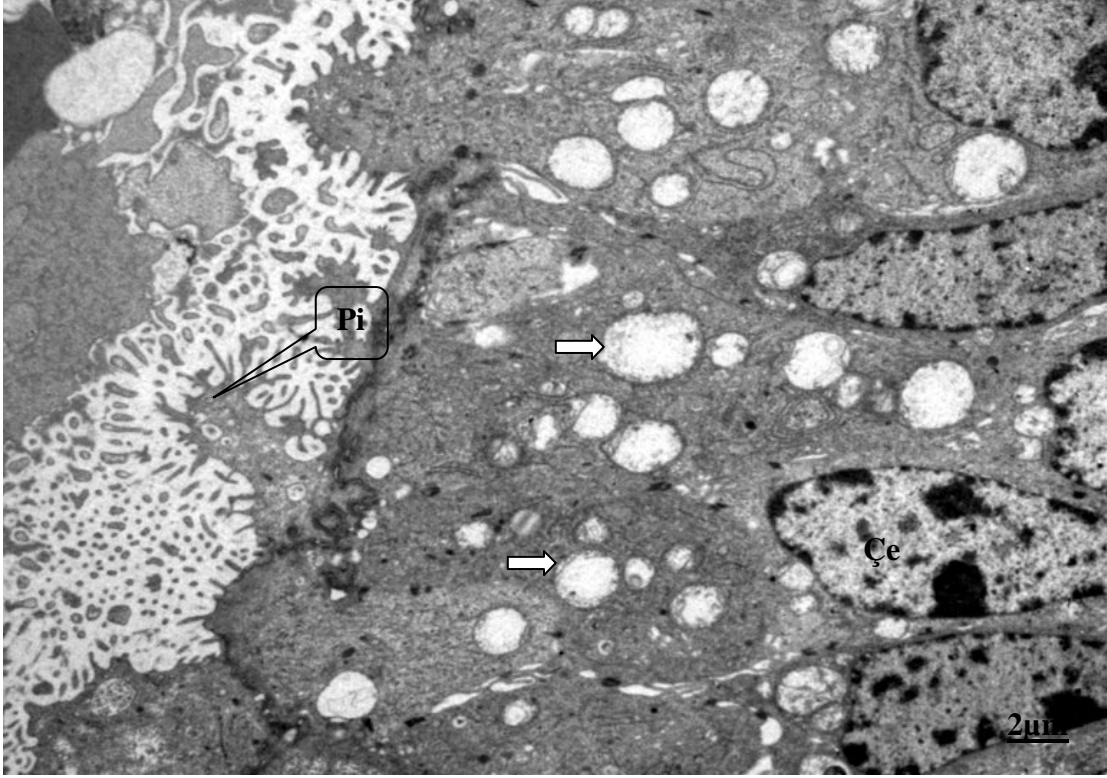
Şekil 4.25: Fertil gupta salgı hücrelerinden oluşan bez epitel hücreleri X3000. Beyaz ok; salgı vakuolleri, Lü; bez lümeni, Çe; çekirdek, M; mikrovillüs.

4.3.2. TİB Grubu Endometriyum Dokusu Elektron Mikroskopik Görüntüleri:

Endometriyumun yüzey epitelinin alçak silindirik hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlanan bu hücrelerin oldukça koyu boyandıkları izlendi. Çoğu hücrelerin apikalinde çok sayıda düzensiz mikrovillüsler vardı, bu hücrelerin arasında daha seyrek olarak silyuma sahip hücrelere rastlandı. Mikrovillüslü hücrelerin bazılarında lümeneye doğru sitoplazmik uzantılar oluştuğu izlendi (Şekil 4.26, 4.27 ve Şekil 4.29). Lümeneye yakın alanlarda salgı vakuelleri de bulunmasına rağmen sağlıklı pinopod yapısı oluşturamadıkları gözlemlendi. Lümeneye atılmış az miktarda pinopod benzeri yapı bulunuyordu (Şekil 4.26, 4.27).

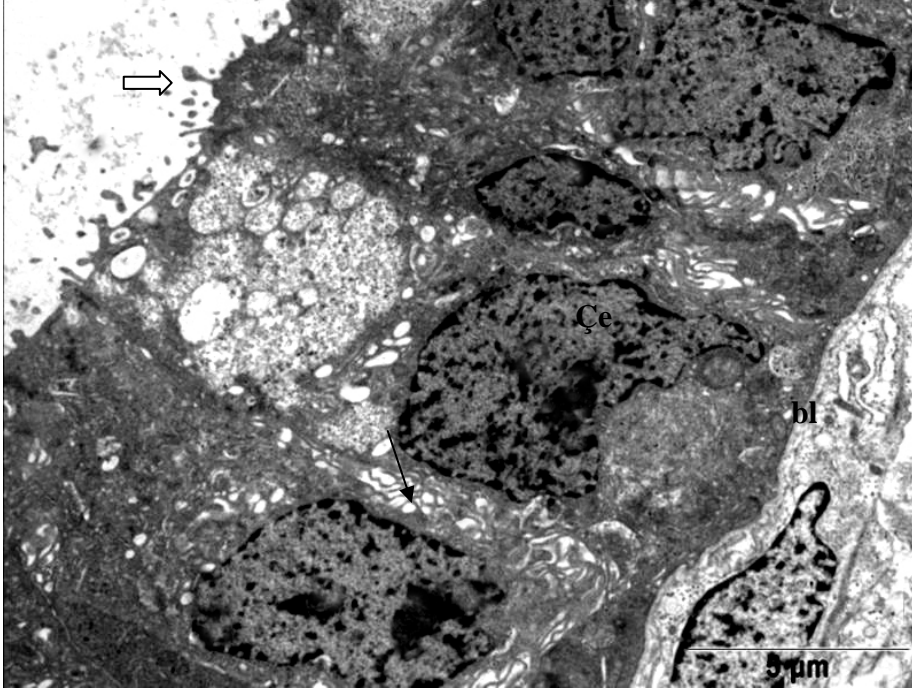


Şekil 4.26. TİB grubu endometriyum yüzey epitelini X7500. Lümeneye uzanan pinopod benzeri yapılar, silyumlar ve mikrovillüsler. Beyaz ok; salgı vakuelleri, siyah ok; mikrovillüsler, Pi; pinopod benzeri yapılar. Si; silyum.

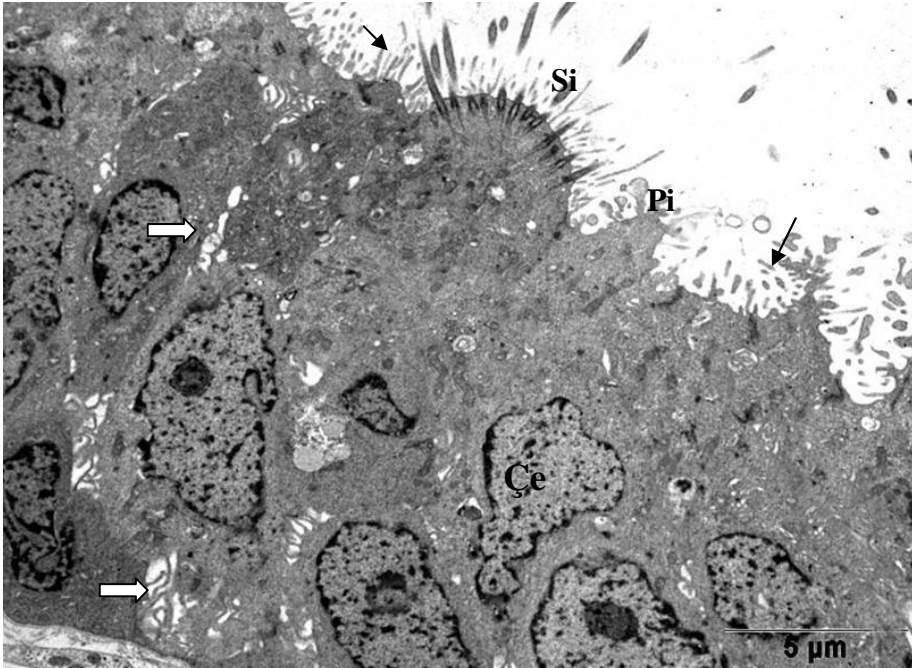


Şekil 4.27. TİB grubunda yüzey epiteli ve pinopod benzeri yapılar X7500. Pi; pinopod benzeri yapılar, beyaz ok; salgı vakuolü, Çe; yüzey epitel hücre çekirdeği.

Salgı vakuolleri oldukça az boyalı açık renkte görünüyordu. Yüzey epitel hücrelerinin sitoplazmasında gelişigüzel dağılmış salgı vakuolleri arasında az sayıda mitokondriyon gözlemlendi. Hücreler arasında bazale yakın genişlemeler izlendi. Hücrelerin çekirdekleri küçük, çoğunlukla heterokromatik, bazılarında ökromatikti. Çekirdekler oval veya kübik şekilli idi, bazı hücrelerin bazalinde, bazı hücrelerin ortaya yakın kısımlarında lokalizeydi (Şekil 4.28, Şekil 4.29).

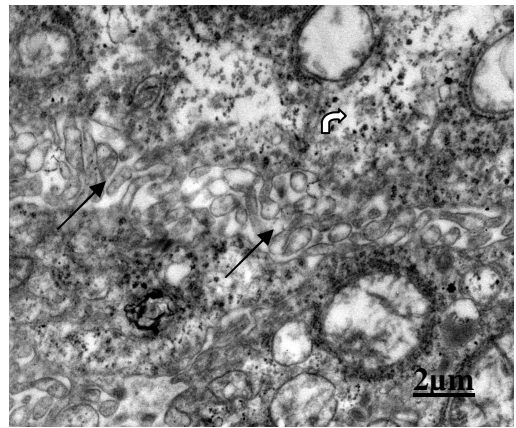
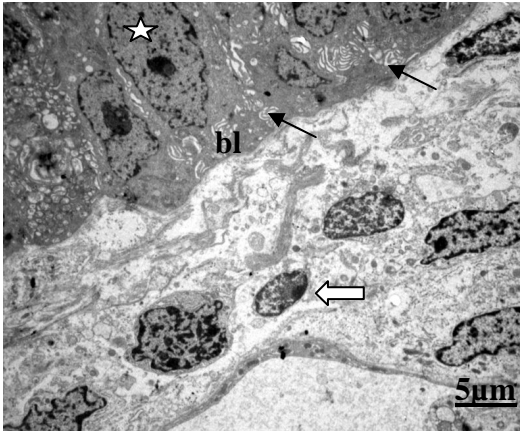


Şekil 4.28. TİB grubunda heterokromatik çekirdekli yüzey epitel hücreleri X6000. Alçak silindirik görünümde heterokromatik çekirdekli yüzey epitel hücreleri. Çe: çekirdek, siyah ok; hücreler arasında interdigitasyonlar, beyaz ok; pinopod benzeri yapılar, bl; bazal lamina.

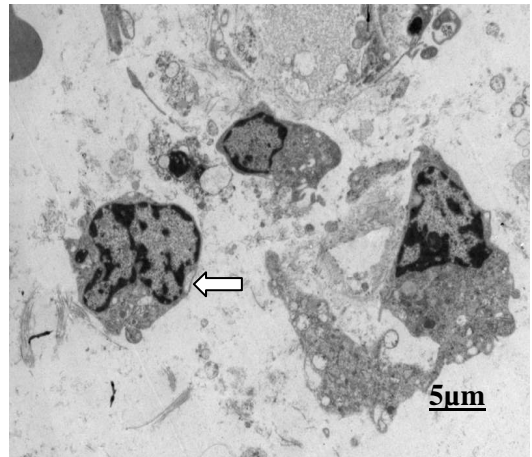
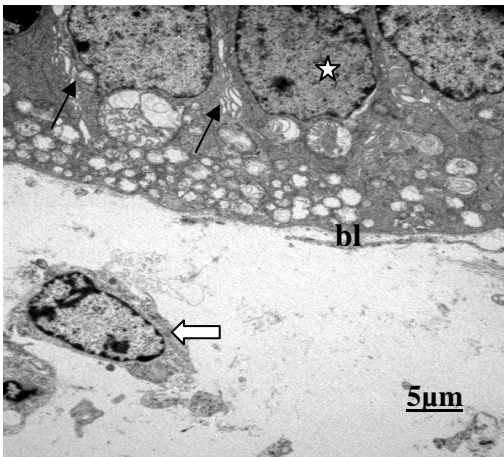


Şekil 4.29. TİB grubunda yüzey epitelinin çekirdek lokalizasyonu ve silyumlar X 6000. Yüzey epitelinin apikalinde silyumlar ve pinopod benzeri yapılar gözlenmekte. Yüzey epitel hücrelerinin çeşitli şekillerde ve düzensiz yerleşimli çekirdekleri, hücreler arasında interdigitasyonlar izlenmekte. Si; silyumlar, Pi; pinopodlar, Çe; çekirdek, beyaz ok; interdigitasyonlar, siyah ok; mikrovillüsler.

Bu gruptaki hücreler arası bağlantı kompleksleri apikale yakın alanlarda belirgindi. Ancak daha çok bazale ve ortaya yakın alanlarda komşu hücreler arasında aşırı genişlemeler gözlemlendi (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Bazal lamina altında uzanan stromada az sayıda stromal hücre bulunmaktaydı. Çeşitli boyutlarda olan stromal hücrelerin çekirdekleri de değişik görüntü ve boyutta idi, ince sitoplazmaları bulunmaktaydı (Şekil 4.32).

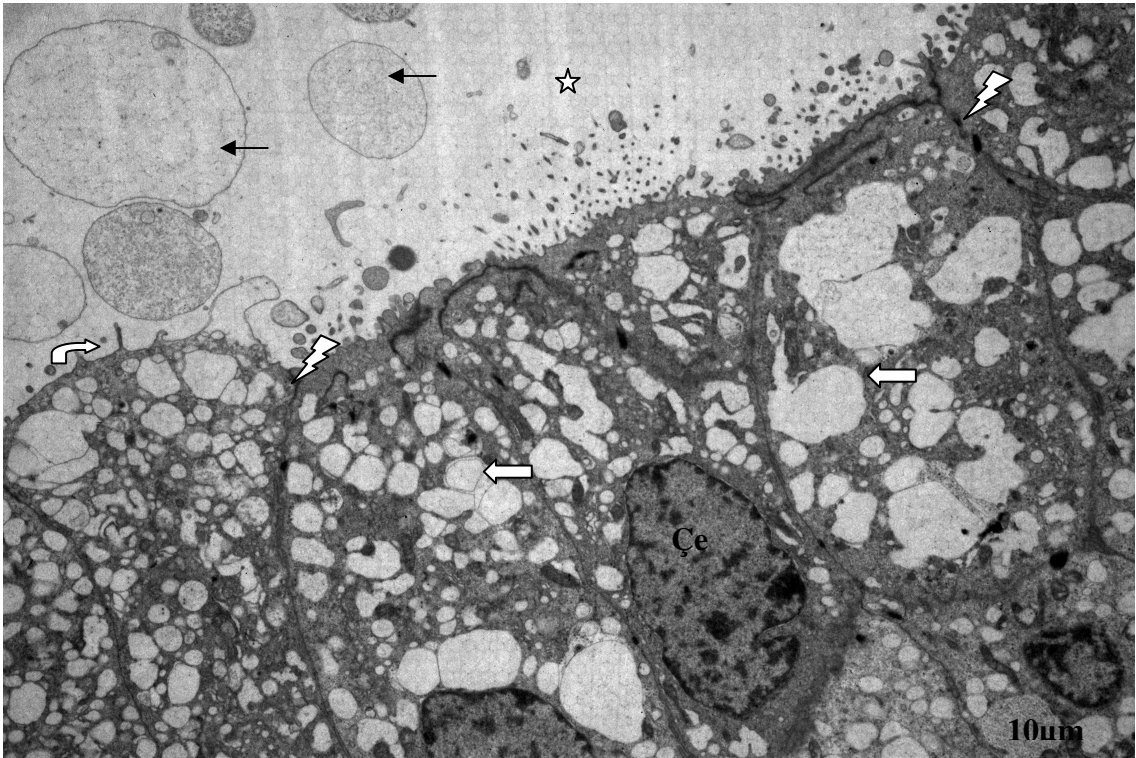


Şekil 4.30 ve Şekil 4.31. TİB grubunda endometriyal epitelin bazal laminası altında stroma X5000 ve hücreler arası interdigitasyonlar ve X12000. Sol üstteki şekilde az sayıda stromal hücre izlenmekte. Sağ üstte; epitel hücreleri arasında interdigitasyonlar. Bl; bazal lamina, beyaz ok; stromal hücre, yıldız; yüzey epitelinin çekirdekleri, siyah ok; interdigitasyonlar, bükülü ok; glikojen tanecikleri.

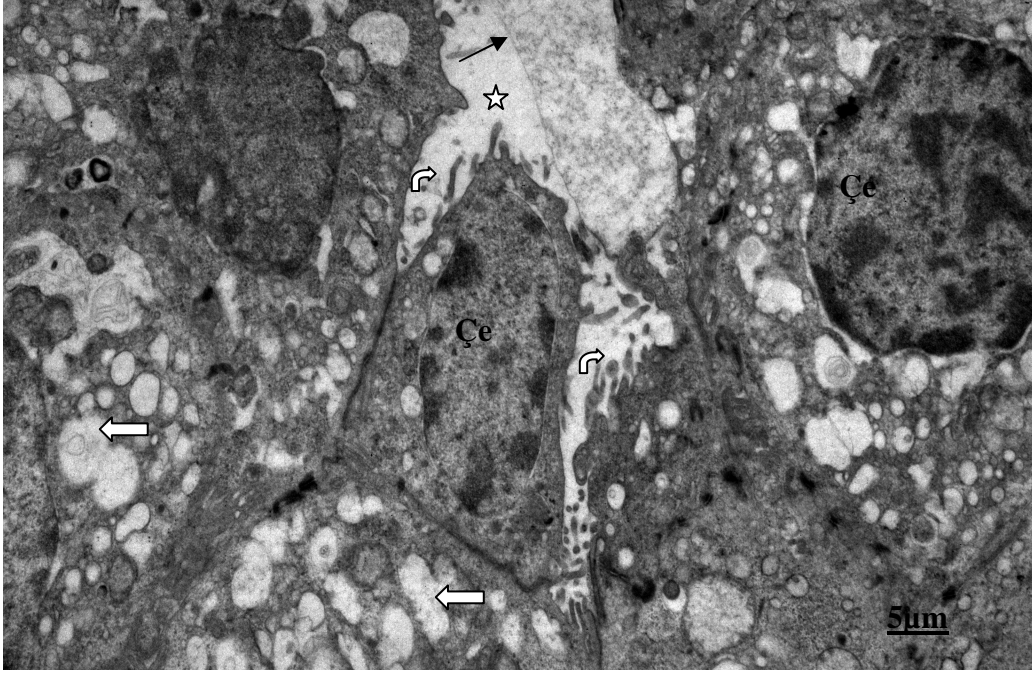


Şekil 4.32. TİB grubu stromal hücreler X5000. Sol üstteki şekilde bazal lamina altında stroma, sağ üstte ince sitoplazmaya sahip stromal hücreler izleniyor. Beyaz ok; stromal hücre, yıldız; yüzey epitelinin çekirdekleri, bl; bazal lamina.

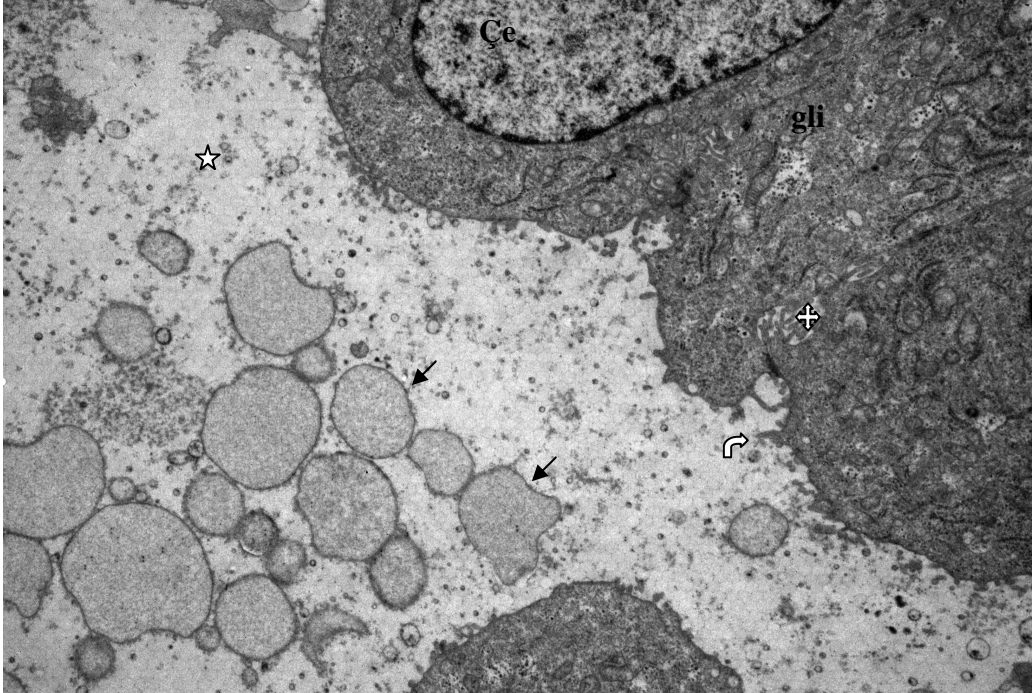
Salgı yapan hücrelerden oluşmuş bez epiteli incelendiğinde; epitelin genellikle silindirik veya alçak silindirik hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Hücrelerin lümenine bakan uçları çok sayıda mikrovillüse sahipti. Yer yer lümenine doğru çok sayıda vakuoller olan salgı hücrelerine rastlandı. Bu hücrelerin yer aldığı bezlerin lümeninde de değişen miktarda salgı materyali bulunmaktaydı (Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35). Bazı olgularda ise bez epitelinin lümeni yanı sıra bazalinde de salgı vakuollerini gözlemlendi. Hücrelerin bir kısmının sitoplazmasında yaygın ve bol miktarda glikojen kümeleri izlendi (Şekil 4.35, Şekil 4.36). Hücreler ökromatik görünümlü, değişen boyut ve yerleşimde çekirdeklere sahipti. Çekirdekler bazale yakın, bir kısmında ise merkezi yerleşimliydi (Şekil 4.33, Şekil 4.34). Bez epitelinin salgı hücreleri arasında bazı olgularda sıkı bağlantılar iyi gelişmiş olmakla birlikte, bazı olgularda hücreler arasında yer yer interdigitasyonlara rastlandı (Şekil 4.33, Şekil 4.35).



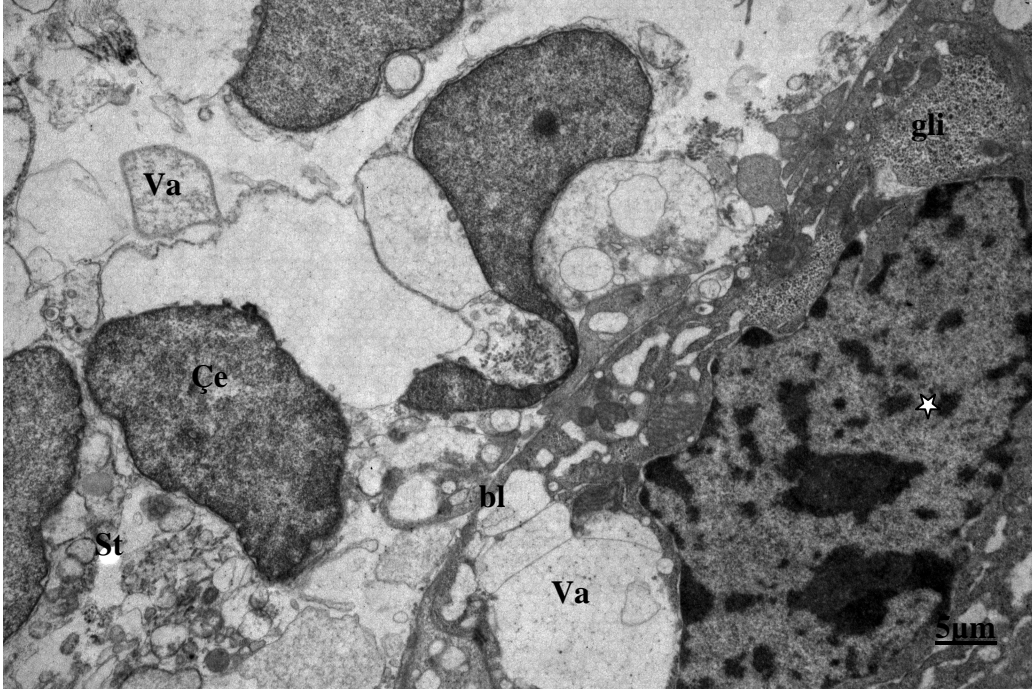
Şekil 4.33. TİB grubu bez epitel hücreleri X3000. Lümenine salgı materyali bırakmış olan çeşitli büyüklüklerde salgı vakuolüne sahip bez epitel hücreleri izleniyor. Bükülü ok; mikrovillüs, beyaz ok; salgı vakuolü, siyah ok; salgı materyali, Çe; epitel hücre çekirdeği, şimşek işareti; sıkı bağlantı.



Şekil.4.34. TİB grubu bez epitel hücreleri X5000. Bükülü ok; mikrovillüs, beyaz ok; vakuol, siyah ok; salgı materyali, Çe; çekirdek, yıldız; lümen.



Şekil 4.35. TİB grubu bez epitel hücreleri X7500. Lümeneye salgı materyali bırakmış olan bez salgı hücreleri izleniyor. Bükülü ok; mikrovillüs, siyah ok; salgı materyali, Çe; çekirdek, yıldız; lümen, gli; glikojen tanecikleri, dörtlü ok; interdigitasyonlar.

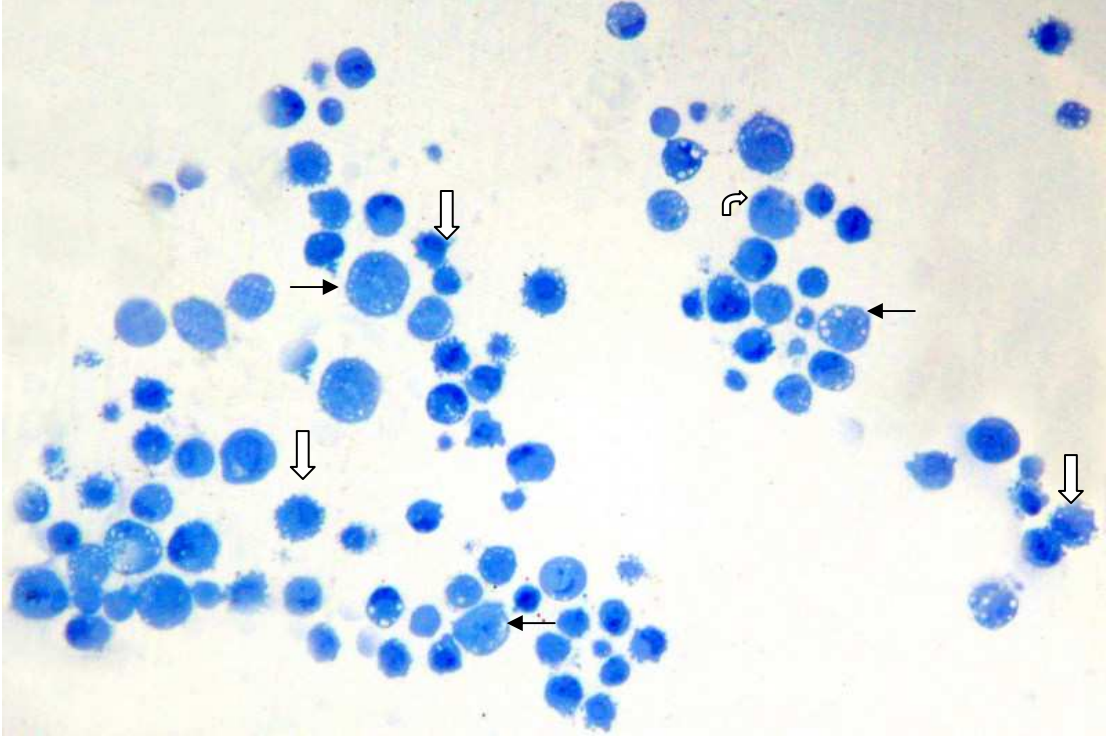


Şekil 4.36. T1B grubu bez epitel hücreleri ve stroma X6000. Salgı hücrelerinin bazal laminası komşuluğunda stromal hücreler gözlenmekte. Çe; stromal hücre çekirdeği, bl; bazal lamina, St; Stroma, Va; Salgı vakuölü, yıldız; bez epitel hücre çekirdeği, gli; glikojen kümeleri.

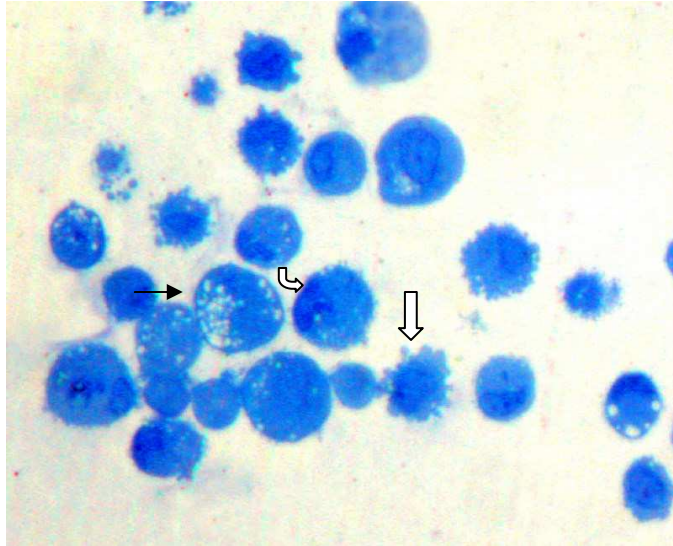
..4.4. ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR HÜCRELERİ YARI-İNCE KESİTLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

...4.4.1. Fertil Grubun Endometriyum Kokültür Hücreleri Yarı-ince Kesitleri

Bu gruptaki kokültür hücreleri incelendiğinde, özellikleri bakımından farklı üç grup hücre olduğu belirlendi: Birinci grup hücreler “vakuollü hücreler” olarak adlandırıldı. Bunlar diğer hücreler arasında en büyük boyutlu hücrelerdi. Bu hücrelerin seyrek olarak sıralanmış, düzensiz mikrovillüsleri vardı, sitoplazmaları çok sayıda vakuol içeriyordu ve çekirdekleri ökromatikti. Çekirdeklerde belirgin çekirdekçik izleniyordu (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Fertil grup kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X20. Siyah ok; vakuollü hücre, beyaz ok; sitoplazmik uzantılı hücre, bükülü ok; mikrovillüslü hücre.

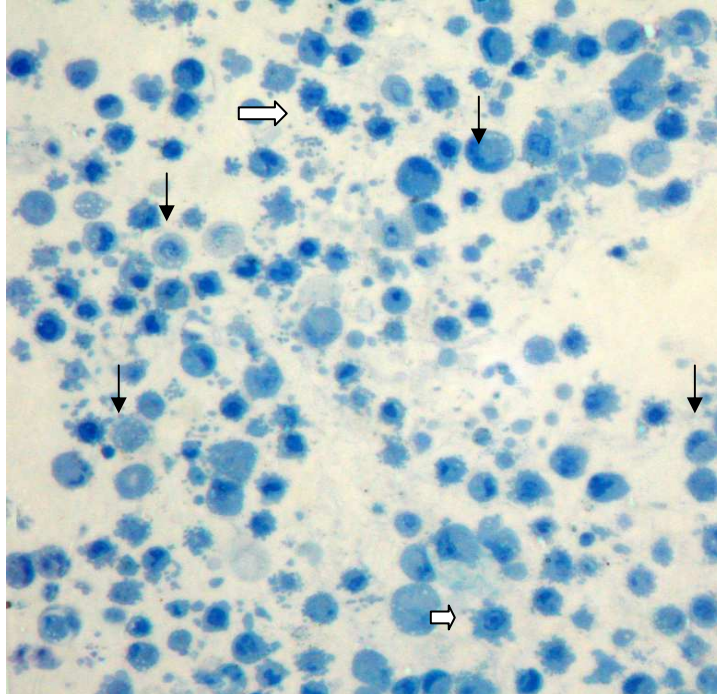


Şekil 4.38. Fertil grup kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X40. Vakuollü, mikrovillüslü ve sitoplazmik uzantılı hücreler. Siyah ok; vakuollü hücre, beyaz ok; sitoplazmik uzantılı hücre, bükülü ok; mikrovillüslü hücre.

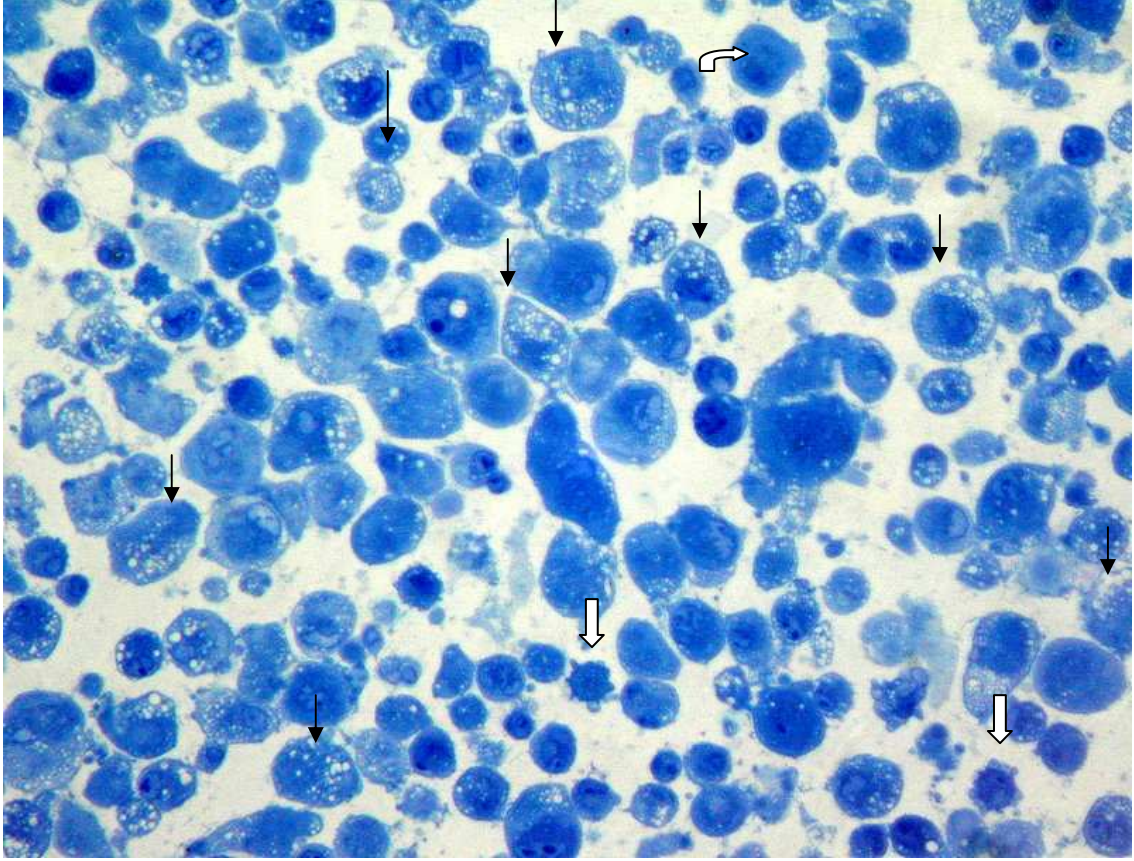
İkinci grup hücreler; orta büyüklükte ve sitoplazmalarında az sayıda vakuoller içeren hücrelerdi. Belirgin mikrovillüsleri nedeniyle “mikrovillüslü hücreler” olarak adlandırıldı. Çekirdekleri heterokromatik ve bir kenara itilmiş, yarım ay görünümünde idi. Üçüncü grup hücreler ise “sitoplazmik uzantılı hücreler” olarak tanımlandı. Hücreler değişik büyüklüklerde idi, sitoplazmik uzantılara sahiplerdi. Hücrelerin bir kısmında çekirdekler ökromatik bir kısmında heterokromatik görünümdeydi (Şekil 4.38)

4.4.2. TİB Grubunun Endometriyum Kokültür Hücreleri Yarı-ince Kesitleri:

Bu grupta özellikleri açısından farklı üç tip hücrenin varlığı belirlendi. Birinci grup “vakuollü hücreler” şeklinde isimlendirilen iri ve bol vakuollü hücrelerdi. Ökromatik çekirdeklere sahiplerdi. Çoğu çekirdeğin çekirdekçiği de belirgindi. İkinci grup hücreler “mikrovillüslü hücreler” olup, nadiren rastlanan hücrelerdi. Üçüncü grup ise “sitoplazmik uzantılı hücreler” tipindeydi. Çok sayıda sitoplazmik uzantılara sahip bu hücrelerin çekirdekleri genellikle heterokromatik görünümdeydi (Şekil 4.39 ve Şekil 4.40).



Şekil 4.39. TİB grubu kokültür hücrelerinin genel görüntüsü X20. Siyah ok; vakuollü hücre, beyaz ok; sitoplazmik uzantılı hücre.



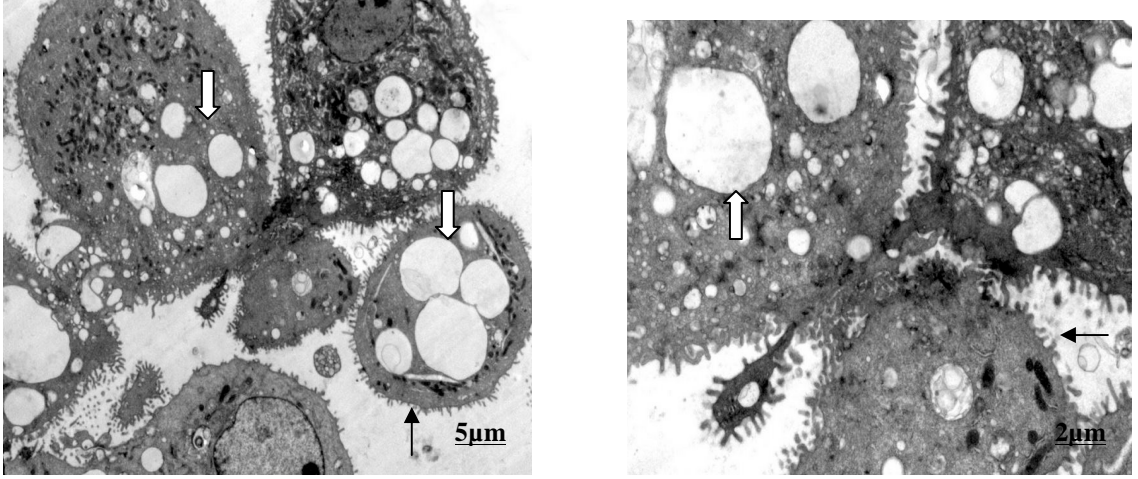
Şekil 4.40. TİB grubu kokültür hücrelerinin görüntüsü X40. Vakuollü, sitoplazmik uzantılı ve mikrovillüslü hücreler ayırt edilebiliyor. Siyah ok; vakuollü hücre, beyaz ok; sitoplazmik uzantılı hücre, bükülü ok; mikrovillüslü hücre.

4.5. ENDOMETRİYAL KOKÜLTÜR HÜCRELERİ İNCE KESİTLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ:

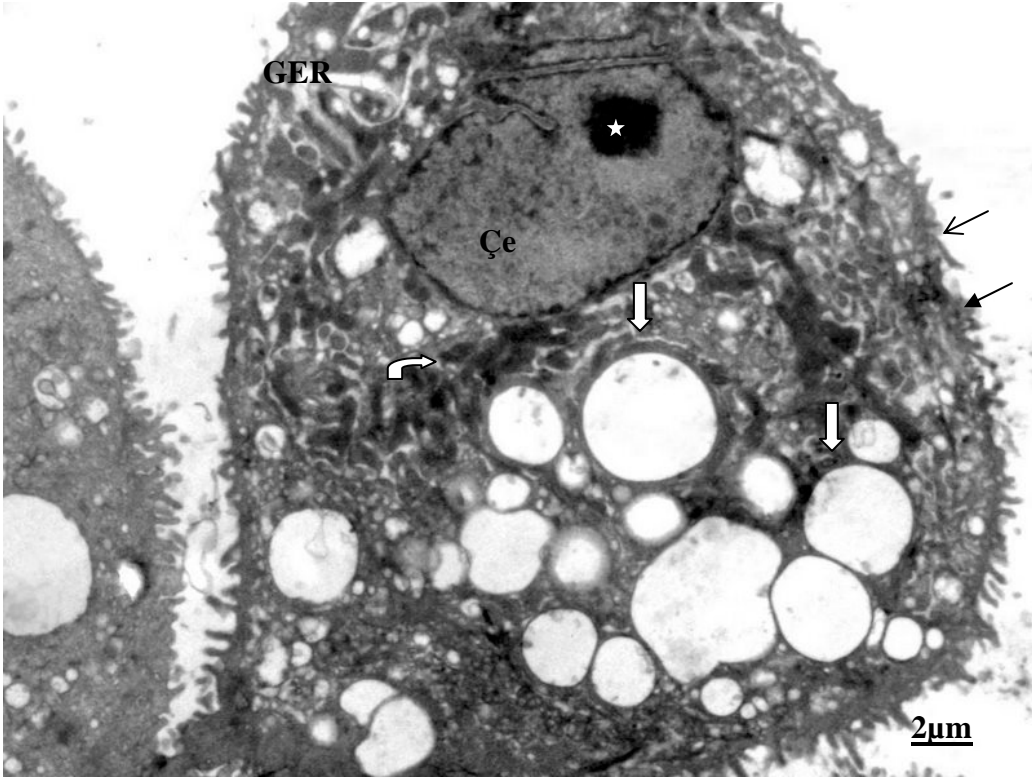
4.5.1. Fertil Grup Endometriyum Kokültür Hücrelerinin İnce Kesitleri:

Özellikleri açısından farklı üç tip hücre olduğu gözlemlendi:

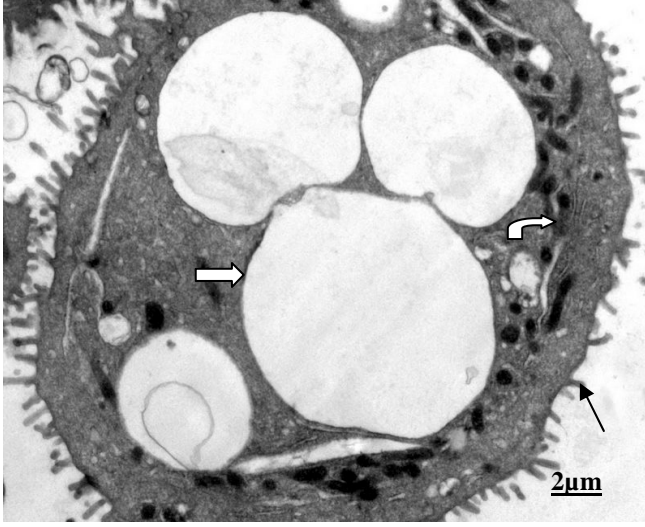
Birinci grup, “vakuollü hücreler” idi. Düzensiz mikrovillüslere sahip bu hücrelerin sitoplazmaları çok sayıda değişik boyutlarda içleri salgı materyaliyle dolu vakuoller içermekteydi. Sitoplazma Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) ve mitokondriyonlar açısından da zengindi. Bu hücrelerin ökromatik çekirdek ve belirgin çekirdekçikleri vardı (Şekil 4.41, Şekil 4.42 ve Şekil 4.43).



Şekil 4.41. Fertil grup vakuollü hücreler ve bağlantıları X5000 ve X7.5000. Beyaz ok; salgı vakuolleri, siyah ok; mikrovillüsler.

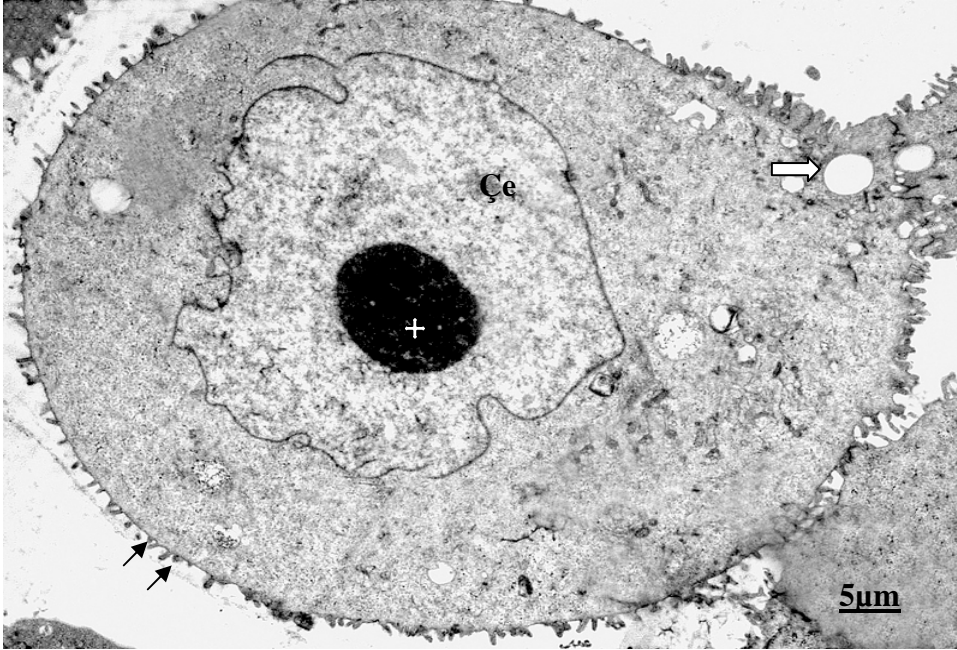


Şekil 4.42. Fertil grup vakuollü hücreler X10.000. Beyaz ok; salgı dolu vakuoller, siyah ok; mikrovillüsler, bükülü ok; mitokondriyonlar, yıldız; çekirdekçik, GER; Granüllü endoplazmik retikulum sisternaları, Çe; çekirdek.

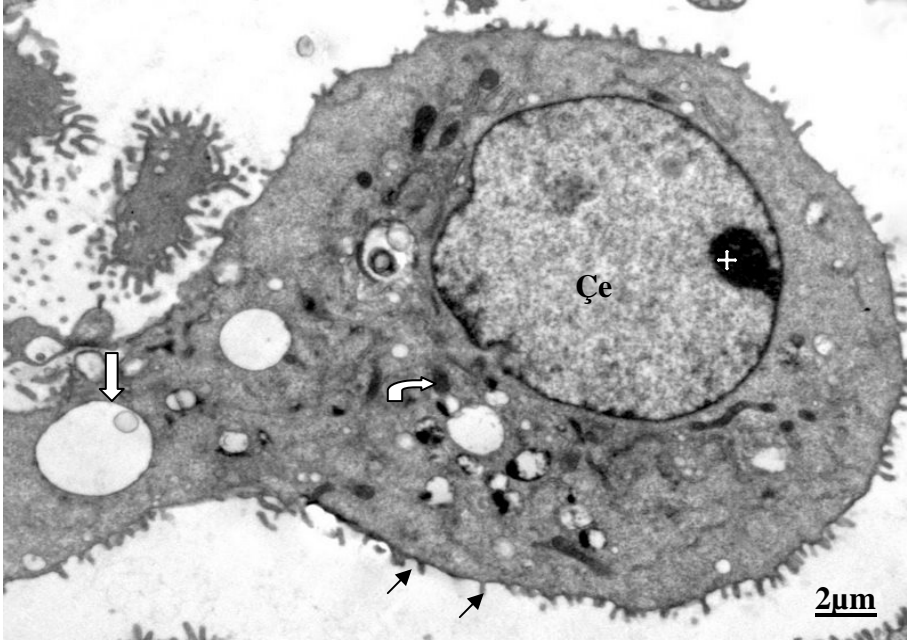


Şekil 4.43. Fertil grup vakuollü hücre X15.000. Beyaz ok; salgı dolu vakuoller, siyah ok; mikrovillüsler, bükülü ok; mitokondriyonlar.

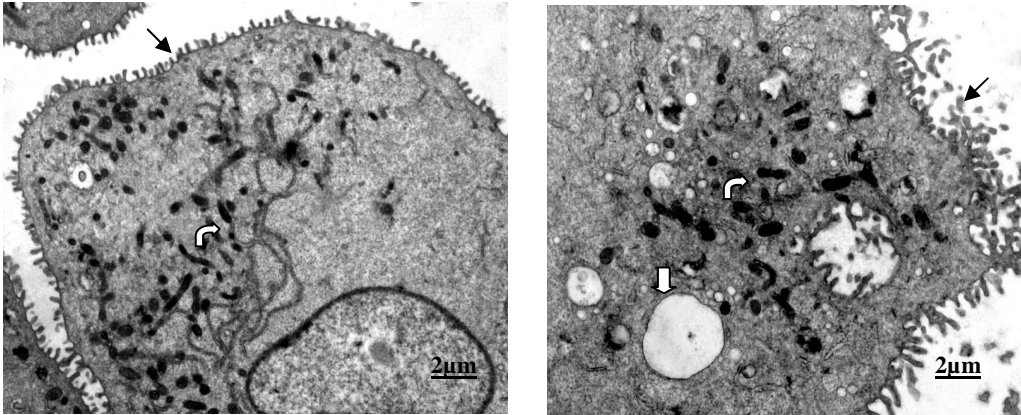
İkinci grup “mikrovillüslü hücreler” olarak değerlendirildi. Bu grupta düzensiz, kısa, çok sayıda mikrovillüsler gözlemlendi. Seyrek de olsa sitoplazmada yer yer vakuoller vardı. Çekirdekleri ökromatik olup, belirgin çekirdekçikleri bulunuyordu (Şekil 4.44, Şekil 4.45). Mikrovillüslü hücrelerin bazılarının sitoplazmaları çok sayıda mitokondriyon içeriyordu (Şekil 4.46).



Şekil 4. 44.Fertil grup mikrovillüslü hücre X5000. Siyah ok; mikrovillüsler, beyaz ok; vakuol, dörtlü ok; çekirdekçik, Çe; çekirdek.

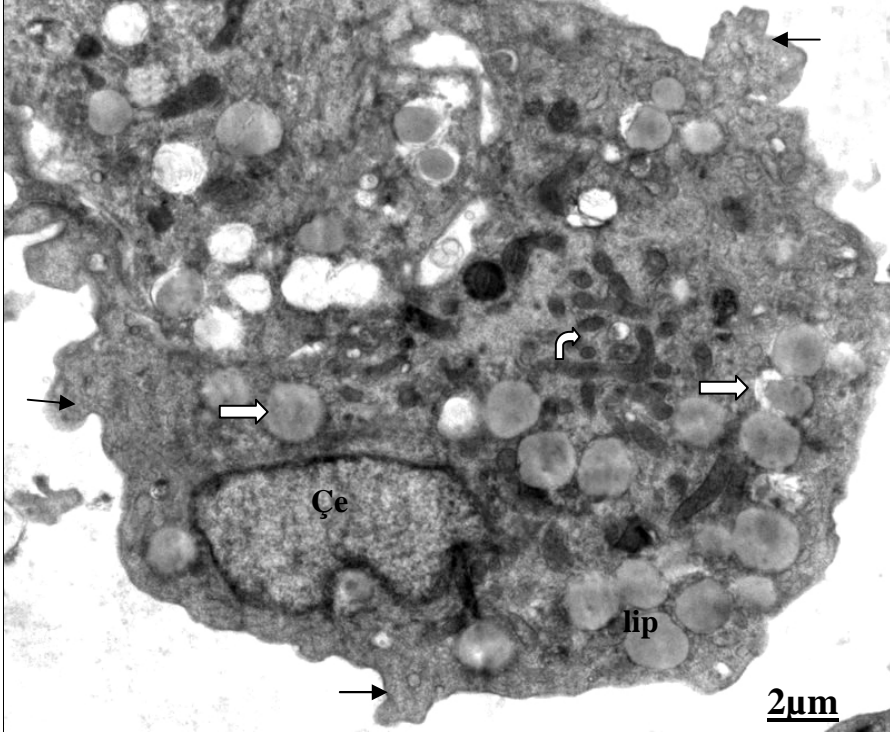


Şekil 4.45. Fertil grup mikrovillüslü hücre X7500. Siyah ok; mikrovillüsler, beyaz ok; vakuol, dörtlü ok; çekirdekçik, bükütlü ok; mitokondriyon, Çe; çekirdek.

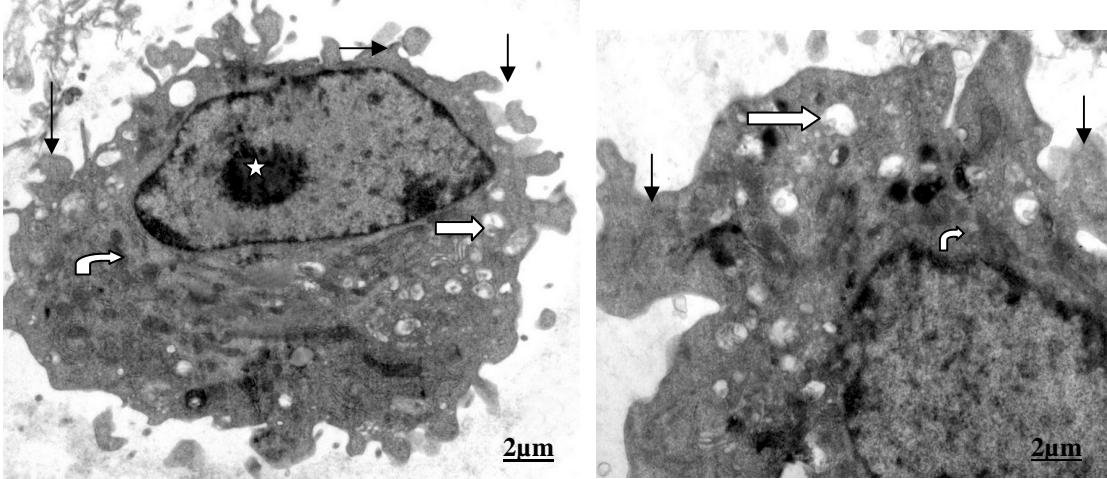


Şekil 4.46. Fertil grup mikrovillüslü hücreler X12.000 ve X15.000. Siyah ok; mikrovillüsler, beyaz ok; vakuol, bükütlü ok; mitokondriyon.

Üçüncü grup “sitoplazmik uzantılı hücreler” idi. Çok sayıda sitoplazmik uzantıları vardı, uzantılar içerisinde lipid vakuolleri ve mitokondriyonlar gözlendi. Çekirdekleri genellikle ökromatik ve ekzantrik yerleşimliydi. Bazılarında çekirdekçikler belirgindi (Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).



Şekil 4.47. Fertil grup sitoplazmik uzantılı hücre X10.000. Beyaz ok; salgı vakuolleri, siyah ok; sitoplazmik uzantılar, bükülü ok; mitokondriyon, lip; yağ vakuolleri, Çe; çekirdek.

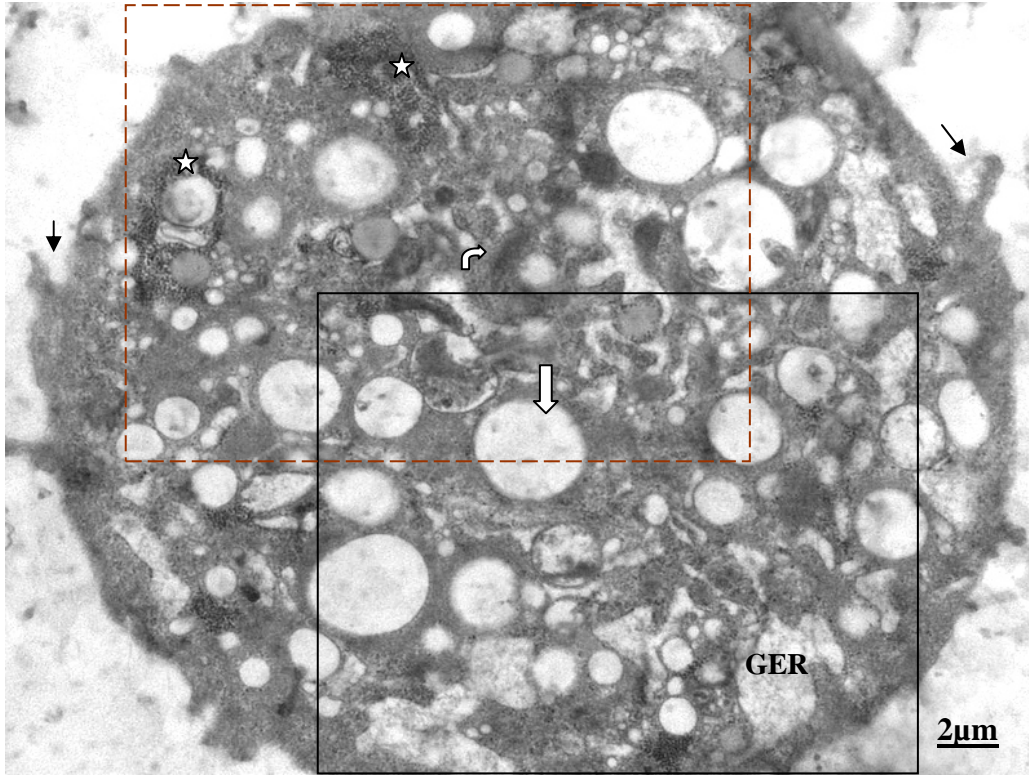


Şekil 4.48. Fertil grup sitoplazmik uzantılı hücreler X10.000 ve X20.000. Beyaz ok; salgı vakuolleri, siyah ok; sitoplazmik uzantılar, bükülü ok; mitokondriyon, yıldız; çekirdekçik.

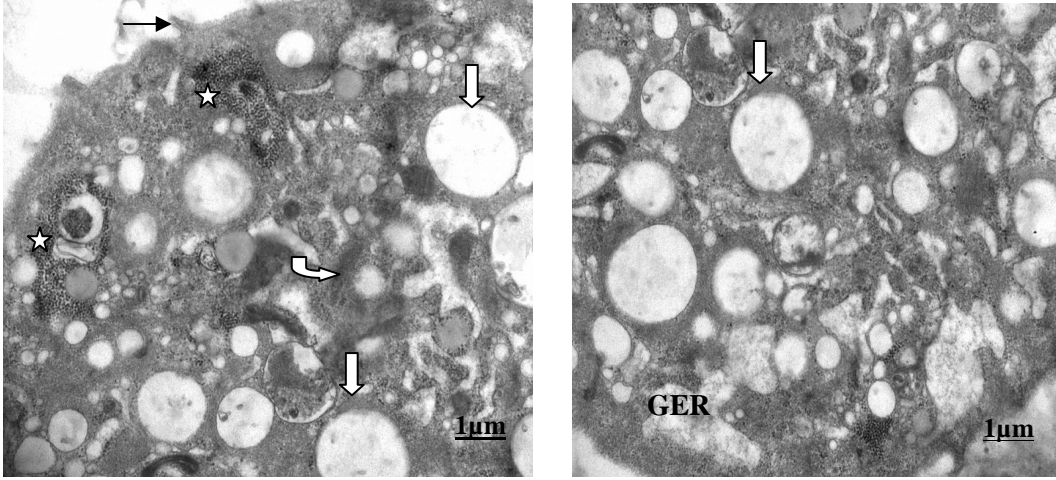
4.5.2. TİB Grubunun Endometriyum Kokültür Hücrelerinin İnce Kesitleri:

Morfolojik özellikleri açısından farklı üç tip hücre olduğu gözlemlendi:

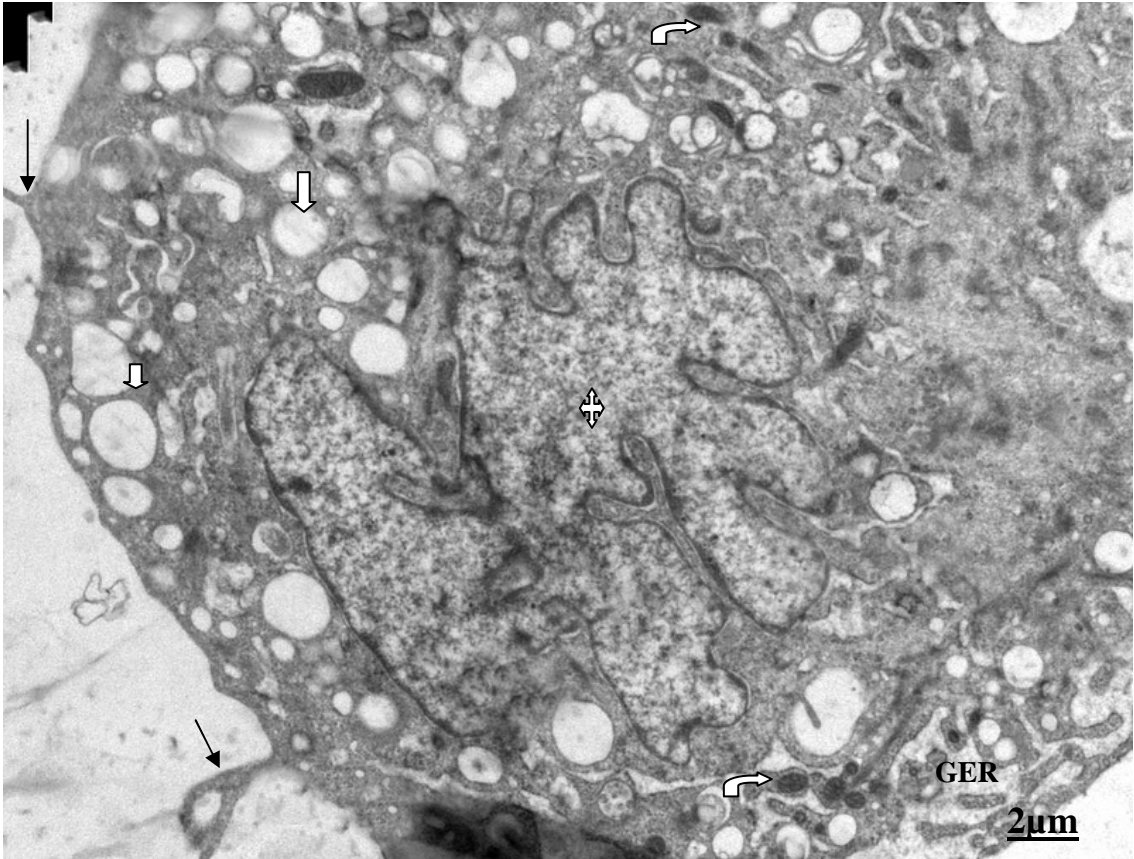
Birinci grup “vakuollü hücreler” idi. Bu hücreler çok sayıda, irili ufaklı vakuollere sahipti. Bir kısım hücrede mikrovillüsler yok denecek kadar azken, bir kısım hücrede bol miktarda mikrovillüsler izlendi. Hücrelerin mikrovillüsleri çoğunlukla kısa düzensiz olup, bazı olgularda uzun düzensiz görünümdeydi. Sitoplazmada GER çok gelişmişti, sisternaları çok sayıda ve genişlemiş olarak izleniyordu ve çok sayıda mitokondriyon bulunmaktaydı (Şekil 4.49, Şekil 4.50). Çekirdekler girintili çıkıntılı ve ökromatik olarak gözlemlendi (Şekil 4.51).



Şekil 4.49. TİB grubu vakuollü hücre X15.000. Hücre sitoplazması içinde çok sayıda vakuol, genişlemiş GER sisternaları mitokondriyonlar ve sitoplazmaya dağılmış glikojen kümeleri gözlenmekte. Beyaz ok; salgı dolu vakuoller, bükülü ok; mitokondriyon, yıldız; glikojen kümeleri, siyah ok; mikrovillüs, GER; Granüllü Endoplazmik Retikulum.



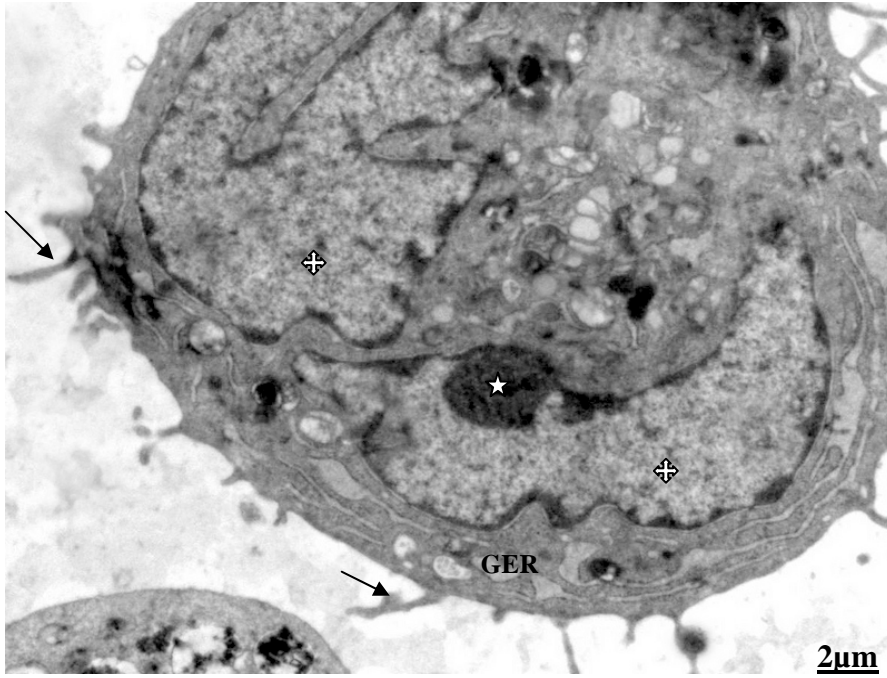
Şekil 4.50. Yukardaki TİB grubu vakuollü hücrenin seçili alanlarının görüntüsü X15.000. Beyaz ok; salgı dolu vakuoller, bükülü ok; mitokondriyon, yıldız; glikojen kümeleri, siyah ok; mikrovillüs, GER; Granüllü Endoplazmik Retikulum.



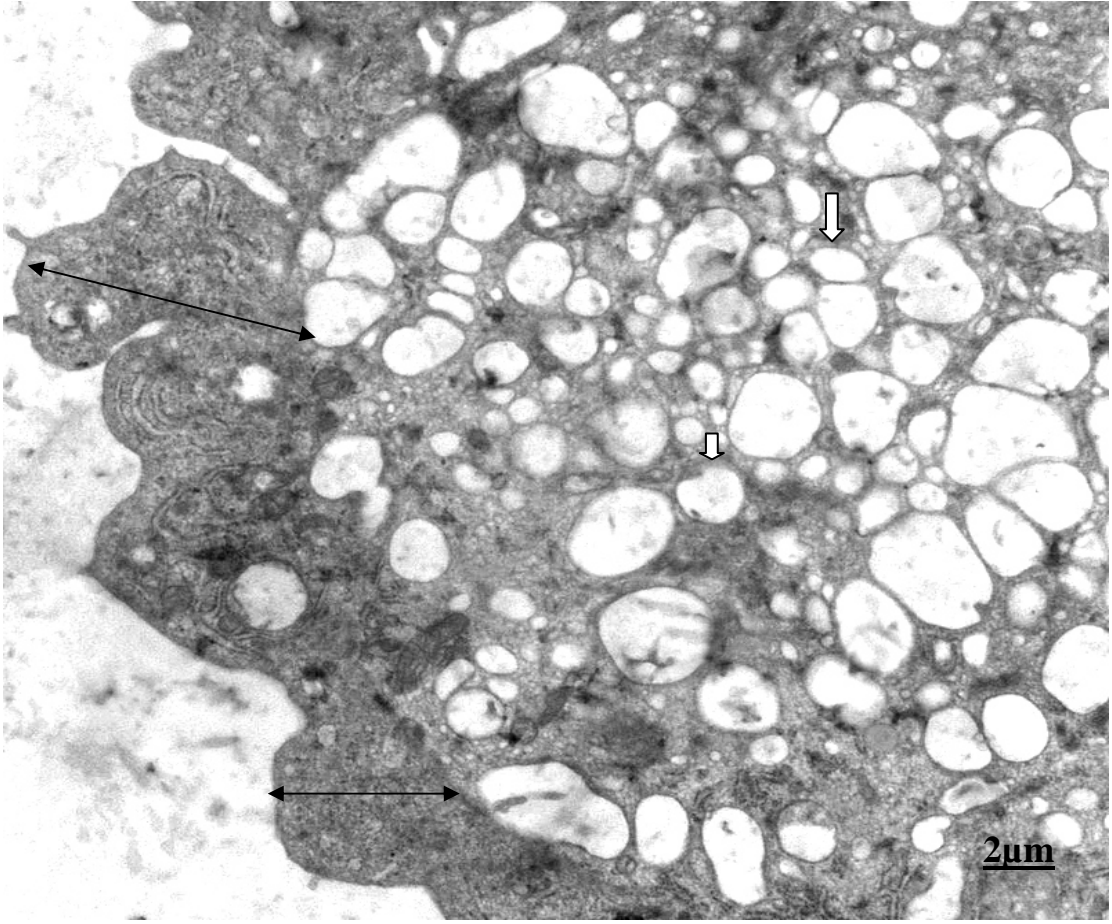
Şekil 4.51. TİB grubu vakuollü hücre X10.000. Ökromatik çekirdek içeren hücrede çok sayıda vakuoller gözlenmekte. Beyaz ok; salgı dolu vakuoller, bükülü ok; mitokondriyon, dört uçlu ok; çekirdek, siyah ok; mikrovillüs, GER; GER sisternaları.

İkinci grup, mikrovillüslü hücreler idi. Çok belirleyici özellikleri olmayan ve çok az sayıda görülen hücre grubuydu. Bu hücrelerin girintili çıkıntılı, ökromatik çekirdekleri mevcuttu (Şekil 4.52).

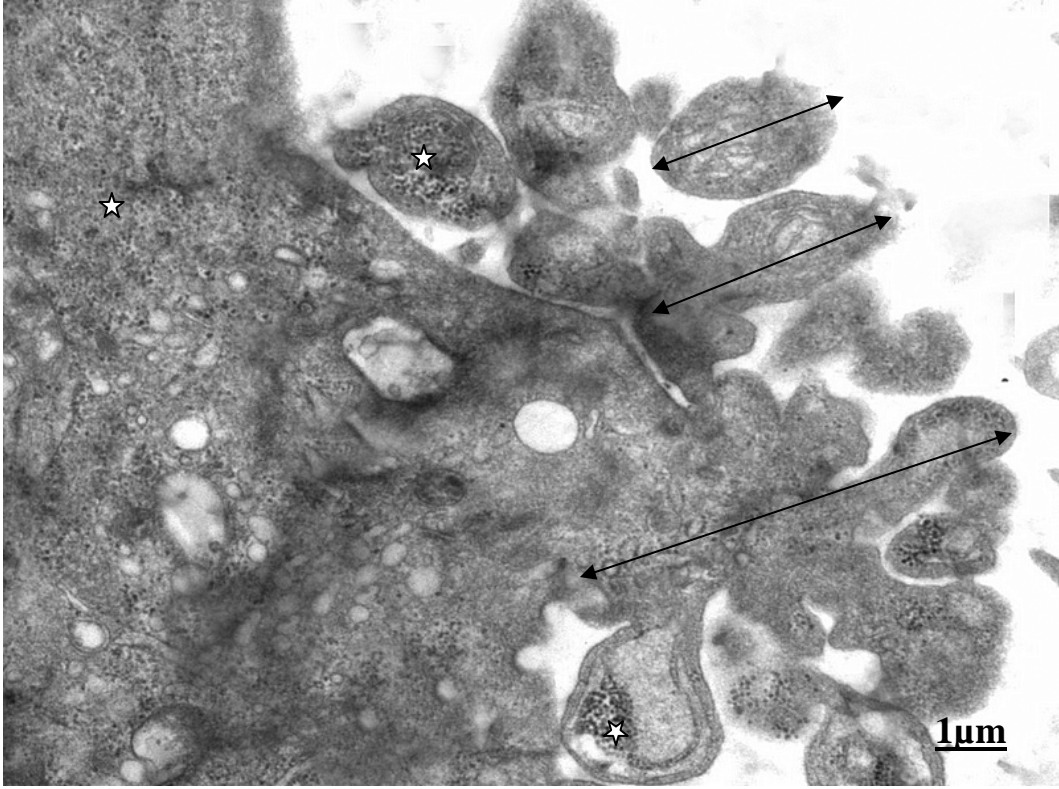
Üçüncü grup, sitoplazmik uzantılara sahip hücrelerdi. Bazı olgularda organelden zengin sitoplazmik uzantılar yanı sıra tüm sitoplazmaya dağılmış çok sayıda vakuol gözlenirken bazı olgular az sayıda vakuol içeren sitoplazmaya sahipti (Şekil 4.53). Hücreler arasında kutuplaşma eğilimi gösterenler de vardı. Bu kutuplaşma hücrenin sitoplazmik uzantılarının bir yöne toplanması ve tomurcuklanma göstermesi şeklindeydi (Şekil 4.54).



Şekil 4.52. TİB grubu mikrovillüslü hücre X10.000. Siyah ok; mikrovilüs, dörtlü ok; çekirdek, yıldız; çekirdekçik, GER; GER sisternaları.



Şekil 4.53. TİB grubu sitoplazmik uzantılı hücre X10.000. İçinde çok sayıda vakuol içeren hücrenin belirgin sitoplazmik uzantılara sahip olduğu gözlenmektedir. Çift taraflı ok; sitoplazmik uzantılar, beyaz ok; vakuoller.



Şekil 4. 54. TİB grubu sitoplazmik uzantılı hücre X25.000. Hücrenin sitoplazmik uzantılarla kutuplaştığı ve uzantıları yanı sıra sitoplazmanın her yerine yayılmış glikojen tanecikleri gözleniyor. Yıldız; glikojen tanecikleri, çift yönlü ok; sitoplazmik uzantılar.

4.6. İSTATİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

4.6.1. İstatiksel Değerlendirme Tablosu

Tablo 4.1.'de: Fertil ve TİB grubunda tanımladığımız hücre tiplerinin sayısal değerleri gösterildi. Fertil grubun en sık görülen hücre tipi %40 oranında sitoplazmik uzantılı hücrelerdi. TİB grubunda ise en sık olarak (%80) vakuollü hücrelere rastlanmaktaydı. Her 2 grubun en az rastlanan hücresi ise mikrovillüslü hücrelerdi. Kikare analizi ile fertil ve TİB grubu arasında hücre tipleri frekansları açısından farkın anlamlı olduğu bulundu ($p<0.001$).

Tablo.4.1. Kikare Testine Göre İstatiksel Değerlendirme Tablosu

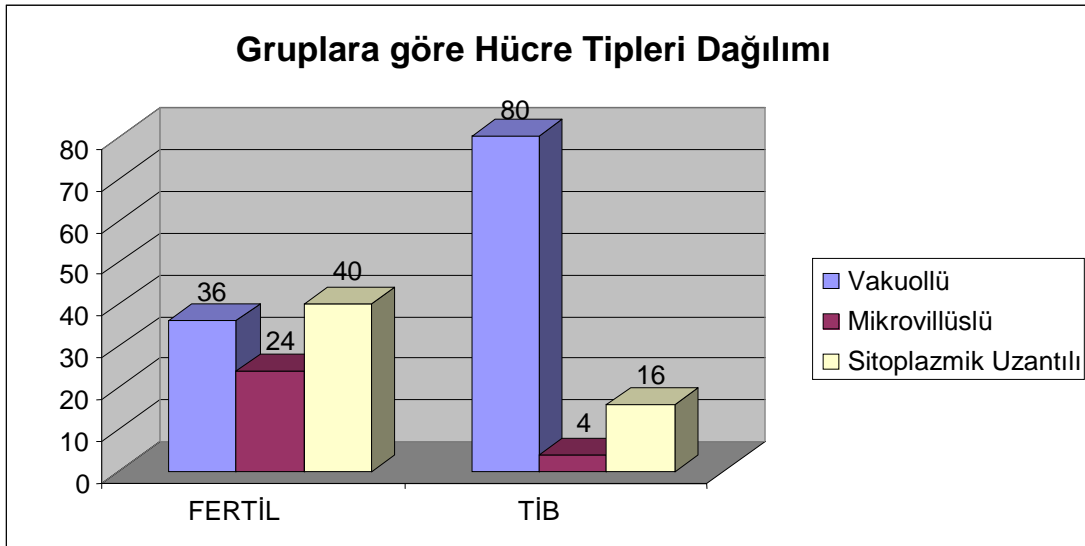
Hücre Tipi	FERTİL	TİB	P
Vakuollü	36	80	
Mikrovillüslü	24	4	< 0.001
Sitoplazmik uzantılı	40	16	

4.6.2. İstatiksel Değerlendirme Grafikleri:

4.6.2.1. Gruplara Göre Hücre Tipleri Dağılımı

Tablo 4.2.'de: Fertil ve TİB gruplarına göre hücre tiplerinin dağılımları gösterildi. Grafikte fertil grupta en sık görülen hücre tipinin sitoplazmik uzantılı hücreler olduğu, TİB grubunda ise en sık vakuollü hücrelerin bulunduğu izlendi.

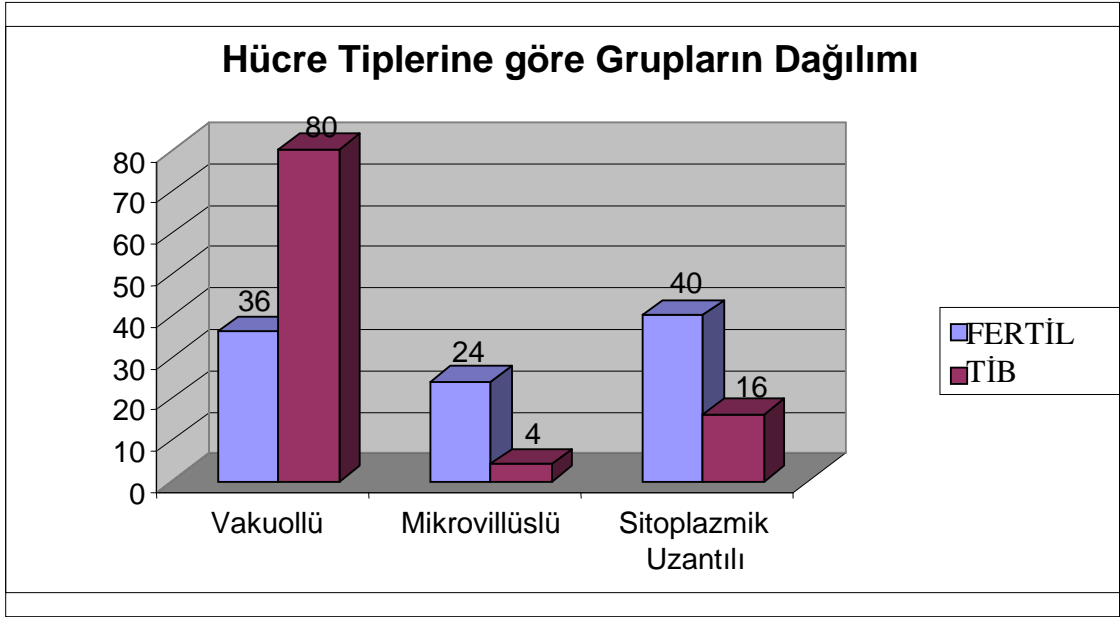
Tablo 4 2. Gruplara Göre Hücre Tipleri Dağılımı



4.6.2.2. Hücre Tiplerine Göre Grupların Dağılımı

Tablo 4.3.'te: Grupların hücre tiplerine göre dağılımı gösterildi. Vakuollü hücreler TİB grubunda en fazla iken sitoplazmik uzantılı hücrelerin fertil grupta daha sıklıkla görüldüğü tesbit edildi. Mikrovillüslü hücreler ise kontrol grubunda sayıca daha çok olarak izlendi.

Tablo 4.3. Hücre Tiplerine Göre Grupların Dağılımı



5. TARTIŞMA

Normal endometriyumda olması gereken spesifik moleküllerin TİB olan vakalarda anlamlı değişiklikler göstermesi, sadece endometriyal fonksiyonel bozuklukların oluşumuna değil aynı zamanda morfolojik değişikliklere de neden olmaktadır (72). İmplantasyon dönemi endometriyumu için birçok moleküler çalışma yapılmış olmasına karşın, morfolojik değerlendirilmesini ve TİB vakalarında oluşan endometriyal yetersizliğin morfoloji ile olası ilişkisini içeren çalışmalar yetersizdir. Bu nedenle çalışmamızda implantasyon dönemi endometriyumunun, fertil kontrol grubu ile infertil TİB grubu arasındaki mikroskobik düzeyde morfolojik karşılaştırılması ışık mikroskopu ve TEM ile yapılmıştır. Ayrıca her iki gruptan alınan endometriyal dokulardan elde edilen gland ve stromal hücrelerin kokültürleri de yapılmış olup, karşılaştırmalı olarak mikroskobik düzeyde incelenmiştir.

Çalışmamızda TİB olan bireylerin endometriyum dokularının fertil grubun endometriyum dokusuyla karşılaştırılmaları sonucunda morfolojik açıdan belirgin farkların olduğu gözlenmiştir. Özellikle, fertil bireylerin luteal faz endometriyumlarının ışık mikroskobik incelemelerinde apikal yüzeyde silindirik hücrelerin ardışık düzende sıralandığı, bütünlük ve süreklilik gösterdiği tespit edilmiştir. TİB olan kadınların endometriyumları ışık mikroskopuyla incelendiğinde ise, endometriyumun lümenine bakan yüzey epiteli, alçak silindirik görünümlü ve ardışık olmayan düzensiz bir izlenim vermektedir ve epitel kalınlığı nispeten daha ince gözlenmiştir. Epitel hücrelerinin apikal yüzeyde devamlılık sağlayamaması, yer yer dökülmeler olması ve hücrelerin birbiriyle bağlantılarının azalması dikkat çekicidir. Normalde fertil grupta çok iyi gelişen pinopodlara, TİB grubunda epitel gelişiminin yetersizliğinden dolayı az rastlanmıştır hatta bazı örneklerde hiç rastlanmamıştır.

Fertil grupta literatürü de destekleyen implantasyon dönemi endometriyumlarında, yüzey epitel hücrelerinin büyük bölümünde pinopod izlenmiştir. Çalışmacıların bir kısmı pinopodların, ışık mikroskobik mikrograflarda kolaylıkla gözlenebileceğini ileri sürerken (86), Develioğlu ve arkadaşları ışık mikroskopu ile yaptıkları çalışmada silyumlar ve mikrovillüsler gibi diğer yapıların, pinopodlar ile karıştırılabileceğini belirtmişlerdir (87). Bizim çalışmamızda da, ışık mikroskobik

incelemelerde, sitoplazmik uzantılar gözlenmiş ancak bunlar pinopod olarak değerlendirilmiş ve TEM analizi ile de doğrulanmıştır. Bu sonuçlar bize ışık mikroskopik incelemenin endometriyumda pinopod oluşumunun gözlenmesi için yeterli olabileceğini düşündürmektedir.

Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi, fertil gruba ait ince yapı mikrograflarımızda, pinopodların implantasyona hazırlık sürecindeki endometriyum epitel hücrelerinin apikalinde yer aldıkları izlenmiştir (8,9,13,71). Pinopodların, lümene doğru uzanan, içeriği blastosistin beslenmesini hatta belki de öncelikle endometriyuma yaklaşmasını ve tutunmasını sağlayan salgı materyaliyle dolu oldukları TEM analizlerimizde gösterilmiştir.

Pinopodların işlevleri üzerine değişik görüşler vardır. Bentin Ley ve arkadaşları önceki çalışmalarında blastosistin tutunmasının endometriyal pinopodların en uç bölgesi üzerinde oluştuğunu belirtmişlerdir (81,147). Aynı araştırmacılar, 2000 yılında blastosistin yapışması için gerekli olan reseptörlerin pinopod yüzeyinde lokalize olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Deneysel olarak yapılan in-vitro insan çalışmalarında da blastosistin pinopod oluşturan endometriyal epitel yüzeyine yapıştığını belirtmişlerdir. TEM ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise blastosistin pinopod oluşturan epitel hücrelerinin apikal plazma membranlarıyla değil, lateral membranlarıyla ilişki kurduğunu ileri sürmüşlerdir (148). Blastosistin ilk temas ettiği bölgenin tespiti için immünohistokimyasal yöntemlerle de analizlerin yapılması uygun olacaktır.

Nikas, Martel ve arkadaşları, insan endometriyumunda bulunan pinopodların en iyi izlenme gününü, blastosistin yaklaştığı gün olarak varsayılan normal siklusun yirminci günü olarak belirtmişlerdir (9,80). Bizim değerlendirmelerimizde de, bu dönemde (19-21. gün) pinopodlar yoğun ve belirgin şekilde görülmektedir.

Adams ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, pinopod oluşumunun, endometriyumun klinik olarak hormonal durumuna işaret eden bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır (149).

Çalışmamızda incelenen bir diğer yapı pinopodların yoğunluğuyla bağlantılı olarak sayıları ve yapıları değişen mikrovillüslerdir. Bunun sebebi, implantasyona hazırlık zamanında, uterin kaviteye uzanan epitel hücrelerin, apikal membranlarının mikrovillüslerini kaybetmesi, geniş ve uzun membran uzantıları oluşturmalarıdır (84). Birçok araştırmada da gösterildiği gibi (13,85) fertil grubun endometriyum dokusu ince

kesitlerini TEM ile incelediğimizde, mikrovillüslerin sayıca azalmış olduğu ve boyutlarının küçüldüğü izlenmişlerdir. Bu dönemde, hücre apikal kısımlarının içleri blastosisti kabul edip besleyecek mukoid özellikte bir materyalle dolu olan çok sayıda vakuol içermektedir ve bunun sonucu olarak mikrovillüsler kısalıp, yer yer silinmekte, pinopodlar gelişmektedir.

Oysa TİB grubunun TEM incelemelerinde, pinopod oluşumunun yetersiz olduğu, hücrelerin mikrovillüslerinin varlıklarını korudukları ve bazılarında lümene doğru pinopod oluşturma eğiliminde olan sitoplazmik uzantılar bulunduğu izlenmiştir. Lümene yakın alanlarda salgı vakuolleri bulunmaktadır ancak bu vakuoller genellikle irili ufaklı ve gelişigüzel lokalize olmuşlardır. Ayrıca lümene atılmış az miktarda pinopod benzeri yapı izlenmiştir. Bu durum fertil gruba kıyaslandığında TİB grubundaki bu hücrelerin salgı üretimlerinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir ve endometriyum lümeninde yeterli salgı materyalinin olmaması da bu durumu desteklemektedir. Az sayıda pinopod oluşumuna karşılık, mikrovillüslerin çoğunun sayıca ve şekil olarak değişime uğramadan kaldığı bir kısmınınsa uzunlu kısı ve düzensiz bir görünüm kazandıkları tesbit edilmiştir. Normalde bu hücrelerin bazalden apikale doğru gittikçe artan dev vakuollere sahip olmaları ve mikrovillüsleri silmesi beklenirken, salgı üretiminin yetersizliği nedeniyle hücrelerde bu değişim çoğunlukla gerçekleştirilememiştir.

Endometriyal reseptivite sonucunda değişmesi beklenen diğer bir yapı silyumlardır. Silyumların insan endometriyumunda bulunma sürecine ait klasik kitaplarda değişik bilgiler vardır: Bazı kitaplarda endometriyumun, silyasız sekretuar hücreler ve silyalı hücrelerden oluşan basit silindirik epitelle dōşeli olduğu belirtilmiştir (3,30). Bir başka kaynakta ise menarştan önce uterusun silindirik epitelinin silyumlu olduğu, fakat menarştan sonra hücrelerin çoğunda silyum olmadığı vurgulanmıştır (34). Ayrıca süpürme hareketine sahip olan silyumlar, fertil bireylerin luteal fazında 1/20'den 1/50 gibi oranlara düşerek azalmaktadır (24). Çalışmamızda da fertil grup endometriyum epitelinin ultrastrüktürel incelemeleri sonucunda silyumlara rastlanmaması, implantasyon açısından olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Çünkü endometriyumun reseptivite döneminde, silyumların varlığı ve süpürme hareketlerine devam etmeleri, blastosistin endometriyuma tutunmasına izin vermeyerek implantasyonu zorlaştırabilir. TİB olan grubun TEM analizlerinde, fertil grubtakinin

aksine silyumların yok olmadığı ve varlıklarını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuç, TİB grubunda ki implantasyon başarısızlığının olası sebebi olarak ortaya konabilir.

TİB olan bireylerde yüzey epitel hücrelerinin apikali yanı sıra sitoplazmasında da belirgin değişiklikler görülmüştür. Sitoplazmada dağınık şekilde bulunan salgı vakuolleri oldukça az boya almış olarak açık renkte izlenmiştir. Bu hücrelerin yeterli salgı materyali oluşturamaması ve ilişkili olarak enerji ihtiyacının az olması, mitokondriyon sayısındaki azlığın nedenini açıklayabilir. Epitel hücrelerinin çekirdeklerinin küçük ve çoğunlukla heterokromatik oluşu, hücrelerde aktif protein sentezinin az olduğunu düşündürmektedir.

Fertil kadınların endometriyumlarının ışık mikroskopik incelemelerinde, bazal lamina altında oldukça yoğun, çok sayıda hücre ve kan damarı içeren bir stroma gözlenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi Ünlü ve Berker, stromada menstrual siklusun 21. ya da 22. gününde desidualizasyonun başladığını belirtmişlerdir. Desidualizasyon sürecinde endometriyal bezlere yakın damarların boyu uzar ve lamina propriyada çok miktarda sıvı birikir (37,150).

Endometriyal stroma üzerine yapılan çalışmalar ile stromanın mezenşim benzeri bir yapısı olduğu, erken sekretuar fazda gland hücreleri ile ilişkisinin varlığı ve bu ilişkinin preimplantasyon fazında maksimal seviyeye ulaştığı belirtilmiş ve embriyo implantasyonunda ki önemi ortaya konmuştur (3,151,152). Ayrıca, desidual reaksiyon gösteren dokudaki stromal hücrelerin, embriyonun invazyon ve özellikle beslenmesini sağlayacak niteliklere kavuşmak üzere değişiklikler oluşturduğu düşünülmektedir. Çalışmamızdaki fertil grup stromal hücrelerinin sayıca çok olduğu ve aktif hücre özelliği gösterdiği gözlenmiştir. Çoğu alanda stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüştüğü belirlenmiştir. Böylece olası bir gebelik durumuna hazırlanan endometriyum görüntüsü meydana gelmiştir.

Çalışmamızın TİB grubunda ise bazal lamina altında uzanan stromada az sayıda stromal hücre ve seyrek olarak salgı bezlerine rastlanması, stromanın hücre ve ara madde açısından fakir olduğu izlenimini vermiştir. Çeşitli boyutlara sahip olan stromal hücrelerin çekirdekleri farklı görüntüdedirler ve sitoplazmaları incedir. Bu durum embriyonun implantasyona hazırlık döneminde beslenebilmesi açısından gerekli olduğu düşünülen desidual reaksiyonun stromada başlayamadığı izlenimini vermiştir. Stromal

hücrelerde desidua benzeri hücelere dönüşümün yetersiz olması implantasyon başarısızlığının nedenlerinden biri olabilir.

Fertil bireylerin ışık mikroskopik mikrograflarında, stromanın diğer dikkat çekici yanı ise ileri derecede kıvrımlanan ve adeta yer yer birbirine yapışarak bulunduğu bölgeyi tamamen dolduran endometriyum bezlerinin varlığıdır. İlgili kitaplarda, luteal faz endometriyumunun tübüler bezlerinde dış sınırlarının düzensizleşip kıvrıldığı, bez epitel hücrelerinin bazal bölümünde glikojen birikmeye başladığı ve bez lümeninin glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgıyla dolduğu belirtilmektedir (37). Luteal fazın endometriyal bez hücrelerinde mitozla sıklıkla rastlandığı, salgı aktivitesinin arttığı ve lümenin salgı materyaliyle dolduğu saptanmıştır (24). Çalışmamızda ki fertil grubun elektron mikrograflarında da, bezleri oluşturan salgı hücrelerinin sitoplazmaları çok sayıda salgı vakuelleriyle dolu olarak gözlenmiştir. Çoğu bezlerin lümeni salgı materyali ile tamamen dolu bir görünümündedir. Luteal faz ortasında bez epitel hücrelerinin bazal bölümünde glikojen birikimi meydana gelmiştir. Endometriyal salgı implantasyon ve gebeliğin devamı için kritik bir değer taşımaktadır. Son zamanlarda uterin sıvı proteinlerinin tanınması ve karakterize edilmesi üzerine yeni çalışmalar yapılmaktadır. Parmar ve ark. uterin salgıların endometriyal fonksiyon veya disfonksiyon üzerinde çok önemli bir rol üstleniyor olabileceğini söylemişlerdir (153). İmplantasyon öncesi histiotrofik, implantasyon sonrası hemotrofik olan memeli beslenmesiyle ilgili bulguların yanı sıra, son çalışmalar uterin salgıların rolü üzerinde yoğunlaşmıştır (154).

Fertil grupta stromanın büyük kısmını kapsayan, bol miktarda ve çok kıvrımlı olan bezler TİB grubunun TEM ile değerlendirilmesinde, az sayıda, düz veya hafif kıvrımlı bez yapıları şeklinde gözlenmiştir. Bazı alanlardaysa bez yapısının hiç oluşmadığı veya salgı hücrelerinin, salgı vakuelleri oluşturma çabasının oldukça yetersiz olduğu dikkat çekmiştir. Çünkü salgı yapan hücrelerin apikaline doğru salgı üreten vakuellerinin olmasına rağmen, vakuol yapıları irili ufaklı ancak çoğunlukla küçük boyutlardadır, fertil grup vakuelleri gibi birleşip dev salgı vakuelleri oluşturamadıkları gözlenmiştir. Bu vakuellerin salgılarını lümene atabildiği izlenmesine rağmen lümeninde yeterli salgı materyalinin birikmediği izlenmiştir. Bez yapılarını oluşturan salgı yapan bu hücrelerin, az sayıda salgı vakuelleri oluşturmaları veya yetersiz

seviyede salgı üretmesi implantasyon fizyolojisi için bir eksiklik olduğunu düşündürmektedir.

Fertil grubun elektron mikroskopik incelemelerinde, hücreler arası bağlantı kompleksleri apikale yakın alanlarda daha belirgin olarak izlenmiştir. Ve daha çok sıkı bağlantılara rastlanmıştır. Normal menstrual siklusün çeşitli fazlarında endometriyal epitelyal hücreler arasındaki bağlantıların sayılarının ve boyutlarının, siklus gününe göre değiştiği bilinmektedir. Hücre bağlantılarının sıklüse bağlı değişimlerinin, endometriyal epitelin proliferasyon ve farklılaşmasında kontrol edici bir rol oynayabileceği kanısına varılmıştır (155). Bizim çalışmamızda da TİB grubundaki hücreler arasında interdigityasyonların arttığı gözlenmiştir.

Endometriyal Kokültür Hücrelerinin Değerlendirilmesi:

Kokültür sistemlerinin embriyo gelişimine pozitif etkisi in vivo şartları başarı ile taklit etmesinden kaynaklanmaktadır (111). Yapay uterus olarak da bilinen endometriyal kokültür ortamları, embriyoların transfer dönemi öncesi doğala yakın bir ortamda gelişimlerine izin veren sistemlerdir (106-108). Geleneksel medyumlarla kıyaslanınca kokültür sistemlerinin insanları da içeren çeşitli memeli türlerinde embriyoda fragmantasyonu azaltıp, klivajı hızlandırarak embriyo kalitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu durum helper hücreler olarak da bilinen farklı tiplerde besleyici monolayer hücreler ile oluşmaktadır (124,127). Kokültüre olan embriyonun, başka bir hücre grubunun (monolayer helper hücreler) varlığında gelişimi ve implantasyon yeteneği artmaktadır. Bu amaçla birçok hücre tipi kullanılmıştır. Farklı canlı türlerinin hücreleriyle (maymun vero hücreleri, sığır tuba epitel hücreleri) çalışılması (125-129) yanı sıra daha sonra insan üreme sistemi hücrelerinden; kumulus-granüloza hücreleri (113,117,118,131), tuba uterina (124,125), tuba uterina-endometriyum (126) ve endometriyum (127,128) hücrelerinin kullanıldığı kokültür sistemlerine geçilmiştir. Temel olarak bu sistemler, embriyoyu blastosist evresine taşıyan ve implantasyonunu sağlayan metabolik değişimlerin artması ile işlevselliklerini göstermektedir (156). Son yıllarda kullanılan kokültür sistemlerinin güvenli, tıbbi, etik ve pratik kolaylığı olması da amaçlanarak otolog endometriyal kokültürler kullanılmaya başlanmıştır. İnsan endometriyal epitel hücreleri monolayer kültürlerinin embriyo-endometriyum arası etkileşimde besleyici moleküller, büyüme faktörleri ve sitokinlerin ekspresyonunu sağladığı ve bu spesifik parakrin moleküllerin implantasyon başarısını artırdığı

belirlenmektedir (17,115,116). Spandorfer ve arkadaşları da çok sayıda IVF başarısızlığı olan hastalara uygulanan AECC ile klinik gebelik oranlarının $>40\%$ olduğunu bildirmişlerdir (157). Kokültür yanı sıra Kahraman ve arkadaşları TİB olan bireylere PGT yapılmasının gebelik şansını artıracığı üzerinde durmuşlardır (158,159). TİB olan bireylerin endometriyal doku kokültürünün ince yapı düzeyinde analizinin yapıldığı bir çalışmaya literatürde henüz rastlanmamıştır. Çalışmamızda hem fertil hem de TİB grubuna ait bireylerin endometriyal kokültür hücrelerinin ışık ve TEM ile morfolojik yapıları tanımlanmaya çalışılmıştır. Endometriyumun fertilitate belirleyici bir faktör olduğunu bildiren Strowitzki, endometriyumda endometriyal tabakalar ve blastosist arasındaki dinamik sürecin burada rol oynayan hücrelerle bağlantısını belirtmektedir. Ancak endometriyumun moleküler mekanizmasına dair bilinenlerin gittikçe artıyor olmasına rağmen, günlük klinik rutinde kullanılan bilgilerin sınırlı olduğunu bildirmektedir (72). Bu durumda in vitro monolayer endometriyal dokudaki hücre tiplerinin bilinmesi ve doku dinamiğinin aydınlatılabilmesi, klinik uygulamalarda kullanımı açısından yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda endometriyum kokültür hücreleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; literatürde ilk kez hem fertil hem de TİB grubunda morfolojik özellikleri bakımından farklı üç tip hücre olduğu tanımlanmıştır. Uygulanan kikare testi ile fertil ve TİB gruplarında hücre tipleri frekansları açısından gözlenen farklılık, istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$). Birinci grup “vakuollü hücreler” olarak adlandırılmıştır. Bu hücrelerin dikkat çeken özellikleri arasında sitoplazmalarında çok sayıda vakuol içermeleri ve seyrek olarak sıralanmış, düzensiz mikrovillüslerinin varlığı belirtilebilir. İkinci grup hücreler; az sayıda vakuoller içeren mikrovillüslü hücrelerdir. Üçüncü grup hücreler ise “sitoplazmik uzantılı hücreler” olarak adlandırılmıştır.

Fertil bireylerin endometriyal kokültüründe vakuollü hücreler, tanımladığımız hücre tipleri arasında ikinci sıklıkla görülen hücre grubudur. Düzensiz mikrovillüslere sahip bu hücrelerin sitoplazmaları çok sayıda, değişik boyutlarda ve içleri granüler materyalle dolu vakuoller içermektedir. Çok miktarda salgı materyali içeren vakuollerin varlığı, hücrenin zengin bir GER sistemine sahip olmasını açıklamaktadır. Bu gruptaki vakuollü hücrelerin, normal kontrol grubu endometriyum dokusundaki salgı materyalini üreten bez epitel hücrelerine benzer hücreler olduğu düşünülmüştür. Çünkü birbirine

fonksiyon olarak benzeyen bu hücrelerin en belirgin özellikleri, luteal evredeki endometriyumda salgı vakuolleri oluşturmalarıdır. Liu Hc ve arkadaşları da in vitro kültür koşullarındaki salgı vakuollerinin embriyo gelişimine katkıda bulunan özel proteinler salgıladıklarını ileri sürmüşlerdir (156,160). Spandorfer ve arkadaşları monolayer endometriyal kokültür hücrelerinin aslında invivo şartlardaki üç boyutlu yapılarını kaybettiklerini ve invivo ortamdaki endometriyal hücrelerden farklı olduklarını belirtmişlerdir. Ancak AECC sistemlerinde elde edilen başarılı sonuçların bu hücrelerin salgıladığı çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (157). Çalışmamızda tanımladığımız dev vakuollü bu hücreler, fertil grubun bez epitel hücrelerindeki lümeneye atılmış bol miktardaki salgı materyalini üreten hücreler ile benzer olduğu izlenimini vermektedir.

TİB grubundaki vakuollü hücrelerin elektron mikrograflarının incelenmesinde de çok sayıda, irili ufaklı vakuollere sahip oldukları görülmekle birlikte fertil gruptaki kadar dev vakuoller oluşmamıştır. Bu hücreler, TİB grubu kokültüründeki tüm hücrelerin arasında en sık rastlanan hücre tipidir. Bu oranın yüksekliği implantasyonun kolaylaşması ve embriyonun beslenmesi açısından çok önemli olan salgı materyalini sağlayabilmek için, çok sayıda vakuol oluşturabilme çabası şeklinde düşünülmektedir. Bu çaba morfolojiye hücre sayısının artışı ve her hücrede çok sayıda vakuol oluşumu şeklinde yansımaktadır. Bunun neticesinde vakuollü hücrelerdeki salgı üretiminin blastosist gelişimini artırdığı, gebelik oranlarına olumlu yansıyan sonuçlar elde edilmesini sağladığı bilinmektedir (17, 112). Aynı zamanda çalışmamızdaki bu hücre grubunun fertil gruptaki vakuollü hücrelerden fazla olması istatistiksel açıdan anlamlıdır. TİB grubunun çok sayıdaki vakuollü hücrelerinin ürettiği endometriyal sekretuar proteinler, Liu ve arkadaşlarının da tesbit ettikleri gibi birçok büyüme faktörleri ve sitokinleri içeriyor olabilir (156,161).

İkinci grup “mikrovillüslü hücreler” olarak değerlendirilmiştir. Fertil grup kokültür hücre tiplerinden sayıca en az görülen hücrelerdir. Bu grupta düzensiz, kısa, bol miktarda mikrovillüsler izlenmektedir. Nottola ve arkadaşlarının granüloza hücrelerini kokültüre ederek yaptıkları bir çalışmada, hücrelerin TEM ile incelenmesi sonucunda çeşitli boyutlarda bleb veya mikrovillüs gibi sitoplazmik çıkıntıların, hücreler arasında düzensiz şekilli bir ağ oluşturduğunu belirtmektedirler (117).

Mikrovillüslü hücrelerin sitoplazmalarında seyrek de olsa yer yer vakuoller bulunmaktadır. Bu hücrelerin ilk göze çarpan belirleyici özellikleri mikrovillüsleri olmasına karşın, yapı olarak ilk grupta tanıttığımız vakuollü hücelere benzemeleridir. Hücrenin mikrovillüs yapıları, sitoplazmadaki vakuollerin artması ile gittikçe değişime uğrayabilecek bir izlenim oluşturmaktadır. Bir başka deyişle bu durum mikrovillüslü hücrelerin ilk grupta tanımlanan vakuollü hücelere dönüştüğünü düşündürmektedir. Hatta bu hücreler, vakuollü hücrelerin“öncü hücreleri”olabilir fikrini akla getirmektedir.

TİB olan bireylerde de ikinci grup “mikrovillüslü hücreler”dir. Kontrol grubunda en az sayıda görülen mikrovillüslü kokültür hücrelerine TİB grubunda da nadiren rastlanmaktadır. Bu durum TİB grubu dokusundaki yetersizlik göstergelerinden biri olarak değerlendirilebilir. Başka bir açıdan değerlendirildiğinde, vakuol içeriğinin oluşma yetersizliğinden dolayı mikrovillüslü hücrelerin vakuollü hücreye dönüşümü çok hızlı gerçekleşmektedir. Kontrol grubunda bu dönüşüm mikrovillüslü hücrelerin az vakuole sahipken vakuol sayısı ve hacmini artırarak vakuollü hücelere dönüşümü şeklinde yorumlanabilir. Oysa TİB grubunda, kontrol grubundaki mikrovillüslü geçiş hücrelerinin oluşumuna fırsat vermeden çok vakuollü hücelere dönüştüğü fikrini akla getirmektedir. Her iki tip hücre grubunda da vakuollerin varlığı ve salgı materyalinin sağlanmasına yönelik bir hücre dinamiği dikkati çekmektedir. Bu durum in vivo şartlardaki bol miktarda salgı üretimi görevini bu hücrelerin üstlendiğini düşündürmektedir. TİB grubunda erken evre embriyo gelişimiyle gebelik oranlarını artıran endometriyal kokültür hücrelerinin salgısının kritik önem taşıdığı bildirilmektedir (156,161).

Üçüncü grup “sitoplazmik uzantılı hücreler”dir. Fertil bireylerin elektron mikrograflarında; çok sayıda sitoplazmik uzantıları ve uzantılar içerisinde lipid vakuolleri ile mitokondriyonlar gözlenmektedir. Bu grup kontrol kokültür hücre tiplerinde en çok görülen hücre grubudur. Histolojik değerlendirmelerin altın standardı olan morfoloji ve fonksiyon arasındaki sıkı ilişkinin varlığı göz önüne alınırsa değişik bakış açıları getirilebilir: Sitoplazmik uzantılı hücrelerin yüzeyi embriyo transferi sonrasında implantasyonu kolaylaştıran özel reseptörleri barındırıyor olabilir. Bizim yaklaşımımızı destekleyen Amsterdam ve Rotmensch isimli araştırmacılar da granuloza hücre kokültürüyle yaptıkları çalışmalarında, hücre yüzeyindeki reseptörlerin hücre uzantılarıyla bağlantılı olduğu üzerinde durmaktadırlar (162). Sitoplazmik uzantılı

kokültür hücreleri, belkide embriyonun yaklaşması, tutunması aşamalarında ilk iletişim kuran, kontrol grubunun pinopod oluşturan yüzey epitel hücrelerine benzer hücreler olabilirler. Bir başka deyişle, bu hücrelerin, embriyonun implantasyon sürecinde etkileşimde bulunduğu yüzey epitel hücrelerinin kültürdeki görüntüleri olduğu düşünülebilir.

Gulyas, Suziki adlı araştırmacılar da yalancı ayakçıklar, mikrovillüsler ve sitoplazmik uzantıların hem in vivo hem in vitro şartlarda geleneksel olarak hücrenin büyümesi ve genişlemesi anlamında düşünülebileceğini belirtmektedirler (163). Bizim çalışmamızda da sitoplazmik uzantılı hücrelerin değişik boyutlarda özellik göstermesi, büyüme ve genişleme sürecinin değişik aşamalarında olabileceklerini akla getirmektedir. Bir başka açıdan görüş bildiren Balboni ve Zecchi ise hücrelerdeki yüzey uzantılarının ileri derecede gelişmesini, kokültüre edilen hücrelerin kültür şartlarında oluşturduğu belirgin olmayan adaptasyonun sonucu olarak değerlendirmişlerdir (164). Ancak bu adaptif mekanizmaya aynı ortamda bulunmalarına rağmen diğer hücreler farklı morfolojik görüntülerle yanıt vermektedirler. O halde sitoplazmik uzantıların oluşmasındaki mekanizmanın tek bir nedene indirgenmemesi daha doğru olacaktır. Zhang ve arkadaşları insan immortalize granüloza hücreleri ile yaptıkları çalışmalarında hücreler arası bağlantıların immortal hücreler arasında çok yaygın olarak görüldüğünü söylemişlerdir (165). Reza ve arkadaşları ise endometriyal dokuları plastik yüzeylerde kültüre ederek elde ettikleri hücrelerin nonpolarize özellikte hücreler olduğunu bildirmişler ve TEM ile incelemişlerdir. Komşu hücrelerin birbirlerine doğru sitoplazmik uzantılar oluşturduklarını, bunların desmozom benzeri bağlantılarla birbirlerine tutunduklarını gözlemişler ve sıkı bağlantıların olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu hücrelerin çekirdek özelliklerinin de invivo şartlardaki hücrelerin çekirdeklerine göre daha büyük olduğunu söylemişlerdir (166). Ancak bu çalışmacıların deneyinde endometriyal doku seçiminde fertilitate belirleyici bir parametre kullanılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise hem kontrol hem de TİB grubundaki kokültür hücreleri arasında hücreler arası bir bağlantı gözlenmemiştir. Bu araştırmacıların belirttiği gibi çekirdek büyüklüklerinde önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak yer yer çekirdekleri çok girintili çıkıntılı olan, metabolik aktivitesi yüksek izlenimi veren hücrelere sıklıkla rastlanmıştır.

TİB olan kadınların endometriyum kokültür hücrelerinde; üçüncü grup, “sitoplazmik uzantı”lara sahip olan hücrelerdir, kokültürde ikinci sıklıkla görülmektedirler. Ancak kontrol grubunun sitoplazmik uzantılı hücreleriyle kıyaslanınca istatistiksel olarak da anlamlı derecede az bulunmaktadırlar. Bu hücrelerin mevcut sayıda bile implantasyon başarısını artıran özellikler taşıyan hücreler oldukları düşünülmektedir. Bazı olgularda organelden zengin sitoplazmik uzantılar yanı sıra tüm sitoplazmaya dağılmış çok sayıda vakuol gözlenirken bazı olgular az sayıda vakuol içeren sitoplazmaya sahiptirler. Bu gruptaki hücreler, fertil gruptaki aynı isimle adlandırdığımız kokültür hücrelerinin sitoplazmik içeriklerine göre heterojen görünümündedirler. TİB grubu sitoplazmik uzantılı kokültür hücrelerinin, fertil grupta da olduğu gibi, endometriyum yüzey epitel hücrelerine benzerlik gösteren hücreler olabileceği tahmin edilmektedir. Dokudaki epitel hücrelerinden köken aldıklarından dolayı aynı tip hücre davranışını göstermektedirler. Ancak doku epitelinde olduğu gibi bir apikal ve bazal yönü olmayan bu hücreler plastik yüzeyde yayıldığında monolayer kültürdeki hücre davranışı olarak her yöne doğru uzantılar vermiş olabilirler. Bazen de bir tarafa doğru tomurcuklanma veya kutuplaşma eğilimi göstermesi ise yüzey epitel hücrelerinden köken aldığı bir kanıtı olarak değerlendirilebilir. Fertil grupta olduğu gibi bu hücrelerin de yüzey reseptörlerine sahip oldukları, bu reseptörlerin embriyonun tutunmasında ve implantasyonun kolaylaştırılmasında rol oynadıkları düşünülebilir. Sitoplazmik uzantılı bu hücrelerin yüzeyinde, son yıllarda konfokal mikroskopi ile endometriyal dokuda ortaya çıkarılan HB-EGF, $\alpha_5\beta_3$ integrinler, HOXA10 gibi preimplantasyon süreci moleküllerinin ekspresyonları bulunabileceği düşünülmektedir. Dimitriadis ve arkadaşları sitokinlerin endometriyal dağılımıyla ilgili yaptıkları çalışmada, bu moleküllerin implantasyonu düzenleyen bir etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (167). Diğer yandan Haddad Filho ve arkadaşları da IVF sikluslerinde başarılı sonuçlar elde edebilmek için interlökinlerin endometriyal ekspresyonunun çok önemli olduğunu vurgulamışlardır (168). Çalışmamızda tanımladığımız sitoplazmik uzantılı bu hücreler de implantasyonu düzenleyen reseptörlere sahip hücreler olabilirler. Bu hücrelerin girintili çıkıntılı, ökromatik çekirdekleri, hücrenin metabolik aktivitesinin yüksek olduğu fikrini vermektedir.

Endometriyal veya farklı dokularla yapılan kokültür çalışmalarının bir kısmında gruplandırma epitelyal hücreler ve stromal hücreler şeklindedir. Arnold ve arkadaşları

yaptıkları kokültür çalışmasında geleneksel immünohistokimyasal yöntemler kullanarak epitel ve stroma hücrelerini ayırt etmişlerdir (169).

Endometriyal kokültür hücrelerinin morfolojik değerlendirmesine dair elektron mikroskopik çalışmalar yoktur ve daha önce kokültür hücre tiplmesi yapılmadığı için tartışmanın bu kısmında az literatür desteği sağlanabilmiştir. Dahası yapılan önceki çalışmalar çoğunlukla kokültürlerin blastosist gelişiminde ne kadar etkili olduğu üzerinedir (170,171). Son zamanlarda in vitro fertilizasyonda kokültürün yeri ve önemini ölçen meta-analizlere yer verilmektedir. Yapılan meta-analizlerde endometriyal kokültürün, implantasyon ve klinik gebelik oranları üzerinde olumlu etkiler yarattığı doğrulanmaktadır (172). Yine yapılan son çalışmalarda otolog endometriyal dokudan farklı olarak insan endometriyal hücre dizileri elde edilerek kullanılması önerilmektedir (173). Bizim çalışmamızdaysa elektron mikroskopik analizle, endometriyal kokültür hücre morfolojisinin iyi bilinmesine, anlaşılmasına ve hücre davranışının ortaya konulmasına çalışılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) Çalışmamızda, üç veya daha fazla sayıda IVF uygulanan, sağlıklı embriyo transferine rağmen gebelik oluşmayan TİB olan bireylerin endometriyum dokuları ile fertil grubun endometriyum dokuları karşılaştırmalı olarak ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelendi ve detaylı bulgular açıklandı.
- 2) Bunun yanısıra her iki grubun, endometriyum dokularından elde edilen kokültürleri mikroskopik düzeyde incelendi. Böylece gruplar arası farklılıkların belirlenmesi ve AECC'ün embriyonun gelişimine bulunabileceği katkılar ortaya çıkarıldı. Araştırmadaki hedefimiz olan endometriyum kökenli infertilitenin ana sebeplerinden biri olan implantasyon başarısızlığına katkı ve yarar sağlayacak sonuçlar elde edildi.
- 3) Fertil bireylerin endometriyumundaki epitel ve stromayla kıyaslandığında, TİB olan bireylerin endometriyumunda ışık mikroskopuyla bile gözlenen değişiklikler vardı.
- 4) TİB grubu yüzey epitel hücrelerinin bütünlük ve devamlılığının bozulduğu, yer yer dökülmeler ile sağlamlığını yitirdiği gözlendi. Epitel hücrelerinde normalde beklenen ve embriyoyu beslediği düşünülen salgı vakuelleri yeterince gelişmemişti. Çok sayıda vakuollerin bir araya gelip lümene doğru artan vakuol kümeleriyle mikrovillüsleri silmemesi, silyumların varlığını sürdürmesi ve daha da önemlisi implantasyon belirteci olan pinopod yapılarının oluşmaması, buradaki epitel hücrelerinin yetersizliğinin kanıtlarını oluşturdu.
- 5) TİB grubu stromasında desidual reaksiyonun başlayamadığı görüldü. Çünkü stromal hücrelerin sayısı nisbeten az, hücreler arasındaki materyal yetersizdi ve predesidual hücreye dönüşüm hazırlığına nadiren rastlandı. Salgı yapan bez epitel hücrelerinde de yeterli salgı materyali oluşturacak kadar vakuol yoktu, çok sayıda ve kıvrımlanma oluşturacak bez topluluklarına rastlanmadı. Bu durum, blastosistin yüzey epiteline tutunma şansını yakalasa bile beslenmesi açısından gerekli olan besin materyalini sağlayan bez ve stromal yapının yetersiz olduğunu gösterdi. İmplantasyon başarısızlığının nedenlerinin morfolojik yansımalarının bu sonuçlara bağlı olabileceği düşünüldü.
- 6) Bu durumda implantasyon başarısını artırmak için neler yapılabilir sorusuna karşılık olarak kokültür çalışmalarının faydası üzerinde duruldu. Embriyo gelişimini destekleyerek, gebelik şansını artırdığı belirtilen monolayer otolog endometriyal

kokültür hücrelerinin morfolojik görüntüleri incelendi, kokültür hücrelerinin tanımlanması yapıldı.

7) Hem fertil hem de TİB grubundan elde edilen kokültürlerde hücre tipleri morfolojik özelliklerine göre ayırt edildi: Her iki grup içinde, vakuollü, mikrovillüslü ve sitoplazmik uzantılı olarak isimlendirdiğimiz hücreler tanımlandı. Bu hücrelerin yapısal özellikleri incelenerek, genel hücre davranışları temelinde implantasyondaki rolleri üzerinde duruldu.

8) Vakuollü hücreler; her iki grupta da çok sayıda vakuol oluşturabilen özellikte olup, TİB grubunda en sık rastlanan hücrelerdi. Bu hücrelerin normal endometriyum dokusundaki salgı yapan bez epitelinden köken alan hücreler olduğu düşünülüyor. Embriyonun tutunması yanı sıra gelişimini devam ettirip, endometriyal invazyonunu sağlayabilmesi için gerekli besin materyalini bu hücrelerin ürettiği fikrine varıldı. TİB grubu kokültür hücrelerinde de salgı üretimi yapıldığı ancak yeterli salgı düzeyine erişebilmek için vakuollü hücre sayısının arttığı gözlemlendi.

9) Mikrovillüslü hücreler her iki grupta da en az rastlanan hücrelerdi. Fertil grupta bu hücreler az vakuolleriyle de dikkat çeken ve vakuollü hücrelere benzeyen görüntülerdi. Vakuoller artırtıkça, vakuollü hücrelere dönüşecekleri izlenimi veriyorlardı. TİB grubunda ise bu hücrelere nadiren rastlanmaktaydı. Bu durum vakuollü gruba çok hızlı geçiş göstermiş olabilecekleri şeklinde yorumlandı.

10) Sitoplazmik uzantılı hücreler; fertil bireylerde en sık rastlanan hücre grubuydu. Endometriyumun yüzey epitelini üzerine yapılacak immünohistokimyasal çalışmalar ile bu hücrelerin pinopod sunan yüzey epitel hücreleri olabileceği ihtimali üzerinde duruldu. Sitoplazmik uzantılı hücreler TİB grubunda ikinci sıklıkla görülen hücrelerdi, fertil gruba göre de istatistiksel olarak anlamlı derecede az olmalarına rağmen, implantasyon şansını artıran hücreler olarak özel önem taşıdıkları düşünülüyor.

11) Son çalışmalarda saptandığı ileri sürülen interlökin-6 gibi proteinlerin ayrıntılı tesbiti yapılarak, embriyo-endometriyum arası etkileşimde rol oynayan kokültür hücrelerinin eksprese ettikleri proteinler ve embriyo üzerine etkileri ortaya çıkarılmalıdır.

12) Endometriyal kokültür sistemlerinin blastosist gelişimi ve implantasyon üzerine olumlu etkisinin, endometriyal epitelyal hücrelerin sekrete ettiği faktörlere bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu sistemdeki hücrelerin morfolojik ve moleküler özelliklerinin iyi

bilinmesi için yapılacak yeni çalışmalarla, invivo ortamda implantasyon için yetersiz endometriyumun eksik kısmının tamamlanmasına çözüm bulunmalıdır.

13) Birçok etik ve pratik anlamdaki zorluklara rağmen, insan implantasyon mekanizmasının anlaşılmasına dair bazı sinyal yollarının tanınması ve adım adım morfolodinamik özelliklerinin ortaya konulması bundan sonraki sürecin hedefi olmalıdır. Bu çalışmada tanımlanan hücrelerin morfolojilerinin daha ileri çalışmalarla desteklenmesi, hücrelerin sinyalizasyon mekanizmalarının açıklanması ve tanınmasına yardımcı olacak reseptörlerin tesbiti için immünohistokimyasal çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Acosta AA.** Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities. *Obstet Gynecol Surv*, **1994**;49:467.
2. **Obermair A, Obruca A, Pohl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger W.** Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil Steril*, **1999**. 72(2): 269-275.
3. **Roos MH, Kaye GI, Pawlina W.** Female Reproductive System. *Histology A Text And Atlas With Cell And Molecular Biology*, Fourth Ed. Baltimore: Williams&Wilkins, **2003**;743-63.
4. **Elder K, Dale B.** Preimplantation Genetic Diagnosis. In *In Vitro Fertilization*, 2nd Ed. Cambridge: Cambridge University Press, **2000**: 1-33.
5. **Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW.** Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod*, **1999**; 14:787-792.
6. **Tan BK, Vandekerckhove Patrick, Kennedy R, Keay SD.** Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG*, **2005**; 112:773-780.
7. **Reproductive BioMedicine Online** Vol 13 No 111-12; www.rbmonline.com/Article/2408 on web 10 May **2006**
8. **Enders AC, Nelson DM.** Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat*, **1973**;138:277-300.
9. **Nikas G.** Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod*, **1999**; 14(2):99-106.
10. **Adams SM, Murphy CR.** A successful pregnancy following SEM fine tuning of hormonal priming. *BMC Pregnancy and Childbirth*. **2001**;1(1):3.
11. **Nardo LG, Nikas G, Sinatra F, Nardo F.** Synchronous expression of pinopodes and alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *J Reprod Med*. **2003** 48(5):355-61
12. **Psychoyos A, Nikas G.** Uterine pinopodes as marker of uterine receptivity. *Assisted Reprod Rev*, **1994**;4:26-32.
13. **Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F.** Pinopode expression during human implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2002**; 101:104-108.
14. **Spandorfer SD, Soslow R, Clark R, Fasouliotis S, Davis OK, Rosenwaks.** Histologic characteristics of the endometrium predicts success when utilizing autologous endometrial coculture in patients with IVF failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **2006**; 23(4):185-189.
15. **Freeman M, Whitworth M, Hill G.** Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization. *Human Reprod*, **1995**; 10:408-414.
16. **Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godek RA.** The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Human Reproduction*. **1998**; 13(4): 226-238.
17. **Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A.** Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab*, **1999**; 84:2638-2646.

18. **Barmat LI, Liu H-C, Spandorfer CD, Da mario M, Veeck C, Rosenwaks Z.** Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium: A randomized trial. *Fertil and Steril*, **1998**; 70:1109-1113.
19. **Joo B, Kim M, Na Y, Moon H, Kyu Sup L, Kim H.** The mechanism of action of co-culture on embriyo development in the mouse model: Direct embriyo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril*, **2001**; 75:193-199.
20. **Fukaya T, Chida S, Murakam T, Yajima A.** Is direct cell-to-cell contact needed to improve embriyonic development in co-culture? *Tohoku Exp Med*, **1996**; 180:225-232.
21. **Hill JA.** Maternal-embriyonic cross-talk. *Ann NY Acad Sci*, **2001**; 943:17-25.
22. **Jan Langman.** Female Reproductive System. *Langman's Medical Embryology* ninth edition **2002**.
23. **Moore KL, Persaud TVN.** İnsan Gelişiminin Başlangıcı, Gametogenesis, Fertilization. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**:1-47.
24. **Glasser SR, Aplin JD, Guidice LC, Tabibzadeh S.** Mullerian duct, epithelium, mezenchyme. *The endometrium*. New York: Taylor&Francis, **2002**:1-19.
25. **Brookes M, Zitman A.** Clinical Emryology Atlas and Text.CPR press.**1998**: 50-68.
26. www.besthealth.com/.../images/uterus_parts.jpg.
27. **Dere F** Kadın Ürogenital Sistemi. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. Cilt 1, 5. Baskı. **2006**:35-72.
28. **Netter F**, Genital Sistem Anatomisi. *İnsan Anatomisi Atlası*. 4. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi. **2008**.
29. **Karaöz E.** Özel histoloji. SDÜ Basımevi. Isparta, **2002**:219-225.
30. **Gartner LP, Hiatt JL.** Female Reproductive System. *Color Textbook of Histology*. 2nd edition. **2001**:461-487.
31. **Eşrefoğlu M.** Dişi Üreme Sistemi, Genel ve özel histoloji. 1. Baskı **2004**: 284-300.
32. **Gartner L P, Hatt JL.** Dişi Üreme Sistemi, Renkli Histoloji Atlası. Güneş Tıp Kitabevleri,**2008** İstanbul. 4. Baskı; 360-364.
33. **Maughey-Laulom B, Commenges-Ducos M, Jullien V, Papaxanthos-Roche A, Scotet V, Commenges D.** Endometrial vascularity and on going pregnanacy after IVF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* **2002**; 104:137-143.
34. **Singh I.** The Female Reproductive Organs. *Human Histology*. Fourth Ed. New Delhi, **2002**:286-298.
35. **Gürsoy E, Koptagel E.** Fertilizasyon, İmplantasyon. *Embriyoloji Atlası*. **1997**: 70-80.
36. **Uncu G.** Üreme Endokrinolojisinde Temel Bilgiler. *Reprod. Üreme Endokrinoloji ve İnfertilite*. 1. Baskı, Medikal Yayıncılık İstanbul. **2006**:1-10.
37. **Demir R.** Follikül gelişimi ve menstrual döngü. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Kitabı*;**2006**:565-606
38. **Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO.** Female Reproductive System. *Basic histology*. Eighth edition. Barış Kitapçılık,**1998**:423-433.
39. www.Centrum.com.tr/images/1.ovulasyon.jpg.
40. **Attar E.** Kök Hücreler ve Reprodüktif Dokularda Gen Transferi. *Reprodüktif. Üreme Endokrinolojisi.ve İnfertilite*. **2006**: 144-187.

41. **Brookes M, Zietman A.** Female Genital System Clinically Embryology. CRC Press. **1998**:51-214.
42. **Carlson BM.** Human Embriology and Development Biology. St Louis Mosby, **1994**:85-97.
43. **Nahhas F, Barnea E.** Human embriyonic. Origin early pregnancy factor before and after implantation. *Am J Reprod Immunol*, **1990**;22:105.
44. **Tavmergen E, Tavmergen-Göker.** Yardımla üreme tekniklerinde başarıyı etkileyen faktörler. *İnfertilite*.213-218
45. **Tıraş MB, Aybar F.** İnvitro Fertilizasyon-İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu. *J Surg Med Sci*, **2006**; 2(5):37-41.
46. **Kılınç RA.** Çukurova Üniversitesine Başvuran İnfertil Çiftlerde İn Vitro Fertilizasyon Endikasyonları. Uzmanlık Tezi, T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adana, **2007**.
47. **Biljan MM, Buckett WM, Dean N, Philips SJ, Tan SL.** The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum Reprod*, **2000**; 15(10):2140-2144.
48. **Dey SK, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H.** Molecular cues to implantation. *EndocrRev* **2004**; 25:341-73
49. **Paria BC, Lim H, Wang X-N, Liehr J, Das SK, Dey SK.** Coordination of different effects of primary estrogen and catecholestenogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* **1998**; 139: 5235-5246.
50. **Susan JK,** Molecular Interactions at the Maternal- Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Sem Reproductive Med* **2000**; 18 (3): 237 253.
51. **Sunder S, Lenton E.** Endocrinology of the Peri- Implantation Period. *Clinical Obstetrics and Gynaecology* **2000**; 14 (5): 789-800.
52. **Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK.** Molecular signalling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Dev Biol* **2000**; 11: 67-76.
53. **Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK.** Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* **1996**; 16: 107-122.
54. **Lessey BA.** Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* **2003**;68:809-15
55. **Revel A,** Implementation of integrin 3 level as predictor of implantation in an IVF program. *ASRM/CFAS Annual Meeting*, Montreal, Canada **2005**.
56. **Haddad-Filho J, Cedenho AP, Katz SM.** Endometrial expression of IL-1Rtl in patients undergoing miscarriage or unsuccessful IVF cycles. *RBM Online* **2007**;14:117-124
57. **Creus M, Ordi J, Fabregues F, Casamitjana R, Carmona F, Cardesa A, Vanrell JA and Balasch J.** The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. *Hum Reprod*, **2003**;18:683–693.
58. **Defrere S, Langendonck A, Moulin P, Befahy P, Gonzalez D, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Donnez J.** Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol* **2005**;54:5-12.

59. **Thathiah A and Carson DD.** MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of Tace/Adam17. *Biochem J* **2004**; 382:363–373.
60. **Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA.** Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*, **2005**;11:613-630.
61. **Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Wolf, L.** Use of integrins to date the endometrium. *Fertil. Steril*,**2000** 73:779–787
62. **Carson DD, Rohde LH Surveyor G.** Cell surface glycoconjugates as modulators of embryo attachment to uterine epithelial cells. *Int J Biochem*, **1994**;14(2):3-16.
63. **Flinckinger GL, Elsner C, İllingworth DV, Muechler EK, Mikhail G.** Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of humans and monkeys. *Ann NY Acad Sci*, **1997**; 286:180-189.
64. **Sarnorn BM, Kuo HS, Held B.** Estrogen and progesterone binding site concentrations in human endometrium and cervix throughout the menstrual cycle and in tissue from women taking oral contraceptives. *J Steroid Biochem*, **1978**;9:951-955.
65. **Savouret JF, Chauchereau A, Misrahi M, Lescop P, Mantel A, Baily A, Milgrom E.** The progesterone receptor. Biological effects of progestins and antiprogestins. *Hum Reprod*, **1994**;9:7-11.
66. **Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz İlesanmi AO, Corzeniowski P, Sun J, Chewaliseze K.** Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril*, **1996**; 65:477-4483.
67. **Gökçimen A, Temel S.** İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *S.D.Ü. Tıp Fak Derg*, **2004**;11(4):25-33.
68. **Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK.** Blastocyst's state of activity determines the 'window' of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1993**; 90:10159-10162.
69. **Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F.** Embryo-Maternal Interactions at the Implantation Site: A Delicate Equilibrium. *Gynecology and Reproductive Biology*, **1999**; 83(1):85-100.
70. **Nardo LG.** Human embryo implantation failure and recurrent miscarriage: basic science and clinical. *Reprod Biomed Online*, **2006**;13:11-12.
71. **Achache H, Revel A.** Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, **2006**;12:731-746.
72. **Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M.** The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*, **2006**;12:617-630.
73. **Defrere S, Langendonck A, Moulin P, Befahy P, Gonzalez D, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Donnez J.** Human endometrial epithelial cells (EEC) constitutively express more intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 than endometrial stromal cells (ESC) in culture. *Am J Reprod Immunol* **2005**;54:5-12.
74. **De los Santos MJ, Mercader A, Galan A, Albert C, Romero JL, Pellicer A.** Implantation rates after two, three or five days of embryo culture. *Placenta*, **2003**; 24: 13-19.
75. **Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL.** Concentration of leukemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*, **2002**;17:213-218.
76. **Bee K, Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD.** Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *Int J O & G*, **2005**;112:773-780.

77. **Urman B, Yakın K, Balaban B.** Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *RBM Online*, **2005**; 11:371-381.
78. **Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PGA.** Human embriyo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive tekology. *Reprod Biomed Online*, **2004**; 9:692-715.
79. **Magrigiannakis A, Minas V.** Mekanism of implantation. *RBM Online*, **2007**; 14:102-109.
80. **Susan JK.** Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Sem Reproductive Med*, **2000**; 18 (3): 237-253.
81. **Bentin-Ley U, Sjo'gren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T.** Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod*, **1999**;14:515-520.
82. **Nikas G, Develioğlu OH, Toner JP, Jones Jr. HW.** Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod*, **1999**;14:787-792.
83. **Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM.** Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril*, **2001**;76:782-791.
84. **Psychoyos A, Mandon P.** Scanning electron microscopy of the surface of the rat uterine epithelium during delayed implantation. *J Reprod Fertil*, **1971**;26:137-8.
85. **Sarantis L, Roche D, Psychoyos A.** Displacement of receptivity for nidation in the rat by the progesterone antagonist RU 486: a scanning electron microscopy study. *Hum Reprod*, **1988**; 3:251-255.
86. **Stavreus-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, Eriksson H, Landgren BM, Hovatta O.** Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Molecular human reproduction*, **2002**; 8(8):765-769.
87. **Develioğlu OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW.** Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Fertil&Steril*, **2000**; 74:767-770.
88. **Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E.** Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphteria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphteria toxin sensitivity. *Embo J*, **1994**; 13:2322-2330.
89. **Raab G, Kover K, Paris SK, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M.** Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, **1996**; 122:637-645.
90. **Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR, Lessey BA.** Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril*, **2003**; 79:970-974.
91. **Giudice LC.** Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod*, **1999**; 14:3-16.
92. **Yoshinaga K.** Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Ann N Y Acad Sci*, **1988**; 541:424-431.
93. **de Ziegler D, Bergeron C, Cornel C, Medalie D A, Massai MR, Milgrom E, Frydman R, Bouchard P.** Effects of luteal estradiol on the secretory transformation of human endometrium and plasma gonadotropins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **1992**;74(2):322-331.

94. **Ghosh D, De P, Sengupta J.** Luteal phase ovarian oestrogen is not essential for implantation and maintenance of pregnancy from surrogate embryo transfer in the rhesus monkey. *Hum. Reprod*, **1994**; 9:629–637.
95. **Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A.** Hormonal dependence of pinopodes formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod*, **1991**;6:597–603.
96. **Develioglu, O.H., Hsiu, J.-G., Nikas, G., Toner, J.P., Oehninger, S. and Jones, J.W. Jr.** Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertil. Steril*, **1999**; 71, 1040–1047.
97. **Psychoyos A, Nikas G.** Uterine pinopodes as marker of uterine receptivity. *Assisted Reprod Rev*, **1994**;4:26–32.
98. **Nikas G, Psychoyos A.** Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. *Ann NY Acad Sci*, **1997**; 816:129–142.
99. **Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A.** Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod*, **1995**; 10:1208-1213.
100. **Acosta A, Elberger L, Borghi M.** Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril*, **2000**;73:788–98.
101. **El-Toukhy T. and Taranissi M.** Towards better quality research in recurrent implantation failure: standardizing its definition is the first step. *Reprod Biomed Online*, **2006**;12(3): p. 383-5.
102. **İtemur Duvan C, Şatıroğlu H, Berker B, Çetinkaya H, Kahraman K.** Yardımla üreme tekniklerinde implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörler. *TKlin J Gynel Obst* **2003**,13:466-475.
103. **Simon C, Garcia-Velasco J, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohi J, Pellicer A.** Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril*, **1998**;70:234–239
104. **Noyes RW, Hertig AT, Rock J.** Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*, **1950**;1:3–25.
105. **Key JD and Kempers. RD** Citation classics: most-cited articles from Fertility and Sterility. *Fertil Steril*, **1987**;47:910–915.
106. **Spandorfer SD, Barmat LI, Liu H-C, Mele C, Veeck L, Rosenwaks Z.** Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for IVF patients with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol*, **1998**; 40:377–381.
107. **Barmat LI, Worrilow KC, Payton BV.** Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril*, **1997**; 67:775-779.
108. **Barmat LI, Liu H-C, Spandorfer SD, Kowalik A, Mele C, Xu K, Veeck L, Damario M, Rosenwaks Z.** Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, **1999**; 16(3):121-127.

- 109. Joo BS, Kim MK, Jin Na, Moon HS, Lee KS, Kim HD.** The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril*, **2001**;75:193-199.
- 110. Rubio C, Simon C, Mercader A,** Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod*. **2000**;15 Suppl 6:31-8.
- 111. Kumtepe Y, Kiran H, Tokat Z, Kendirci A, Çetin T, Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ko-Kültür Kullanımı. Arşiv.** **2007**;16:235
- 112. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Ceccani S, Nottola S.** Human Embryo Development and Pregnancies in an Homologous Granulosa Cell Coculture System. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **2000**:Vol. 17, No. 1
- 113. Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandematurel baum J, Junca AM, Salat- Baroux J:** Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* **1993**; 8(12):2133–2140
- 114. Menezo YJ.** Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2004**; 115:12-15.
- 115. Spandorfer SD, Clarke R, Bovis L, Liu H-C, Neuer A, Witkin SS, Rosenwaks Z.** Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial coculture: Correlation with embryonic development and outcome for patients with a history of multiple implantation failures after IVF. *Am J Reprod Immunol*. **2000**; 43(1):6–11.
- 116. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu H-C, Mele C, Veeck L, Rosenwaks Z.** Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for IVF patients with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol*, **1998**; 40:377–381.
- 117. Nottola SA, Heyn R, Camboni A, Correr S, and Macchiarelli G.** Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. *Microsc Res Tech*, **2006**; 508–516.
- 118. Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H.** A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril*, **1997**; 67:120–1
- 119. Feng HL, Wen XH, Amet T, Presser SC.** Fertilization and early embryology: Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod*, **1996**; 1:1525–1528.
- 120. Neimer KE, Hoffman DI, Maxson WS., et al.** Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod*. **1993**; 8:97–101.
- 121. Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC.** Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod*. **1990** 42:301–306.
- 122. Menezo Y, Hasout A, Dumant M., et al.** Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod*. **1992** 7:101–106.
- 123. Schillaci R, Ciriminna R, Cefali E.** Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod*. **1994** 9:1131–1135.
- 124. Yeung WSB, Ho PC, Lan EYL, Chan STH.** Improved development of human embryos *in vitro* by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod*. **1992**; 7:1144 –1149.
- 125. Bongso A, Ng SC, Fong CY, et al.** Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co-culture. *Fertil Steril*. **1992**;58:569 –574.

126. **Bongso A, Fong, CY, Ng SC.** Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. *Fertil Steril.* **1994**;61:976–978
127. **Plachot M, Alvarez S, Merviel P., et al.** Role of endometrial cells in “*in vitro*” embryo development. *Assist Reprod Rev.* **1994** 4:85–95.
128. **Jayot S, Parneix Y, Verdaguer S., et al.** Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*; **1995**: 63:109–114.
- 129 **Saito H, Hirayama T, Koine K., et al.** Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril*; **1994**: 62:555–558.
130. **Quinn P, Margalit R.** Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryo. *J Assist Reprod Genet*; **1996**:13:9–14.
131. **Freeman MR, Witworth CM, Hill GA.** Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following *in vitro* fertilization. *Hum Reprod.* **1995** 10:408–414.
132. **Suzuki S, Kitai H, Tojo R, Seki K, Oba M, Fujiwara T, Lizuka R.** Ultrastructure and some biological properties of human oocytes and granulosa cells cultured *in vitro*. *Fert Steril*, **1981**;35:142–148.
133. **Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R.** Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* **1992**;58:569–74.
134. **Quinn P, Margalit R.** Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* **1996**;13:9–14.
135. **Gondolfi F, Moore RM.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **1987**;81:23–28
136. **Barnea ER, Check JH, Grudzinskas JG, Maruo T.** Implantation and early pregnancy in humans. In: Liu HC, editor. *Advanced Technologies improve embryo implantation after IVF-ET.* London: *The Parthenon Publishing Group*, **1994**.
137. **Quinn P, Margalit R.** Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* **1996**;13:9–14.
138. **Bavister BD.** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* **1995**. 1:91–148.
139. **Tucker MJ, Morton PC, Wright G.** Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. *Hum Reprod.* **1996**. 11:2434–2437.
140. **Ching Liu H, Ying He Z, Mele M.S, Lucinda L. Veeck, Davis O, Rosenwaks Z.** Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin like growth factors and their receptors in coculture of human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility* **1999**; vol. 71:2.
141. **Castro-Rendón W.A, Castro-Álvarez J.F, Guzmán-Martínez C, Bueno-Sánchez J.C.** Blastocyst-endometrium interaction intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res.* **2006** 39:1373–1385.
142. **Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A.** Coculture of Human Embryos with Autologous Human Endometrial Epithelial Cells in Patients with Implantation Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Printed in U.S.A.* **1999**; vol:53: 132–139.

- 143 De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portole's E, Remohí J, Pellicer A, Simo'n C.** Immunoreactive human embryonic interleukin-1 system and endometrial factors regulating their secretion during embryonic development. *Biol Reprod.* 54:563–574.
- 144. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, Pellicer A.** Embryonic regulation of integrins $\beta 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 1$ in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997**; 82:2607–2616.
- 145. Gardner D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft.** Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple transfers. *Fertil Steril*; **1998.** 69:84–88.
- 146. Kübra Asena Terim Kapakin** Transmission Elektron Mikroskopu. *YYÜ Vet Fak Derg.* **2007**, 18(1):105-110
- 147. Bentin-Ley, U., Pedersen, B., Lindenberg, S.** Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J. ReprodFertil.* **1994**; 101, 327–332
- 148 Bentin Ley U.** Relevance of endometrial pinopodes for human blastocysts implantation. *Hum Reprod.* **2000.** 15:67-63
- 149. Adams S, Terry V, Hosie M, Gayer N, Murphy C.** Endometrial response to IVF hormonal manipulation: Comparative analysis of menopausal, down regulated and natural cycles. *Reprod Biol Endocrinol*, **2004**; 30(2):21.
- 150. Ünlü M, Berker S V.** Türk-Alman Jinekoloji Derneği ve II. Reproductive Medicine Tartışmalı Konular ve Çözümler Ortak Kongresi. **2003**;vol4(2)
- 151. Dunn CL, Kelly RW and Critchley HO** Decidualisation of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online*:**2003**; 7,151–161.
- 152. Roberts DK, Walker NJ, Lavia LA.** Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *Am J Obstet Gynecol*, **1988**; 158(4):854-861.
- 153. Parmar T. Sachdeva G. Savardekar L, Katkam RR, Nimbkar-Joshi S, Gadkar-Sable S, Salvi V, Manjramkar DD, Meherji P, Puri CP.** Protein repertoire of human uterine fluid during the mid-secretory phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod*, **2008**; 23(2):379–386.
- 154. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E.** Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, **2002**; 87:2954-2959.
- 155. Iwanaga S, Shimizu M, Matsufuji Y, Tamura H, Nishimura H, Murakami M, Yakushiji M.** Alterations in gap junctions of human endometrial epithelial cells during normal menstrual cycle--freeze-fracture electron microscopic study. *Krume Med J.* **1990**;37(2):111-115.
- 156. Liu HC, Mele CA, Noyes N, Rosenwaks Z.** Endometrial secretory proteins enhance early embryo development. *J Assist Reprod Genet*, **1994**; 11(4):217-224.
- 157. Spandorfer SD, Barmat LI, Navarro J, Liu HC, Veeck L, Rosenwaks Z.** Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril* **2002**;77: 1209–13.
- 158. Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzahoglu N, Yakisn K, Cengiz G, Donmez E** Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Human Reprod.* **2000**;15 2003–2007.
- 159. H. Karagözoğlu, S. Kahraman, A. Biricik, H. Berkil, F. Vanhoğlu, E. Dönmez, N. Fındıklı, G. Karlıkaya, M.** Efficiency of aneuploidy testing in patients with recurrent implantation failure. **2003**

- 160. Li TC, Dockery P, Ramsewak SS, Klentzeris L, Lenton EA, Cooke ID.** The variation of endometrial response to a standard hormone replacement therapy in women with premature ovarian failure. An ultrasonographic and histological study. *Br J Obstet Gynaecol*, **1991**; 98(7):656-661.
- 161. Liu HC, He ZY., Mele CA, Lucinda L. Veeck M.L.T, Davis O, Rosenwaks Z.** Human Endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. *Fertility And Sterility* **1999** Vol. 71, No. 2, February
- 162. Amsterdam A, Rotmensch S)** Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrinol Rev*; **1987** :8:309–337.
- 163. Suzuki S, Kitai H, Tojo R, Seki K, Oba M, Fujiwara T, Lizuka R.** Ultrastructure and some biological properties of human oocytes and granulosa cells cultured in vitro. *Fert Steril*, **1981**;35:142-148.
- 164. Balboni GC, Zecchi S.** On the structural changes of granulosa cells cultured in vitro. Histochemical, ultrastructural and stereological observations. *Acta Anat.* **1981**;110(2):136-45.
- 165. Zhang, H, Vollmer, M, Geyter M, Litzistorf Y, Ladewig A, Durrenberger M. Guggenheim, Miny, P, Holzgreve W, Geyter C.** Characterization of an immortalized human granulosa cell line *Mol. Hum. Reprod.* **2000**;6:146–153.
- 166. Reza M Baghaban Eslami Nejad, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi, Saeed Kazemi Ashtiani.** A comparison of polarized and non-polarized human endometrial monolayer culture systems on murine embryo development. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* **2005**, 2:1743-1050-2-7
- 167. Dimitriadis E¹, White CA, Jones RL, Salamonsen LA.** Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation *Human Reproduction Update* **2005** 11(6):613-630;
- 168. Haddad-Filho J, Cedenho AP, Katz SM.** Endometrial expression of IL-1Rt1 in patients undergoing miscarriage or unsuccessful IVF cycles. *RBM Online* **2007**;14:117-124
- 169. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA.** Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth invitro: a new co-culture model *Hum Reprod.* **2001** May;16(5):836-45.
- 170. Bongso, A, Ng, S.C., Sathananthan, A.H.** Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum. Reprod.* **1989** 706–713
- 171. Mishra. Lei Z.M, and Ch.V. Rao.** A Novel Role of Luteinizing Hormone in the Embryo Development in Cocultures *Biology of Reproduction.* **2003**: 68, 1455–1462.
- 172. Kattal N, Cohen J, M.P.H, Barmat LI,** Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta analysis. *Fertil Steril.* **2008**;90:1069–76.
- 173. Desai N, Szeptycki J, Goldfarb J,** Co-Culture Of Human Embryos With A Novel Endometrial Cell Line Clinical Outcome Data. *Fertil & Steril.* **2006**, 86:Suppl 2,S224.

ÖZGEÇMİŞ

Leyla BAHAR; 09. 11. 1969'da Mersin'de doğdu. İlköğretimi Mersin İnönü İlkokulunda, orta ve lise eğitimini 1986 yılında Tevfik Sırrı Gür Lisesi'nde tamamladı. Yine 1986 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesine başladı. 1993-1995 yılları arasında Hatay ili Yayladağ ve Altınözü ilçelerinin Sağlık Ocaklarında mecburi hizmetini tamamladı. 1996'da Antakya Devlet Hastanesi Acil Servisi'nde çalıştı. 1997-1999 yıllarında Mersin ili merkez köyü Çavak'ta görevini sürdürdü. 1999 yılında 112 Acil Sağlık Hizmetleri'nde görevine devam etti. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi olarak Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2004. yılında doktora yeterlilik sınavına giren Dr. Leyla BAHAR, halen Sağlık Bakanlığı Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinde çalışmaktadır.