



T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN IVF BAŞARISIZLIĞI OLAN  
HASTALARDA PATERAL LENFOSİT  
İMMUNİZASYONUNUN ETKİNLİĞİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. CANAN YILMAZ TORUN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. GAZİ YILDIRIM**

**KASIM, 2012**





T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN IVF BAŞARISIZLIĞI OLAN  
HASTALARDA PATERAL LENFOSİT  
İMMUNİZASYONUNUN ETKİNLİĞİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. CANAN YILMAZ TORUN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. GAZİ YILDIRIM**

**ANA BİLİM DALI BAŞKANI**  
**PROF. DR. CEM FIÇICIOĞLU**

**KASIM, 2012**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

Canan YILMAZ TORUN tarafından hazırlanan "**Tekrarlayan IVF Başarısızlığı Olan Hastalarda Paternal Lenfosit İmmünizasyonunun Etkinliği**" başlıklı bu çalışma, 10.08.2012 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Gazi YILDIRIM

Üye: Prof. Dr. Cem FIÇICIOĞLU

Üye: Doç. Dr. Oluş APİ

*Minettar olduğum canım aileme ve eğime sevgilerimle,*

## TEŞEKKÜR

*Yeditepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim sürecinde mesleki bilgi ve tecrübemin gelişmesinde emeği geçen sayın hocalarım Prof. Dr. Cem FIÇICIOĞLU, Prof. Dr. Ateş KARATEKE, Doç. Dr. Narter YEŞİLDAĞLAR, Doç. Dr. Oluş API, Doç. Dr. Aslı SOMUNKIRAN, Doç. Dr. Rukset ATTAR ve Doç. Dr. Gazi YILDIRIM' a,*

*Bizlere değer veren, bilgi ve deneyimlerini aktarmaktan mutluluk duyan, hiçbir zaman desteğini bizden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız saygı değer hocam Prof. Dr. Cem FIÇICIOĞLU' na,*

*Asistanlık eğitimim boyunca derin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, el becerimin gelişmesinde yardımlarını esirgemeyen, bildiğini öğretmede son derece sabırlı ve cömert olan, aynı zamanda tezimin planlanmasından yazımına kadar hep yanımda olan sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Gazi YILDIRIM' a,*

*Uzmanlık eğitimim süresince yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, mesleki hayatım boyunca her zaman yanımda olduğunu hissedeceğim değerli hocam Doç. Dr. Rukset ATTAR' a,*

*Uzmanlık eğitimimin son 2 senesinde yanında çalışma onuruna sahip olduğum, hazırlamış olduğu seminerlerle bilgi dağarcığımı genişlettiğim değerli hocam Doç. Dr. Oluş API'ye,*

*Tezim sırasında yardımlarını esirgemeyen Op. Dr. Seval TAŞDEMİR, Biyolog Şafak TAVUKÇUOĞLU ve Fertijin Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına,*

*Çalışmalarımız boyunca sürekli bizimle beraber olan, bütün kaprislerimize rağmen yardımlarını bizden esirgemeyen özellikle 6. Kat servis, 2. Kat poliklinik hemşire ve personeli olmak üzere tüm hastane çalışanlarına,*

*Asistanlık sürecimin başında birlikte çalıştığımız ve şimdi uzman olan sevgili kıdemlilerim Op. Dr. Nilüfer ÇETİNKAYA ve Op. Dr. Yücel İNAN' a,*

*Zorlukları birlikte göğüslediğimiz, kardeşlerim gibi olan sevgili asistan arkadaşlarımız Arş. Gör. Dr. Özge KIZILKALE ve Arş. Gör. Dr. Mert YEŞİLADALI' ya,*

*Beni bu noktaya getiren, sevgi ve ilgilerini esirgemeyen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok değerli annem, babam ve kardeşlerime,*

*İstedğim mesleği yapmam konusunda hep yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve hayatımı beraber geçirmekten onur duyduğum eşim Tanay TORUN' a sonsuz teşekkür ve içten sevgilerimi sunarım.*

*Dr. Canan YILMAZ TORUN*

*Kasım, 2012*

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR .....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 İmplantasyon Fizyolojisi .....	3
2.1.1 Apozisyon ve Adezyon.....	4
2.1.2 İnvazyon.....	5
2.2 İnfertilite .....	6
2.2.1 Ovulatuvar Disfonksiyon.....	8
2.2.2 Erkek Faktörü .....	11
2.2.3 Uterin Faktör.....	12
2.2.4 Tubal Faktör.....	12
2.2.5 Açıklanamayan İnfertilite .....	13
2.3 Tekrarlayan IVF Başarısızlığını Etkileyen Faktörler .....	13
2.3.1 Yaş ve Over Rezervi.....	15
2.3.2 Uterin Kavite Anormallikleri.....	19
2.3.3 Oosit Faktörü .....	20
2.3.4 Ovaryan Stimulasyon Protokolleri.....	22
2.3.5 Luteal Faz Desteği .....	29



2.3.6 Doğru Spermin Seçilmesi, Sperm Matüritesi ve DNA Fragmantasyonu ..	30
2.3.7 Azalmış Endometriyal Reseptivite .....	32
2.3.8 Embriyo Transfer Tekniği .....	37
2.3.9 İmmunolojik faktörler.....	39
2.4 Gebelik ve İmmunite .....	39
2.4.1 Allograft Olarak Fetus .....	42
2.4.2 Plasenta .....	43
3. MATERYAL VE METODLAR.....	46
3.1 Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri.....	47
3.2 Paternal Lenfosit Aşısının Hazırlanışı ve Uygulanışı .....	48
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA .....	68
6. SONUÇ .....	76
KAYNAKLAR .....	77

## KISALTMALAR

<b>ART</b>	: Asiste Reprodüktif Teknik
<b>IVF</b>	: İn Vitro Fertilizasyon
<b>ICSI</b>	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>MESA</b>	: Mikrocerrahi Epididimal Sperm Aspirasyonu
<b>TESE</b>	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
<b>PGD</b>	: Preimplantasyon Genetik Tanı
<b>GIFT</b>	: Gamet İntrafallopian Transfer
<b>ZIFT</b>	: Zigot İntrafallopian Transfer
<b>TET</b>	: Tubal Embriyo Transferi
<b>PID</b>	: Pelvik İnflamatuvar Hastalık
<b>PAI</b>	: Plazminojen Aktivatör İnhibitör
<b>ET</b>	: Embriyo Transferi
<b>BBT</b>	: Bazal Vücut Isısı
<b>FSH</b>	: Foliküler Stimulan Hormon
<b>LH</b>	: Luteinizan Hormon
<b>E2</b>	: Östradiol
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
<b>hCG</b>	: Human Koryonik Gonadotropin
<b>AMH</b>	: Antimüllerian Hormon
<b>hMG</b>	: Üriner Menotropin
<b>SHBG</b>	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
<b>OKS</b>	: Oral Kontraseptif
<b>CC</b>	: Klomifen Sitrat
<b>HSG</b>	: Histerosalpingografi
<b>Tv-usg</b>	: Transvaginal Ultrasonografi
<b>MRI</b>	: Manyetik Rezonans İnceleme
<b>OHSS</b>	: Overyan Hiperstimulasyon Sendromu
<b>IUI</b>	: İntrauterin İnseminasyon
<b>HB-EGF</b>	: Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

<b>LIF</b>	: Leukemia İnhibitör Faktör
<b>G-CSF</b>	: Granülosit Koloni Stimulan Faktör
<b>M-CSF</b>	: Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>NK</b>	: Doğal Öldürücü
<b>HLA</b>	: İnsan Lökosit Antijeni
<b>MHC</b>	: Major Histokompatibilite Kompleksi
<b>Th</b>	: T Helper
<b>IVIG</b>	: İntrevenöz immunglobulin
<b>APCA</b>	: Anti-Paternal Sitotoksik Antikor
<b>Ab2</b>	: Anti-İdiotypic Antibodies
<b>MLR-Bf</b>	: Mixed Lymphocyte Reaction Blocking Antibodies
<b>PIBf</b>	: Proegsteronun İndüklediği Blokan Faktör

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1:</b> 2010 WHO Kriterlerine Göre Standart Semen Analiz Değerleri .....	11
<b>Tablo 2:</b> Ortalama Siklus Fekundabilitesi .....	23
<b>Tablo 3:</b> Olguların demografik özellikleri (n=500) .....	52
<b>Tablo 4:</b> Çiftlerin Kan Grupları.....	53
<b>Tablo 5:</b> Tüm Olguların Tedaviyle İlgili Genel Özellikleri .....	58
<b>Tablo 6:</b> Gebelik Sonuçlarına Göre Vakaların Genel Özellikleri .....	59
<b>Tablo 7:</b> Gebelik Sonuçlarının İnfertilite Tipleriyle Karşılaştırılması .....	60
<b>Tablo 8:</b> Gebelik Sonuçlarının Kadın İçin İnfertilite Nedenleriyle Karşılaştırılması	61
<b>Tablo 9:</b> Gebelik Sonuçlarının Kadın İnfertilite Nedenleriyle Kıyaslanması .....	62
<b>Tablo 10:</b> Gebelik Sonuçlarının Erkek İnfertilite Nedenleriyle Karşılaştırılması ....	62
<b>Tablo 11:</b> Gebelik Sonuçlarının Kan Gruplarıyla Karşılaştırılması.....	63
<b>Tablo 12:</b> Gebelik Sonuçlarının Tedavi Protokolleriyle Karşılaştırılması.....	64
<b>Tablo 13:</b> Gebelik Sonuçlarının ET Günüyle Karşılaştırılması .....	65
<b>Tablo 14:</b> Gebelik Sonuçlarının Luteal Destek Protokolleriyle Karşılaştırılması ....	65
<b>Tablo 15:</b> Tedavi Protokolüne Göre Vakaların Karşılaştırılması.....	67

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1: Tekrarlayan İmplantasyon Başarızlıklarını Değerlendirme ve Tedavi .....	14
Şekil 2: Embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlayan faktörler .....	35
Şekil 3: Gebelikte Abortus ve Abortus Karşıtı İmmünolojik Mekanizma .....	40
Şekil 4: Maternal Fetal Arayüzün Biyolojik Önemi.....	45
Şekil 5: Çiftlerin Akralılık Durumları.....	53
Şekil 6: İnfertilite Tipleri .....	54
Şekil 7: İnfertilite Nedenleri .....	54
Şekil 8: İnfertilite Nedeni Kadın Faktörü Olan Hastalar .....	55
Şekil 9: İnfertilite Nedeni Erkek Faktörü Olan Hastalar .....	56
Şekil 10: Tedavi Protokolleri.....	56
Şekil 11: Embriyo Transfer Günü.....	57
Şekil 12: Tüm Olguların Gebelik Sonuçları .....	58
Şekil 13: Gebelik Sonuçlarının İnfertilite Tiplerine Göre Kıyaslanması .....	60
Şekil 14: Gebelik Sonuçlarının Tedavi Protokolleriyle Karşılaştırılması .....	64
Şekil 15: Gebelik Sonuçlarının Luteal Destek Protokolleriyle Karşılaştırılması .....	66

## ÖZET

**Giriş ve Amaç:** İmplantasyonun gerçekleşmesinde ve gebeliğin devamında immunolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızın amacı, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda immunitenin yerini ve önemini ortaya koymak için paternal lenfosit immunizasyonunun gebelik sonuçlarına etkisini araştırmak.

**Materyal ve Metod:** Çalışma retrospektif ve prospektif olarak tasarlandı. Olgularımızı, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesindeki Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi (ÜYTM) ve İstanbul Fertijin Tüp Bebek Merkezi'ne Ocak 2008-Ocak 2012 yılları arasında başvuran ve en az 2 defa tüp bebek tedavisi görmesine rağmen gebe kalamamış 500 hasta oluşturdu. Tekrarlayan spontan abortusu olanlar, 20 yaş altı ve 40 yaş üstü hastalar, diyabet, hipertansiyon ve metabolizma bozukluğu olan çiftler çalışmaya dahil edilmedi. Hepatit B, HIV ve HCV seroloji pozitifliği olan çiftler çalışma dışı bırakıldı. Mikrodoz ve diğer kısa protokol uygulanan vakalar çalışmaya dahil edilmedi. Tüm olgulara embriyo transferi öncesi 3 defa, transfer sonrası 2 defa paternal lenfosit aşısı uygulandı. Çalışmamızda istatistiksel analizde Ki-Kare ( $\chi^2$ ) testi ve Student-t testi kullanıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen tüm vakaların gebelik sonuçlarına bakıldığında olguların 262 (%52)'sinde gebelik izlenmezken, uygulanmış tedaviye rağmen daha önceki tedavilerinde gebelik elde edilememiş 238 (%48) kadında gebelik izlenmiştir.

**Sonuç:** Çalışmamız neticesinde tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda paternal lenfosit immunizasyonu devam eden gebelik oranını %48'ler seviyesine çıkarmıştır. Standardize ve yaygın olarak uygulanabilen testler ve etkinliği kanıtlanmış tedavi yöntemleri olmadığından, tekrarlayan IVF başarısızlığında allojenik lenfosit izoimmunizasyonu ancak iyi tasarlanmış bir klinik çalışma koşullarında çiftlere önerilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Paternal lenfosit immunizasyon, tekrarlayan IVF başarısızlığı, infertilite.

## SUMMARY

**Introduction and objective:** Immunological factors are thought to be a significant part of implantation process and pregnancy. Aim of this study is to discuss the effects and significance of paternal lymphocyte immunization on pregnancy outcomes in infertile women who have recurrent implantation failure.

**Materials and methods:** This study was designed as a retrospective and prospective study. The subject population consisted of 500 women undergoing infertility investigation at Yeditepe University Assisted Reproduction Center and Istanbul Fertijin IVF center between January 2008 and January 2012. Couples were included if they had 2 or more IVF failure. Couples were excluded if they 1) had recurrent abortus, 2) were below or above 40 years age, 3) had diabetes , hypertension and metabolism disorder, 4) had positive serology for Hepatitis B, HIV and HCV, 5) had microdose or other short term protocol treatments. All subjects had paternal lymphocyte immunization treatment 3 times before and 2 times after embryo transfer. Ki-square ( $\chi^2$ ) and Student-t tests were used in statistical analysis.

**Results:** Among all subjects included, 262 (52%) patients had no pregnancy in spite of treatment and 238 (48%) patients had ongoing pregnancy.

**Conclusion:** Paternal lymphocyte immunization had a significant influence on pregnancy rates (48%) in patients with repeated IVF failure. However, since this procedure is not standardized enough and not yet on approved routine usage, it should only be applied in a well-designed clinical study.

**Key Words:** Paternal lymphocyte immunization, repeated IVF failure, infertility.

## 1. GİRİŞ

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınamaması olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite, reproduktif dönemdeki çiftlerin %10-15'i ilgilendirmektedir [1]. Birinci yılın sonunda genç sağlıklı çiftlerin %85-90'ı gebe kalabilmektedir.

Batı toplumlarında azalmış fertilitte ve doğum oranları; artmış evlilik yaşı, gecikmiş doğum yaşı, kadınlar arasında artmış eğitim düzeyi, doğum kontrol yöntemlerinin yaygınlaşması ve sosyoekonomik şartlardaki değişiklikler gibi faktörlere bağlanmıştır. Bu nedendir ki infertilite insidansı giderek artmaktadır.

Günümüzde infertiliteye yönelik tedavilerde önemli gelişmeler olmuştur. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişip yaygınlaşmasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Yardımcı Üreme Teknolojisi-ART (Asiste reproduktif teknik), overden oositlerin elde edilmesini sağlayan tüm teknikleri içermektedir. İlk ve en yaygın yöntem in vitro fertilizasyondur (IVF). IVF ile ilk gebelik 1978'de sağlanmıştır [2]. Günümüzde teknikler gelişmiş ve genişlemiştir. ART artık ejakulat ile (ICSI-intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu), mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA) veya testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile elde edilmiş spermlerin intrasitoplazmik olarak enjekte edildiği yöntemleri, yardımcı embriyo tutunma tekniğini (assisted hatching) ve implantasyon öncesi genetik tanıyı (PGD) içermektedir. ART'nin diğer çeşitleri olan tubal oosit ve sperm transferi (GIFT), zigot transferi (ZIFT) ve tubal embriyo transferi (TET) invazif tekniklerdir ve diğerleriyle karşılaştırıldıklarında çok da avantajlı değildir.

IVF, ART teknikleri arasında en sık uygulananıdır. Geçirilmiş pelvik inflamatuvar hastalık (PID) veya ileri evre endometriozise bağlı şiddetli tubal faktör varlığı, erkek faktörü, multifaktöriyel infertiliteli ovaryan yetmezlik, yaşa bağlı veya açılanamayan infertilite IVF'nin en çok kullanıldığı alanlardır. Oligoastenospermi ve teratospermi de tercih edilen yöntem ise ICSI (intarsitoplazmik sperm enjeksiyonu)' dir.



Embriyonun implantasyonunu arttırmak üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Ama tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının etyolojisi aydınlatılamamıştır ve muhtemelen sorunun tek bir nedeni yoktur.

Biz çalışmamızda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda immunitenin yerini ve önemini belirlemek amacıyla paternal lenfosit immunizasyonunun (lenfosit aşısının) gebelik sonuçlarına etkisini araştırdık.

## 2. GENEL BİLGİLER

İmplantasyon, embriyonun endometriuma tutunması ve epiteli geçip maternal dolaşım sistemine plasentayı oluşturmak için ulaşmasını kapsayan bir işlem olarak tanımlanmaktadır. İmplantasyon fertilize oositin uterusu girişinden iki ile üç gün sonra olmaktadır [3].

### 2.1 İmplantasyon Fizyolojisi

Fertilizasyondan üç gün sonra sekiz hücreli klivaj evresindeki embriyo oluşur. Bir gün sonra da morula aşamasındaki embriyo uterin kaviteye girmektedir. Otuz ile ikiyüz hücre arasında değişen blastokist, fertilizasyonun altı ile yedinci günlerinde zona pellusidanın ayrılmasından sonra endometriuma implante olur. Proliferatif endometriumdaki sekretuar endometriuma geçiş, implantasyon için gerekli olan reseptivitenin elde edilmesi için son derece önemlidir. Proliferatif fazda ovaryan folikül gelişimi ve östrojen salınımının artımı söz konusudur. Steroidal etki sonucu endometrium gelişmesi ve rekonstrüksiyon olur. Bu proliferasyon, özellikle blastokist implantasyon sahası olan uterusun üst üçte ikilik kısmında artan mitoz, nükleer DNA ve sitoplazmik RNA sentezi ile belirgin hale gelir. Östrojen ve progesteron reseptör konsantrasyonları ovulasyondan önce siklus ortasında tepe noktasına ulaşır. Proliferasyon sırasında endometrium ortalama 0,5 mm'den 3,5–5 mm'lik tek kat kalınlığa ulaşır. Ovulasyondan sonra endometrium hem östrojene hemde progesterona karşı reaksiyon gösterir. Devamlı östrojen varlığına rağmen endometrial kalınlık preovulatar dönemde 5–6 mm olur. Stromal elemanların her biri büyümeye devam ederken endometrial kalınlığın sabit kalması bezlerde ve spiral damarlarda kıvrılmaya neden olur. Ovulasyon olduğunda ilk histolojik bulgu, siklusun 17–18. gününde subnükleer intrastoplazmik glikojen vakuollerinin bez epitelde görülmesidir. Dev mitokondriler ve nükleolar kanal sistemi bez hücrelerde görülür. Nükleolar kanal sistemi progesterona bağlı olarak görülen özgün bir oluşumdur. Bu yapısal değişiklikleri takiben glikoprotein ve peptidlerin endometrial kaviteye aktif sekresyonu başlar. Plazmanın transüdayonu da endometrial

sekresyona katkıda bulunur. Önemli immunglobulinler dolaşımdan alınır ve epitel etrafında yapılmış olan bağlayıcı proteinler ile kaviteye verilir. Sekresyonda tepe noktasına siklus ortası gonadotropin zirvesinden yedi gün sonra ulaşılır. Bu da blastokist implantasyonu ile aynı zamana denk düşmektedir. Endometrium implantasyon zamanında midluteal fazda 10–14 mm'lik çift kat kalınlığındadır. Endometrial reseptivite penceresi 28 günlük normal bir siklusun 20–24 günleri arasında sınırlandırılmıştır [3].

İmplantasyon, apozisyon, adezyon ve invazyon olmak üzere üç evreden oluşmaktadır.

### **2.1.1 Apozisyon ve Adezyon**

İnsan blastokisti bir ile üç gün arası endometrial kavitede sekresyon içerisinde kalmaktadır. Bu süre içerisinde zona pellusidasından ayrılarak (hatching), endometrium epiteline tutunmaya hazırlanmaktadır. Blastokistin embriyonik kutbunun tersi bölgesinde hatching başlangıç noktası oluşur. 'Zona kırıcı hücreler' olarak adlandırılan özelleşmiş trofoblastik hücreler bu noktada toplanarak zona pellusidanın erimesini sağlarlar. Zona kırıcı hücreler zona pellusidayı eritebilen keseciklere sahiptirler. Mekanik olarak, mikrovilus ve monofilamanların kontraksiyonlarıyla da hatching işlemi gerçekleşir. Bu süre içinde blastokist bir iç hücre kitlesine (embriyo) ve bir trofoektoderme (plasenta) ayrılır [4].

Blastokist endometrium ile daha yakın bir temasa geldikçe yüzeyindeki mikroviluslar kısalır ve epitelyal hücrelerin luminal yüzeyindekiler ile bağlantı kurarlar. Sonuçta hücre membranlarının son derece yakın bir temasta olduğu ve bağlantı komplekslerinin kurulduğu adhezyon evresine ulaşılır. Adhezyon aşamasında integrin ve selektinleri de içeren tüm adhezyon molekülleri görev alır. Desidualize endometrium ve erken embriyo hücre adhezyonunu sağlayan laminin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks komponentlerini eksprese ederler [5]. Bu dönemde büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte birçok molekül embriyo ile endometrium arasında sinyal iletimine yardımcı olarak adhezyonu sağlarlar. Glycodelin-A da immunsupresif özelliği ile embriyonun maternal reddini engeller [6].

### 2.1.2 İnvazyon

İmplantasyon işleminin başında trofoektoderm; dışta multinükleuslu sinsityotrofoblast ve içte sitotrofoblast tabakalarını oluşturmak üzere farklılaşır. Sinsityotrofoblast tabakası, aralarındaki hücre zarlarını kaybederek birbirleriyle birleşmiş olan trofoblast hücre ağından meydana gelir. Sinsityotrofoblast implantasyonun öncü birimini oluşturur. Endometriumda ekstraselüler matriks proteinlerini yıkmak için kollajenaz ve plazminojen aktivatörü gibi enzimleri salgılar. Plazminojen aktivatörü, plazminojenin plazmine dönüşümünü sağlayarak, metaloproteinazların salınmasına yol açar. Sonuçta matriks proteinleri yıkılarak, invazyon gerçekleşir. Uterin spiral arterioller sitotrofoblastlar ile invaze edilir ve maternal endotel myometriumun ilk üçte birlik kısmına kadar sitotrofoblastlar tarafından kaplanır [5]. Trofoblastik aktivitenin kısıtlanması büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, enzimlerin, başlatıcı ve engel olucu faktörlerin arasındaki denge ile gerçekleşir. PAI-1 (Plazminojen aktivatör inhibitör), desidual hücrelerin major ürünüdür. Menstruasyon sırasında aşırı kanamayı ve erken gebelikte trofoblastik invazyonu sınırlar [7].

Tekrarlayan in vitro fertilizasyon başarısızlığı, ardışık üç veya daha fazla IVF/ICSI-ET siklusunda toplam 10 adet morfolojik olarak iyi kalitede embriyonun anatomik olarak normal yapıya sahip uterusu transferini takiben gebelik oluşmaması olarak kabul edilmektedir [8].

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının etyolojisi aydınlatılamamıştır ve sorunun muhtemelen tek bir nedeni yoktur. O nedenle ki, çiftlerin üç veya daha fazla başarısız deneme sonrası immunolojik, anatomik, genetik ve diğer faktörler açısından tekrar değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Başarılı bir implantasyonun gerçekleşebilmesi için blastokistin belli bir zaman aralığında reseptif endometriumla karşılaşması gerekir. Endometrium menstrual siklus boyunca yeniden yapılırken ancak kısıtlı bir zaman aralığında embriyoya reseptif durumda olur. Bu zaman aralığına implantasyon penceresi dönemi denir. Doğal bir siklusta embriyo ovulasyondan ortalama dört gün sonra uterin kaviteye girer [9]. Ovulasyondan altı ile sekiz gün sonra endometrium blastokist implantasyonu için reseptif hale gelir. Ortalama dört gün boyunca reseptif halde kalır [10]. Yüksek kalitedeki embriyoların alıcı annelere transferinin, verici annelere

transferinden daha iyi implantasyon oranlarıyla sonuçlandığı çalışmada, verici annelerde hiperstimülasyona bağlı estradiol yüksekliğinin endometrial reseptiviteyi olumsuz etkilediğini göstermektedir [11]. Düşük embriyo kalitesi implantasyon başarısızlığının en önemli nedenlerinden biridir [12].

Ovaryan stimülasyon uygulanan sikluslarda implantasyon oranını arttırmak için implantasyon penceresi dönemini belirleyebilmek ve seçilen en kaliteli embriyoyu bu dönemde transfer etmek gereklidir. Endometrial reseptiviteyi ve embriyo kalitesini, yardımcı üreme teknolojilerinin uygulandığı sıklusa zarar vermeden değerlendirilebildiği yöntemlerin bulunması gerekir. İmplantasyon oosit matürasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometrium arasındaki kompleks ilişkiler sonucunda olur [13]. Embriyo gelişimiyle endometrial matürasyonun senkronizasyon içerisinde olmasıyla başarılı blastokist implantasyonu gerçekleşir. Yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı sikluslarda implantasyon oranlarını arttırabilmek için endometrial reseptiviteyi gösteren ve invaziv olmayan yöntemler bulmak gerekir.

İnfertilite ve IVF başarısını etkileyecek faktörler ile çalışmamızda implantasyonun gerçekleşmesinde immunolojik faktörlerin rolü aşağıda anlatılmaya çalışılmıştır.

## **2.2 İnfertilite**

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite, reproduktif dönemdeki çiftlerin %10-15'i ilgilendirmektedir [1]. Birinci yılın sonunda genç sağlıklı çiftlerin %85-90'ı gebe kalabilmektedir.

Populasyon demografisindeki değişiklikler, biyolojik olarak inaktif olma eğiliminde olan ve yaşı ilerlemiş kadınların da gebe kalma isteğinin artmasına yol açmaktadır. Fertilitenin yaşla beraber azalması nedeniyle infertil çiftler tüm tedavi seçeneklerini denemektedir. Bu nedendir ki, son yıllarda infertiliteye yönelik tedavilerde ciddi yenilikler ve ilerlemeler olmuştur.

- Kadınlar arasında yaygınlaşan eğitim ve kariyer isteği
- İleri yaşta yapılan evlilik ve boşanma oranlarının artması
- Aile planlaması ve doğum kontrolüne yönelik gelişmeler
- Çocuk doğurma yaşının artması

- Azalmış aile sayısı
- Cinsel yolla bulaşan hastalıkların sıklığının artması gibi durumlar genel popülasyonda fertilitenin azalmasına neden olmuştur.

İnfertilite nedenleri arasında en iyi açıklanmış olanı, kadın fertilitesi ve yaşlanma arasındaki ilişkidir. Kontrasepsiyonun yasaklandığı doğal yaşamı tercih eden topluluklarda yapılan çalışmalar infertilitenin yaşla beraber azaldığını gösteren en iyi kanıtlardır [14]. Ancak, ileri kadın yaşının over rezervi üzerindeki olumsuz etkisinin yanında, çocuğu olan kadınların tekrar gebe kalmak istememesi, yaşla beraber cinsel istek ve cinsel ilişki sıklığının azalması ve de fertilitayı etkileyen hastalıkların (miyom, endometriozis, pelvik enfeksiyon) sıklığının yaşla beraber artması, kadın fertilitésinin azalmasına ek olarak katkıda bulunmaktadır.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre, doğurganlık oranı 20-24 yaşları arasında en yüksek seviyededir. Doğurganlık oranı 30-32 yaşına kadar hafifçe azalırken, 32 yaşından sonra azalma ivme kazanır. Bu azalma 40 yaşından sonra iyice hızlanmıştır.

- 25-29 yaşlarında %4-8
- 30-34 yaşlarında %15-19
- 35-39 yaşlarında %26-46
- 40-45 yaşlarında %95 oranında fertilitite azalır.

Son 15-20 yılda, tüm yaş gruplarında elde edilen gebelik oranları artmış olsa da 1989'dan beri toplanan veriler doğrultusunda "kadın yaşının", ART başarısını etkileyen tek ve en önemli neden olduğu bildirilmiştir. İlerleyen yaşla birlikte, elde edilen oosit ve embriyo sayısı azalır, embriyo fragmantasyon oranı artar ve implantasyon oranı azalır [15]. Yaş ilerledikçe gebelik kayıplarının artması da dikkat çeken diğer bir noktadır.

Yaş faktörü (özellikle >35 yaş), infertilite üzerine bağımsız olarak çok etkilidir. Yaş ve infertilite süresinden bağımsız olarak;

- 35 yaş üzeri kadınlar
- Adet düzensizliği olanlar
- Pelvik enfeksiyon ve endometriozis öyküsü olanlar
- Kötü semen kalitesi olduğu bilinen veya şüphelenilen çiftler infertilite değerlendirilmesine alınmalıdır.

İnfertil çiftlere değerlendirilmeye alınırken, normal doğurganlık ve üreme süreci hakkında bilgilendirme yapılmalıdır. Yaş ve fertilité arasındaki ilişkinin yanında, siklus başına gebe kalma olasılığının (fekundabilite) yaklaşık %20 olduğu vurgulanmalıdır. Gebelik oranlarının ise;

- İlk 3 ayda %57,
- İlk 6 ayda %72,
- İlk 1 yılda %85,
- Yılda %93 olduğu belirtilmelidir.

Fertilizasyon ve takibinde spontan gebeliğın oluşması için birtakım faktörlerin birarada bulunması ve kusursuzca çalışması gerekmektedir:

- Sperm serviks bırakılmalı ve depolanmalı, uterus içine girip fallop tüplerine ilerleyebilmeli ve oositi dölleme yeteneğine sahip olmalı (erkek faktörü)
- Düzenli ve siklik olarak matur oosit ovüle olabilmeli (ovaryan faktör)
- Serviks spermi yakalayabilmeli, elemine edebilmeli, olgunlaştırmalı, uterus ve tubalara iletebilmeli (servikal faktör)
- Fallop tüpleri ovüle olmuş oositi yakalayabilmeli, sperm ve embriyonun taşınmasını sağlayabilmeli (tubal faktör)
- Uterus embriyo implantasyonu için uygun özellikte olmalı, normal büyüme ve gelişme için kapasitesi yeterli olmalı (uterin faktör).

İnfertiliteye sebep olan başlıca nedenlere değinecek olursak:

- Ovulatuvar disfonksiyon ...%15
- Tubal ve pelvik patoloji ...%30-40
- Erkek faktörü ...%35
- Açıklanamayan infertilite ...%10
- Uterin patoloji ...< %5

### **2.2.1 Ovulatuvar Disfonksiyon**

İnfertil çiftlerdeki ovulasyon bozukluğu yaklaşık %15 sıklıkta görülmektedir. Normal bir sperm, kadın genital sisteminde 3-5 gün kalabilir ve bu zaman zarfında oositi fertilize edebilir. Oosit için bu zaman 12-24 saattir [16]. Ovulasyon ile fertilité azalır ve ovulasyondan sonra fertil dönem sonlanır. Bu nedenle fertilitenin en yüksek

olduğu dönemi tespit etmeye yönelik bir takım testler pratik uygulamada kullanılmakla birlikte hiçbir test ovulasyonun kesin olarak gerçekleştiğini göstermez. Ovulasyon tespiti amacıyla yapılan testler şunlardır:

- Menstruel öykü
- Bazal vücut ısısı
- Serum progesteron konstrasyonu
- Üriner LH salınımı
- Endometriyal biyopsi
- Transvaginal ultrasonografi ile ovulasyon takibi

### **2.2.1.1 Menstruel öykü**

Normal ovulasyonu olan kadınlarda adetler genellikle düzenli, miktar ve süre açısından sabittir. Ayrıca premenstruel veya menstruel semptomlarla birliktelik gösterir. Anovulatuvar kadınlarda menstruel siklus her açıdan düzensizdir.

### **2.2.1.2 Bazal vücut ısısı (BBT)**

BBT, dinlenme durumundaki vücut ısısıdır. Pratikte her sabah yatar pozisyondaya kalkmadan ölümü yapılmalıdır.

Bazal vücut ısısı foliküler fazda duşuk düzeyde iken luteal fazda 0.4-0.8 derece artış gösterir ve tekrar düşerek mens döneminde bazal seviyeye iner. Ovulatuvar kadınlarda bazal vücut ısısında bifazik patern izlenmelidir. Ovulasyondan bir gün önce ya da ovulasyon gunu bazal vücut ısısının en duşuk seviyesi izlenir. Termojenik kayma yani bazal vücut ısısının yükselmeye başlaması, progesteron konsantrasyonu >5 ng/ml olduğunda gerçekleşir. Bu dönem LH yükselişinden 1-5 gün sonra başlar ve ovulasyondan sonraki dördüncü güne kadar sürer. Fertil dönem BBT en yüksek dereceye ulaştığında sona erer. Fertilitenin en yüksek olduğu dönem, siklus ortası BBT artışından önceki 7 gunluk dönemdir. Ovulasyon zamanının saptanmasındaki karmaşıklığı gidermek için birkaç siklus takip edilmeli ve ısı değişikliğinin olduğu en erken ve en geç sureler tespit edilmelidir. Buna göre ilişki zamanlaması, ısı artışının olduğu en erken dönemden en geç döneme kadar gün aşırı ilişki şeklinde olmalıdır. BBT'nin diğer ovulasyon tespit testlerine üstünlüğü maliyetinin duşuk olmasıdır. Ancak bazı kadınlarda, düzenli ovulasyon olmasına rağmen bifazik patern gözlenmediği akılda tutulmalıdır.



### **2.2.1.3 Serum progesteron konsantrasyonu**

Foliküler fazda serum progesteron düzeyi <1 ng/ml'dir. LH değerinin yükseldiği gün progesteron konsantrasyonu hafifçe artarak 1-2 ng/ml olur. Progesteronun bu artışı ovulasyondan sonra 7-8 gün devam eder ve menstruasyondan hemen önce azalmaya başlar. Ovulasyonun göstergesi 3 ng/ml (5 veya 10 ng/ml kabul edenler de vardır) üzerindeki değerlerdir. Progesteronun en yüksek değerlerine ulaştığı menstruasyondan bir hafta öncesi, progesteron ölçümü için en uygun zamandır. Progesteronun miktarı ve süresi korpus luteumun fonksiyonel kapasitesini, dolayısıyla luteal fonksiyonun kalitesini gösterir. Ovulasyondan sonraki 5.-9. günler arasında alınan üç ölçümün toplamının 30 ng/ml olması veya tek bir ölçümün 10 ng/ml olması luteal faz eksikliğinin olmadığını göstergesidir [17].

### **2.2.1.4 Üriner LH salınımı**

Siklus ortası LH artışı 48-50 saat sürmektedir. Test sonuçları, sıvı alım miktarı ve testin uygulandığı zamana duyarlıdır. Testin saat 16 ve 22 arasında yapılması önerilir, çünkü LH tipik olarak sabah saatlerinde salınır ve ancak birkaç saat sonra idrarda tespit edilebilir. Genellikle ovulasyon, idrar LH artımından 14-26 saat sonra ve genellikle 48 saat içinde olmaktadır. Bu nedenle fertilitenin en yüksek olduğu dönem LH pikinin olduğu gün ve takip eden iki gündür. LH artışından sonraki gün, planlanmış ilişki ve inseminasyon için en uygun gündür [18-20].

### **2.2.1.5 Endometriyal biyopsi**

Korpus luteumun fonksiyonel kapasitesini ve end-organ yanıtını değerlendiren bir testtir. Progesteronun, endometrium üzerinde yaptığı değişiklikler gözlenerek ovulasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği izlenir. Anovulatuvar kadınlarda endometrium hep proliferatif hatta hiperplazik tiptedir. Endometrial biyopsi diğer tanı yöntemlerinden daha fazla bilgi sağlamaz, ancak endometrial hiperplaziyi ya da kronik endometriti ya da luteal faz eksikliğini tanımak açısından faydalıdır.

İnfertil kadınlarda, luteal faz eksikliğinin görülme prevalansı %5-10 civarında olup, bu oran tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda daha yüksektir. GnRH pulse frekansını ve kısa hipofizer cevabı bozan ekstrensek veya intrensek birçok faktör, luteal faz defektine neden olabilir (örn: endokrinopatiler, östrojen klirensinin azalması, SHBG seviyeleri, vs.). Histolojik tarih ve örnekleme tarihleri arasındaki

fark  $<2$  gün ise, korpus luteum fonksiyonları normaldir. Histolojik tarih ve örnekleme tarihleri arasında  $>2$  gün fark varsa luteal faz yetmezliğinden bahsedilebilir. Örnekleme, premenstruel dönemde yapılmalıdır [21,22]. Luteal faz yetmezliği en az iki örnekleme ile teyid edilmelidir, çünkü normal ovule olan kadınlarda da sporadik olarak luteal faz defekti gerçekleşebilir.

### 2.2.1.6 Transvajinal Ultrasonografi (Tv Usg)

Ovumun atılmasından önceki ve sonraki olayların değerlendirilmesine dayanır. Gelişiminin son dönemlerinde preovulatar folikül günde 2mm büyür. Ovulasyondan sonra hızla folikül küçülür, kenarları düzensizleşir, internal eko dansitesi ve cul-de-sac'daki sıvı dansitesi artar [23,24]. Özellikle eksojen gonadotropinler ile ovulasyon induksiyonu yapılan vakalarda, Tv Usg folikül sayı ve boyut takibi için vazgeçilmezdir.

### 2.2.2 Erkek Faktörü

Semen analizi (Tablo 1) ile erkek faktörden şüphelenilerek ek klinik ve biyokimyasal değerlendirmelere yönelinir. Konsantrasyon, motilite ve morfoloji özellikle önemlidir. Bu parametrelerden bir tanesi bozursa, infertilite olasılığı 2-3 kat, iki tanesi bozursa 5-7 kat, üçü de bozursa 16 kat artar.

**Tablo 1:** 2010 WHO Kriterlerine Göre Standart Semen Analiz Değerleri

Volüm	1.5 ml
Ph	$\geq 7.2$
Sperm Konsantrasyonu	$\geq 15$ milyon/ml
Total Spermatozoa Sayısı	$\geq 39$ milyon/ejekülat
Total Motilite	$\geq \%40$
Progresif Motilite	$\geq \%32$
Morfoloji	$\geq \% 4$
Canlılık	$> \%58$ spermatozoa
İmmunbead testi (IBT)	$< \%50$ partikül bağlanmış spermatozoa
MAR (Mikst antiglobulin reaksiyon) Testi	$< \%50$ partikül bağlanmış spermatozoa

Erkek faktörü dışında sperm ve mukus ilişkisi de incelenmelidir. Östrojen, servikal mukus salınımını artırır ve viskozitesini azaltır, servikal mukus berraklaşır sperm

gecişine izin verir. Progesteron ise viskoziteyi artırır. Post-koital test (Sims-Huhner) testi ile servikal faktör infertilitesi taranabilir.

### **2.2.3 Uterin Faktör**

Uterin anomaliler infertilitenin nadir nedenlerindedir. Uterusun konjenital malformasyonları, leiomyomlar ve intrauterin adezyonlar fertilitiyi olumsuz etkileyen uterin anormallikler olmasına karşın endometriyal poliplerin infertilite üzerine etkisi belirsizdir.

Septat uterus, fertil ve infertil kadınlarda eşit oranda (%1) görülmektedir, ancak tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda daha fazladır (%3.5). En sık görülen ve infertilite ile en fazla ilişkisi olan konjenital malformasyondur. Septal kan akımının bozukluğu, implantasyona uygun bir alan olmaması embriyo gelişimini olumsuz etkilerken, relatif servikal yetersizliğin de bu duruma eşlik etmesi infertilite ile ilişkisini açıklamaktadır.

İnfertiliteyi etkilediği kesinlikle bilinen, en kötü yerleşimli miyom, kornual miyomdur. Tüpün interstisyel segmentini bozar, uterin kontraktilite ve ovum-sperm transportu bozular. Submukoz miyomlar da implantasyonu bozarak infertiliteyi etkiler. Subseröz ve intramural miyomlar da ise, endometriyal kavite bozulmuyorsa fertilitate etkilenmez. Posterior duvarda yerleşimli miyomlar, adezyon riskini arttırdığı için infertilite açısından risklidir.

Asherman sendromu; hipomenore, amenore veya dismenore ile kendini gösterir. Mukozal, fibromuskuler, ya da konnektif dokudan meydana gelen bantlar vardır. Histeroskopik adezyolizis sonrası, normal menstruasyon düzeni %70-90 oranında, gebelik ise %25-70 oranında sağlanır.

### **2.2.4 Tubal Faktör**

Tubal ve peritoneal patoloji en sık görülen infertilite nedenlerindedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %30-35'inde rastlanır.

Tubal faktörlerde mekanizma sperm ve ovumun transportuna engel olan anatomik anormalliklerdir.

İnfertil kadınlarda tubal potansi değerlendiren iki test: HSG ve laparoskopidir.

İlk PID atağından sonra tubal adezyon riski %10-15, ikinci PID'den sonra tubal adezyon riski % 23-35, üçüncü ataktan sonra ise % 54-75 tir. Laparoskopik adezyolizis sonrası, ilk bir yıl içerisinde, gebelik şansı %50, hafif dereceli distal okluzyonlarda gebelik şansı %80, orta dereceli okluzyonlarda %30, ciddi okluzyonlarda ise %15'dir. Distal tubal okluzyonların prognozunu belirleyen adezyon dışındaki faktörler, tubal kalınlık ve ampuller mukozal yapıdır. Birçok gebelik cerrahiden sonraki iki yıl içinde gerçekleşir. Tanıda, HSG (histerosalpingografi) orta derecede duyarlı, nispeten daha özgündür; yani HSG tubal açıklık gösterdiğinde tubanın gerçekten açık olma ihtimali %60'dır, ancak kapalı olma ihtimali düşüktür (%5).

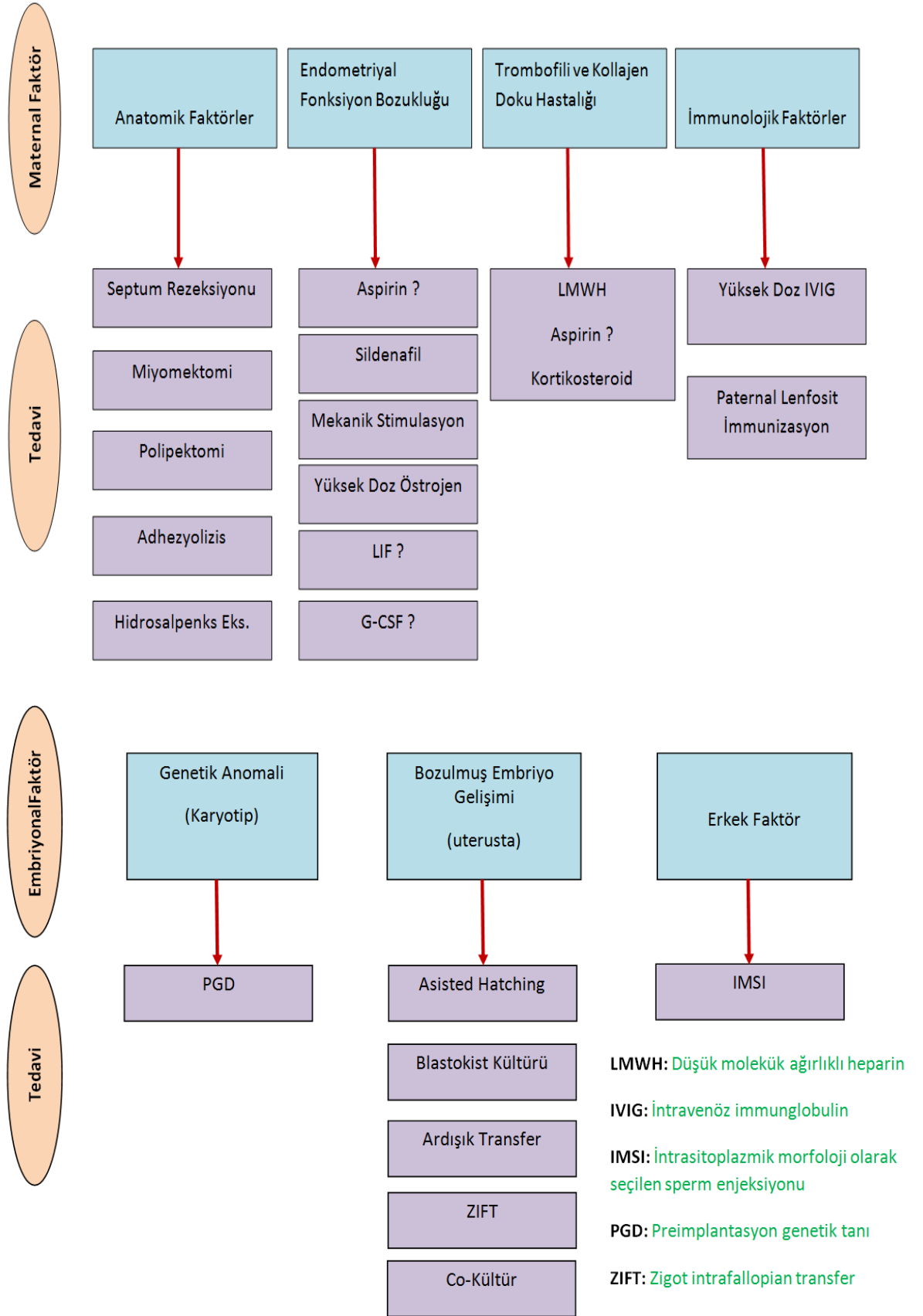
### **2.2.5 Açıklanamayan İnfertilite**

İnfertil çiftlerin %10-30'ında infertilite nedeni açıklanamaz. Bu hastalar, normal semen ve normal ovulatuvar fonksiyona sahip, normal uterus yapısı ve bilateral tubal açıklığı olan hastalardır.

Nedeni açıklanamayan infertilite, standart değerlendirme yöntemleriyle tanısı konulamayan sperm veya oosit fonksiyon anormallikleri, fertilizasyon, implantasyon veya preembriyo gelişim bozukluklarını içermektedir. Bu hastalarda siklus fekunditesi %2-4'tur. (Ortalama siklus fekundabilitesi normalde %20-25). Tedavi siklus fekunditesini arttırmaya yöneliktir [25].

### **2.3 Tekrarlayan IVF Başarısızlığını Etkileyen Faktörler**

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının etyolojisinde rol oynayan uterus, endometrium ve tubalara ait sorunlar, embriyo kusurları ve diğer etkenler incelenecek çözüm önerileri tartışılacaktır (Şekil 1).



**Şekil 1:** Tekrarlayan İmplantasyon Başarızlıklarını Değerlendirme ve Tedavi ([26]'dan modifiye edilmiştir).

### 2.3.1 Yaş ve Over Rezervi

Bir kadının kronolojik yaşı her zaman overyan yaşı ile eşdeğer olmayabilir. Bu nedenle tedavi, kadının kronolojik yaşına göre değil, over yaşına göre planlanmalıdır. İnfertilite nedenlerini anlamaya çalışırken, öncelikle reproduktif yaşlanma fizyolojisini bilmek önemlidir. Fetal hayatta germ hücreleri mitoz ile bölünerek, 16-20. gebelik haftasında 6-7 milyon oogoniayı oluşturur. Bu haftadan sonra germ hücre popülasyonu apoptozis nedeniyle azalır. 1. mayoz bölünmeden sonra germ hücre sayısı, doğumda 1-2 milyon olup, pubertede 300-500 bin civarındadır. 35-40 yıllık reproduktif hayat boyunca sadece 400-500 oosit ovüle olur. Geri kalan oositler ise atreziye uğrar. Reproduktif dönem boyunca, 37-38 yaşına kadar, folikül sayısında azalma oranı sabittir ancak bu olay menapozdan 10-15 yıl önce ivme kazanır. Menapozda, overde yaklaşık 1000 folikül kalmıştır. Yapılan gözlemler, menapozun yaştan bağımsız olarak, folikül sayısı belli bir seviyenin altına düştüğünde (<1000) gerçekleştiğini göstermektedir. Genetik özelliklere bağlı olarak over dokusunu bozan hastalıklar, overin çıkarılmasına neden olan hastalıklar, konjenital olarak folikül sayısının az olması ya da rezervin hızlıca azalmasına neden olan durumlar da vardır. Erken menapoz ve prematür overyan yetmezliğinin genetik özelliklerinin benzer olduğu ve gerek anne gerekse baba tarafından dominant kalıtımı olduğu bildirilmiştir.

Son 15 yıldır , foliküler büyüklük ve overyan foliküler havuzun kalitesini ölçmeye yönelik çalışmalar artmıştır. Amaç, fekundabilite şansını ve infertil kadının tedaviye cevabını tahmin edebilmek için prognostik faktörleri değerlendirebilmektir. Yapılan çalışmalar, yaş ve overyan rezerv testlerinin, IVF başarısı açısından bağımsız ve önemli indikatörler olduğunu göstermiştir.

Overyan rezerv testi endikasyonları;

- >35 yaş,
- Açıklanamayan infertilite,
- Ailede erken menapoz hikayesi,
- Geçirilmiş overyan cerrahi (overyan kistektomi veya drilling, unilateral ooferektomi, kemoterapi ya da radyasyon),

- Sigara içimi (ivmelenmiş foliküler azalmaya, menstruel düzensizliklere, gamet yada embriyoda mutageneze neden olur- doza bağlı olarak),
- Eksojen gonadotropin stimülasyonuna kötü yanıtı olan hastalar.

Reprodüktif yaşlanmayla birlikte infertilitenin azalması ve yaşlanmanın erken döneminde FSH seviyelerinin yükselmesi, overyan rezervi değerlendirmek açısından FSH'nın iyi bir prognostik indikatör olarak kullanılmasını sağlamıştır. Gerçekten siklusun 3. günü yapılan FSH ölçümü günümüzde en yaygın kullanılan ve kolay uygulanabilen overyan rezerv testidir.

Over rezerv testleri;

- Yaş
- Klinik Semptomlar
- Biyokimyasal parametreler (Bazal FSH, bazal E2, bazal FSH/LH oranı, bazal İnhibin B, AMH)
- Ultrasonografi (transvajinal 2 ve 3-boyutlu) (Antral follikül sayısı, overyan volüm, stromal kan akımı)
- Overyan biyopsi
- Dinamik testler (Klomifen Sitrat Challenge Testi, GnRH Agonist Stimülasyon Testi ve Ekzojen FSH Ovaryan Rezerv Testi)

3. gün FSH değeri ve FSH/LH oranı arttıkça, tepe östradiol seviyesi, toplanılan oosit sayısı, gebelik ve canlı doğum sayısı azalır [27-29].

Erken foliküler faz E2 seviyesi, overyan rezervi değerlendirmede ek bir bilgi sağlar. Üçüncü gün E2 > 80 pg/ml olarak ölçülmesi, fekundabilitenin azaldığını ifade eder. Serum E2 seviyesindeki erken artışlar, folikülün erken gelişimini ve dominant folikülün erken seçimini gösterir. Erken E2 artışı, FSH artışını maskeleyerek aslında düşük olan overyan cevabı yüksek olarak gösterir. Dolayısıyla, E2 ve FSH'nın beraber değerlendirilmesi yalancı negatifliği azaltır. Hem FSH hem E2'nin arttığı durumlarda, overin stimülasyona verdiği cevap çok zayıftır.

Klomifen sitrat testi, overyan rezervi değerlendirmek açısından duyarlı bir testtir. Klomifen sitrat (CC) tedavisinden önce ve sonra, siklusun bazal ve stimule olmuş değerleri ölçülür. Siklusun 3. gün FSH ve E2 değerleri ölçülüp, 5. ve 9. günleri arasında 100 mg/ gün dozunda CC uygulanır. Siklusun 10. günü FSH ve E2 değerleri

tekrar ölçülür. Klomifen uygulamasının ardından, normal cevap olarak, gonadotropin seviyelerinde artış beklenmektedir. Genç fertil kadında (<35 yaş) LH, FSH'tan daha fazla artarken, düşük overyan rezervi olan kadınlarda FSH, LH'tan daha fazla artar. Bu farklılığın mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte yaşlanan kadınlardaki küçük foliküllerin daha az inhibin-B ve östradiol ürettiği ve bu nedenle klomifenin indüklediği hipofizer FSH salınımı üzerine daha az negatif feedback inhibisyonu oluşturduğu düşünülmektedir. Başarılı gebelik oranları 3. ve 10. gün FSH seviyeleri ile ters orantılıdır. Üçüncü gün normal , 10. gün yüksek ise prognoz kötüdür. Sadece 10. gün FSH değerinin prognostik değeri yoktur. Yaştan bağımsız olarak 3. gün FSH seviyesi yüksekliği ve anormal klomifen sitrat testi, IVF başarısı açısından kötü prognostik faktördür (<% 10).

Over rezerv testi kötü sonuçlu olan kadınlarda, hasta genç bile olsa, bu durum prognozun kötü olacağına işaret eder. Ancak normal testi olan kadınlarda sonuçlar yaşla beraber değerlendirilmelidir. Çünkü sonucunun normal olması, yaşa bağlı prognozu kötü olan hastanın sonucunu iyileştirmez.

Yaşlanan kadınlarda bazal FSH seviyelerinde varyasyonlar çoktur, ancak gonadotropin stimülasyonuna cevapta ise varyasyon görülmez. Tedavide optimal siklusu belirlemek için anormal test sonucu olan kadınlarda testleri tekrarlamamanın anlamı yoktur; çünkü anormal test sonucunda prognoz genelde kötüdür. Ancak normal testi olanlarda, testlerin tekrar edilmesi komplike ve pahalı bir tedavinin önüne geçmiş olur.

Over rezervi ölçmeye yönelik diğer yöntemler;

- Overyan volüm ve erken foliküler faz antral folikülün sayısı ölçümü [30,31],
- Bazal ve klomifene veya eksojen FSH stimülasyonuna bağlı inhibin-B seviyesi ölçümü [32,33],
- HMG veya GnRH agonist ile stimülasyonu sonrası FSH, E2, inhibin-B seviyeleri ölçümü [34-36],
- Bazal, GnRH agonist veya gonadotropin ile stimüle edilmiş, antimüllerian hormon seviyesi (AMH ölçümü) [34],



- Tv usg ile saptanan antral folikül sayısı foliküler havuz rezervini gösterir ve yaş ve gonadotropin stimülasyonu ile koreledir. <10 folikül, siklus iptali riskini artırır [37,38],
- Bazal ve stimüle inhibin-B seviyelerinin düşüklüğü, overyan rezervinin de düşük olduğunu gösterir [32,33].

GnRH agonist testi veya ekzojen FSH overyan rezerv testi, CC testinden daha sensitif olmaması nedeniyle daha değerli bilgi sağlamadıkları gibi, ayrıca daha pahalı yöntemlerdir.

Over rezerv testleri prognozu, tedavi protokolunu ve yönetimini etkiler. Ekzojen gonadotropin uyarısına overin cevabını değerlendirilebilmesi nedeniyle, over rezerv testleri IVF başarısı konusunda da yönlendirici olur. CC testi tarama testi olarak kullanıldığında, anormal test prevalansı %10 civarındadır. Bu oran açıklanamayan infertilitesi olanlarda ve yaşla birlikte artar.

Ultrasonografide görülen matür follikül sayısında azalma (ort: 2–5) , artmış bazal FSH değeri (ort 6.5–15 mIU/mL) , hCG öncesi pik östradiol değerinde azalma (300-660pg/mL) kötü cevap parametreleridir.

FSH > 25 IU/mL, E2 > 45 – 80 pg/mL (15), FSH / LH > 3, inhibin B < 45 ng/L değerleri azalmış rezerv göstergeleridir.

### **2.3.1.1 Ovariyan yaşlanma**

Kötü yanıtı hastanın tedavisinde klinikte görülen ana problem, oositlerin hem sayı hem de kalitelerinde görülen azalmadır. Bu durum " ovariyan yaşlanma" nedenidir ve kadının kronolojik yaşına bağlı olabildiği gibi, yaşla hiçbir ilişkisi de olmayabilir.

Stimüle edilmemiş overlerdeki oositlerin mayoz yeteneği yaşla birlikte azalır. Mayotik ve gelişimsel yetenekler, oosit gelişiminin geç aşamasında kazanıldığı için, yasa bağımlı follikülogenezisde azalmanın oosit kalitesindeki bozulmayla sonuçlandığı ve yaşa bağımlı mayotik non-disjunction'daki artışın, oosit gelişimindeki kötü etkilenmenin bir belirtisi olduğu söylenebilir. Bir insan oositindeki mtDNA T414G transversiyon nokta mutasyonunun birikimi, yaş artışı ile birlikte artmaktadır. Bu nokta mutasyonunun potansiyel önemi oositin reproduktif yaşlanmasıyla ilişkili olabilir [39].

### 2.3.2 Uterin Kavite Anormallikleri

İç genital sistemin en sık anomalisi uterus, serviks ve vajinayı oluşturan yapısal çiftlerin füzyon defektleridir. Defektin oluşma derecesi parsiyel ile komplet arası değişir. Eğer füzyonda total bir eksiklik varsa uterus didelfis oluşur. Bu hastalarda iki vajina, iki serviks ve iki uterus bulunur. Müllerian kanalın parsiyel füzyonu sonucu ise uterus bikornis bikollisten uterus bikornis unikollis'e veya arkuat uterusu kadar değişir. Bu füzyon anomalilerinin tümünde iki uterus arasında bir duvar bulunur. Uterus içindeki sagittal septumun inkomplet rezorpsiyonu sonucunda uterin septum oluşur. Septumun boyutuna bağlı olarak komplet veya inkomplet uterin olarak adlandırılır. Üç boyutlu ultrasonografi, HSG, laparoskopi veya MRI konjenital anomalilerin tanısında kullanılabilir. Submüköz fibroidlerin varlığının implantasyona zarar verdiği bilinmektedir. Histeroskopi kadar kesin şekilde bu lezyonların Tv usg ile tanısı konulabilir. Ayrıca salin kontrast sonografi ile bu lezyonların sınırları basit ve etkili olarak gösterilebilir.

Bazı hastalarda IVF/ICSI öncesi hazırlık aşamasında cerrahi işlem gerekebilir. Bunlar,

- Yararlılığı kanıtlanmış işlemler: Hidrosalpenksli hastalarda salpenjektomi veya proksimal tubal ligasyon yapılması, submukoz miyomların çıkarılması.

Endometriyal kavitede yer tutan herhangi bir lezyonun implantasyonu bozduğu bilinmektedir. Submukoz miyomlar gebelik oranlarını ciddi oranda düşürmekte ve abortus oranlarını artırmaktadır [40].

- Yararı tartışmalı olan işlemler: intramural miyomların çıkarılması, stenotik endoservikal kanalın traşlanması, endometriyal poliplerin çıkarılması, uterin subseptusun çıkarılması.

Miyomların IVF ve ET sonuçları üzerine etkisi oldukça tartışmalıdır. Her ne kadar bazı çalışmalarda intramural veya subseröz miyomların düşük IVF gebelik hızlarına yol açtığı rapor edilse de birçok çalışma bunun tersini göstermiştir [41,42]. Anania ve ark.'ı bazı IVF hastalarında immunohistokimyasal yöntemlerle overyan stimülasyona bağlı miyomların büyüdüğünü ve bazı sitokinlerin salınımına neden olduğunu göstermişlerdir [43]. Miyomların sitokinler açısından aktif olması, bazı hastalarda implantasyonu bozabilir. Bu yüzden miyomlu hastalar IVF tedavisi

sırasında yakından takip edilmeli, eğer miyomlar büyüme eğiliminde ve IVF tedavisi başarısız olursa, bu miyomlar bir sonraki IVF öncesinde çıkarılmalıdır.

Zor embriyo transferlerinde gebelik oranları düşmektedir. Embriyo transferi zorluğu endoservikal kanalın stenozu ve dolambaçlı olmasından kaynaklanabilir. Ancak servikal stenozu olan hastalarda ise histeroskopik stenoz açma, genişletme veya kanalı tıraşlama yöntemi ile kanalın genişletilmesi yapılarak transfer zorluğunun önüne geçilebilir [44].

Polipler submukoz miyomlar gibi endometriyal kavitede yer tutar. Polipler bazen implantasyonu engelleyebilir. Histeroskopi artık kolaylıkla uygulanan bir işlem olduğu için bir polip görüldüğünde onu çıkarmak en akılcı yönetim şekli olacaktır. Ancak bazen polipler kontrollü ovaryan hiperstimulasyon sırasında görülmektedir. Bu poliplerin varlığının gebeliği etkileyip etkilemediği şüphelidir. Mastrominas 2 cm altındaki poliplerin IVF başarısını etkilemediğini, Lass ise 2 cm altındaki poliplerin gebelik oranlarını azaltmadığını ancak abortuslarda bir artışa neden olduğunu rapor etmiştir [45,46].

Bikornuslu ve subseptuslu hastalarda sağlıklı kontrol hastalarına göre benzer oranlarda gebelik elde edilebilmektedir [47]. Fakat bazı çalışmalarda ise implantasyon oranları daha düşük bulunmuştur [48]. Bu yüzden özellikle supseptuslu hastalara IVF öncesinde septum rezeksiyonu uygulanması önerilir. Bikornuslu hastalarda ise ancak abortus ve kötü obstetrik öyküsü varlığında metroplasti önerilir.

### **2.3.3 Oosit Faktörü**

Oositin etrafında bulunan kumulus korona hücre kitlesinin genişlemesine ve ışınsal çıkıntılar yapmasına bakılarak oosit matüritesinin değerlendirilmesi yapılabilir [49].

Matür oositler, genişlemiş ve luteinize kumulus matriksi ve ışınsal çıkıntıları olan korona tabakası ile tanınır. Bu morfolojideki oositlerin metafaz II maturasyonunda olduğu kabul edilir.

İntermediate oositler, korona-kumulus kompleksinin daha hafif çıkıntılı olduğu oositlerdir. Bu morfolojideki oositlerin metafaz I maturasyonunda olduğu kabul edilir.

İmmatür oositler, profaz I aşamasındaki oositlerde korona-kumulus kompleksinde herhangi bir genişleme bulgusu yoktur. Oositin etrafında bazen birkaç katlı sıkı bir tabaka halinde foliküller bulunur.

Oositlerin matür, intermediate ve immatür olarak sınıflandırılması, oositin nükleer maturasyonu hakkında genel bir fikir sağlasa da, kesin bir sonuç vermez. Bu nedenle laboratuarda gametler üzerinde yapılacak işlemlerde hatalı davranılmasına yol açabilir.

Oositin nükleer maturitesi ile kumulus kompleksinin hücrel maturitesi arasındaki farklılık nedeniyle, immatür oositler yanlışlıkla erken dönemde insemine edilebilir. Oosit ve spermin suboptimal zamanda bir araya getirilmesinin yaratabileceği sorunlar;

- Fertilizasyon başarısızlığı,
- Uygulanmış olan ovulasyon stimülasyon protokolünün başarısının yanlış değerlendirilmesi,
- Erkek faktörünün yanlış değerlendirilmesi.

Yukarıda bahsedilen sorunları çözümlmek ve oositin mayotik durumunu daha net biçimde ortaya koymak amacıyla oositin etrafındaki korona-kumulus kompleksi enzimler yardımıyla dağıtıldıktan sonra maturasyon skorlaması yapılmaktadır [49].

Metafaz II oosit, matüre, olgunlaşmış veya preovulatar oosit olarak ta isimlendirilmektedir. Germinal vezikül bulunmamakla birlikte, ancak I. polar cisimcik mevcuttur. Oosit toplama işleminden 3–5 saat sonra inseminasyon veya injeksiyon yapılabilir.

Metafaz I oosit, kısmen matüre veya intermediate düzeydeki matüre oosit olarak ta adlandırılır. Germinal vezikül ve I. polar cisimcik yoktur. Follikül aspirasyonu sonrasında kültür ortamına alınan metafaz I oosit, 1 -24 saat içinde I. mayoz bölünme aşamalarını tamamlar. I. polar cisimcik atıldıktan 3–5 saat sonra inseminasyon veya injeksiyon yapılır.

Profaz I oosit, immatür veya olgunlaşmamış oosit olarak ta adlandırılır. Profaz I oosit gonadotropin artışı ve oosit maturasyon inhibe edici faktördeki azalmaya bağlı olarak mature olmaya başlar. Oosit büyüdükçe başlangıçta gözlenen germinal vezikül kaybolmaya başlar ve germinal vezikülün kaybolduğunun gözlenmesi mayozun tekrar başladığının göstergesidir. Profaz I aşamasındaki bir oosit sperm tarafından

penetre edilse bile, mayotik olarak matüre olmayan oosit aktivasyonu başlatamaz ve sperm kromozomları erken aşamada yoğunlaşmaya uğrayarak afonksiyonel hale gelir. Profaz I aşamasındaki immatür oositlerin izole edilip, uygun kültür ortamlarında 24 saat süreyle inkübe edildikleri takdirde, % 80 oranında metafaz I, metafaz II aşamalarını tamamlayabildikleri bildirilmiştir [49]. İn vivo maturasyonun ileri aşamalarında toplanan oositlerin inseminasyon veya injeksiyondan sonra iki pronükleus geliştirme kabiliyetlerinin en fazla olduğu görülmüştür [50]. İnseminasyon veya injeksiyon uygulaması öncesinde 0–20 saat geçmesine rağmen gebelik oluşma potansiyelleri yönünden metafaz I oositler ile metafaz II oositler arasında belirgin bir farklılık saptanamamıştır. Bununla birlikte profaz I oositlerden elde edilen preembriyoların implantasyon ve canlı doğum oranlarının metafaz I oositlerinkine göre belirgin derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Fertilizasyon oranlarındaki azalmanın nedenlerinden biride, oositler matüre oluncaya kadar beklenen süre içinde sperm fonksiyonlarında olumsuz yönde etkilenmenin ortaya çıkması olarak düşünülmektedir.

Ovulasyon stimülasyonu sonucunda oluşan çok sayıda küçük folliküllerin aspire edilmesi halinde, bu folliküllerden elde edilen oositlerin % 20-30'nun mayotik açıdan immatür olacağı bildirilmektedir. Mayoz bölünme aşamalarını tamamlanmadan önce sperm penetrasyonu uygulandığında genellikle ooplazma içinde sperm dekonpensasyonu gerçekleşmemekte, fertilizasyon oranları düşmektedir. Tersine sperm penetrasyonunun geciktirildiği durumlarda ise invitro yaşlanmaya bağlı olarak fertilizasyon oranları azalmaktadır [50].

#### **2.3.4 Ovaryan Stimülasyon Protokolleri**

Normal çiftlerde siklus fekundabilitesi %20-25 oranındadır. İnfertil çiftlerde (açıklanamayan infertilite) ise bu oran daha düşüktür. Tedavi siklus fekundabilitesini arttırmaya yöneliktir.

IVF, eksojen gonadotropinler ile kontrollü overyan hiperstimülasyonu, transvajinal USG altında overlerden oosit toplanması, laboratuvar koşullarında fertilizasyonu, embriyoların transservikal olarak uterusu transferi basamaklarını kapsar. IVF'in prognozu maternal yaş, overyan rezerv ve geçmiş reproduktif performansla direkt ilişkilidir. Endometriozisi olan hastalarda IVF başarısı, tubal faktör infertilitesine

oranla daha kötüdür. Üçüncü gün FSH değeri yüksekliği ve CC testinin anormal olması, yaştan bağımsız olarak IVF prognozunu kötü yönde etkiler.

**Tablo 2:** Ortalama Siklus Fekundabilitesi

Tedavi yok ise	% 1.3-4.1
IUI	% 3.8
Klomifen sitrat kullanımı	% 5.6
Klomifen sitrat kullanımı + IUI	% 8.3
Gonadotropin	% 7.7
Gonadotropin + IUI	% 17.1
IVF	% 20.7

Yüksek cevaplı olgular (High responders); Masif overyan büyüme, çeşitli boyutlarda birçok folikül ve belirgin derecede artmış E2 seviyeleri ( E2 >3000 pg/ml) ile kendisini gösterir.

Tedavisi:

- Siklusu iptal etmek
- Coasting uygulamak. (Agonist tedavisine devam edilse de gonadotropinlere 1-3 gün ara verilir. E2 seviyeleri normale dönünce HCG uygulanır. Coasting ile büyük foliküller büyümeye devam ederken, küçük ve orta boyuttaki foliküllerin gelişimi engellenmiş olur). Coasting uygulanan siklusların sadece %20-30'u iptal edilmektedir, ayrıca OHSS ( ovaryan hiperstimulasyon sendromu) riski de azaltılmış olur.
- Siklusun tamamlanıp oosit toplanması ve fertilizasyon işlemlerinin uygulanması sonrası embriyoların saklanması hem siklustan yararlanılmasını sağlar hem de OHSS riskini azaltır.
- Transferin geciktirilip oosit toplanmasından 5 gün sonraya bırakılması; bu arada OHSS semptomları takip edilir.

Yüksek cevaplı olguların bir sonraki siklusta prognozları genelde iyidir.

Zayıf cevaplı olgular (Poor responders); zayıf cevaplı olguların yönetimi zordur. Bir önceki siklusta <3 oosit elde edilen olgular, <3 adet 16 mmden büyük folikül olması,

tek dominant folikül olması, maksimum serum E2 seviyelerinin < 500 pg /ml olması, hastanın zayıf cevaplı olarak tanımlanmasına neden olur.

Tedavisi:

- Yüksek doz gonadotropin (450 IU/gün - dozun daha da arttırılması etkiyi arttırmaz) uygulanan uzun protokoller [51,52]
- GnRH agonist dozunu düşürmek ya da gonadotropin başlamadan ya da başladıktan kısa bir süre sonra GnRH agonistini kesmek [53,54]
- Standard ya da mikrodoz GnRH agonist flare protokolu uygulaması [55,56]
- Uzun süreli GnRH agonisti yerine GnRH antagonisti kullanmak [57]
- Klomifen sitrat + eksojen gonadotropinin ardışık kullanımı uygulanabilir [57].

IVF tedavisinde uygulanan tedavi protokollere kısaca değinecek olursak:

#### **2.3.4.1 Doğal siklus**

Doğal siklusa bırakılan IVF'lerde siklus iptal oranları yüksektir [58], ayrıca doğal siklularda 1 oosit ve 1 embriyo elde edilir. Doğal sikluslar, ovaryan stimulasiona zayıf cevap veren hastalarda (1-2 folikül ile) ya da stimulasyonu tolere edemeyecek durumdaki hastalarda kullanılır. Tedaviye GnRH antagonistinin eklenmesi, prematür LH yükselmesini önleyerek IVF sonuçlarını iyileştirir.

#### **2.3.4.2 Klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu**

Siklusun 3. günü klomifen sitrat 100 mg/gün dozunda başlanır, 5-8 gün devam edilir. Doğal siklularda oranla siklus iptali oranları daha düşüktür. Toplanan oosit, transfer edilen embriyo ve gebelik oranları daha yüksektir. Prematür LH yükselmesini engellemek için GnRH antagonisti ve eksojen HCG tedaviye eklenebilir [59].

#### **2.3.4.3 Klomifen sitrat + eksojen gonadotropin tedavisi**

Bu tedaviyle multifoliküler gelişim sağlanır. Beş gün 100 mg/gün dozunda klomifen sitrat tedavisine ek olarak, düşük doz eksojen gonadotropin tedavisi başlanır. Transfer ve kriyopreservasyon için long protokole oranla daha az oosit ve embriyo elde edilir, ancak gebelik oranları daha az değildir ve OHSS riski daha düşüktür. Çok

kullanılmamasının nedeni total reproduktif potansiyelinin az olmasıdır. Erken LH yükselmesini engellemek için GnRH antagonisti de tedaviye eklenebilir [60-62].

#### **2.3.4.4 Long protokol (uzun etkili GnRH agonisti ile down regülasyon sonrası eksojen gonadotropin uygulaması)**

Uzun etkili GnRH agonistleri, endojen hipofizer gonadotropin sekresyonunu suprese eder. Bu sayede eksojen gonadotropin stimülasyonu sırasında gelişebilecek prematür LH yükselişi engellenmiş olur. Bu uygulama sayesinde hastanın uyumunu zorlaştıran sık sık LH ölçümüne gerek kalmadığı gibi, siklusların %20'nin iptaline neden olan prematür luteinizasyon da engellenmiş olur [63-64]. GnRH agonist down regülasyonundan sonra siklusların sadece <math><2\%</math>inden azında prematür LH yükselmesi izlendiğinden, foliküller yeterince büyüyene kadar stimülasyon devam edebilir. GnRH agonisti kullanılan çalışmalarda, sadece gonadotropin kullanılanlara oranla oosit ve gebelik oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [65,66]. Long protokolu, ART için uzun yıllar tercih edilen stimülasyon protokolu olmuştur. Tek dezavantajı, uzun süreli agonist tedavisinin, takip eden eksojen gonadotropin tedavisine yanıtı azaltmasıdır. Bu nedendir ki, uygun foliküler gelişimi sağlamak için kullanılan total gonadotropin dozu ve miktarını arttırmak gerekebilir.

Alışlagelmiş olan long protokolünde GnRH agonist tedavisine, endojen gonadotropinlerin en düşük seviyelerde olduğu midluteal fazda yani, ovulasyondan 1 hafta sonra başlanır. GnRH agonist tedavisi (örneğin 1 mg/gün dozunda leuprolid asetat) adet dönemine yada gonadotropin stimülasyonuna kadar uygulanır. Daha sonra HCG uygulama gününe kadar yarı dozda devam edilir. GnRH agonist uygulaması ile depolanmış hipofizer gonadotropinler birden salınır (flare etki). Ancak bu hafif artışın, foliküler gelişimi sağlayabilecek bir etkisi yoktur [67,68].

GnRH agonist tedavisine erken foliküler fazda da başlanabilmekle birlikte down regülasyonu sağlamak için gereken süre uzar ve bu uygulamayla kistik folikül gelişimi daha fazla görülür. Agonist tedavisine luteal fazda başlandığında, gonadotropinlerle daha çok folikül ve oosit elde edilebilmektedir [68,69]. GnRH agonist tedavisine ideal başlama zamanı 28 günlük siklusu olan kadınlarda siklusun 21. günüdür. BBT de artış ya da üriner LH ölçümü ile ovulasyon zamanı tespit edilerek, ovulasyondan sonraki 8. gün de tedaviye başlanabilir.

Standard tedaviye iyi cevap vermeyen hastalarda;



- GnRH agonist dozu yarısından fazla azaltılabilir,
- Gonadotropin uygulamasının 5. günü agonistler kesilebilir,
- Stimulasyona başlandığında agonistler tamamen kesilerek gonadotropin stimulasyonuna cevabın iyileşmesi sağlanır. Gonadotropin stimulasyonuna başlamadan önce serum E2 seviyelerini ve overyan foliküler aktiviteyi değerlendirmek gerekir. E2 < 40 pg/ ml olmalı, bazal tv USG ile > 10-15 mm foliküler kist izlenmemeli.

Bazı araştırmacılar, foliküler kist oluşumunun gonadotropin stimulasyonuna iyi cevap oluşmayacağına bir işareti olduğunu ve düşük sayıdaki oosit ve embriyo sayısı nedeniyle, kötü bir IVF başarı oranı sağlayacağını savunurken, bazı araştırmacılar ise etkisi olmadığını düşünmektedir [70,71]. Kisti olan hastaşarda sonuçlar aynı olsa da siklus iptali ve kullanılan total gonadotropin dozu artar. Ovaryan kisti aspire etmek, stimulasyon cevabını kötü etkilemez hatta aspire edilen overde foliküler cevabı arttırır [72]. Ancak kontralateral over normalse, infeksiyon riski yaratmamak için bu işleme gerek duyulmaz.

Gonadotropinin klasik başlama dozu 225-300 IU/gün'dür. Kullanımda olan ve subkutan uygulanan gonadotropinler üriner FSH, rekombinant FSH, üriner menotropin (hMG)dir. Step-up ya da step-down protokolü kullanılabilir ancak daha çok tercih edileni step-down protokolüdür. LH reseptörlerinin %1 inin bağlanmasını sağlayan LH dozu, foliküler steroidogenez için yeterlidir. Dolayısıyla GnRH agonist tedavisi sonrasında yine de az da olsa salınan LH , folikülogeneze yardım etmeye yeter (uFSH veya rFSH ile stimule edilen). Ancak iyice suprese olmuş sikluslarda, LH konsantrasyonları yeterli olmaz [73]. Sadece FSH ile tedavi edilip bu tedaviye cevap vermeyen hastalarda rFSH + rLH tedavisi denenebilir. Sadece FSH tedavisi ile tedavi edilip LH seviyelerinin iyice azaldığı vakalarda (<1 IU/L), kullanılan total gonadotropin dozu ve süresi artar, E2 seviyesi azalır, oosit ve embriyo sayısı azalır. Bunun dışında fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranları da azalmaktadır.

Stimulasyona cevap, E2 ve tv-usg ile takip edilir. İlk E2 ölçümü gonadotropin uygulamasından 3-5 gün sonra yapılır ve 1-3 gün arayla tekrarlanır. Birçok kadına 7-12 gün stimulasyon gerekir. Amaç, 17-18 mm çapında, en az iki ve 14-16 mm çapında birkaç tane folikül sağlamak ve kohortun büyüklüğüne ve matüritesine uygun E2 seviyelerine ulaşmaktır. Yararı tartışmalı olmakla beraber endometriyal

gelişim de incelenmektedir. HCG uygulama günü endometriyal kalınlık (EL) > 8-9 mm ya da trilaminar görünümdeyse prognozun çok iyi olduğu, EL < 6-7 mm ise ve homojen görünümdeyse prognozun kötü olduğu bildirilmiştir [74,75]. EL çok arttığı (>14 mm) durumlarda da prognozun kötü olduğu bildirilmiştir.

Foliküller uygun durumu ulaştığında, hCG 5000-10000 mIU dozunda uygulanır (Rekombinant formu 250 microgram).

Gonadotropin stimülasyonuna iyi cevap veren hastalarda da midsiklus progesteron seviyeleri artabilir. Bu durum özellikle zayıf yanıt veren olgularda önemlidir. Progesteronun midsiklusta yükselmesi >0.9-1.0 ng /ml'dir.

### **2.3.4.5 GnRH agonist ve eksojen gonadotropinin ardışık uygulanması**

**(kısa=flare protokol)**

Bu protokole leuprolid asetat 1 mg/gün dozunda, siklusun 2-4. günlerinde uygulanır. Daha sonra doz 0.5 mg/gün dozuna düşürülür. Siklusun 3. günü ise 150-450 IU gün dozunda gonadotropin stimülasyonuna başlanır.

**Ultra-kısa protokol:** 3 gün agonist uygulamasıyla flare cevap oluştuktan sonra agonistler kesilir ve sadece gonadotropinlerle tedaviye devam edilir. Dezavantajı, endojen gonadotropin baskılanması için yeterince uzun süre GnRH agonisti kullanılmadığı için prematür LH yükselmesi daha sık gözlenir. Bu protokol nadiren kullanılır, çünkü sonuçlar klasik kısa ve uzun protokole göre daha kötüdür.

**OKS + mikrodoz + GnRH agonist:** 14-21 günlük OKS supresyonunu takiben mikrodoz olarak hazırlanmış leuprolid asetat, siklusun 1. günü, 40 microgr günde 2 kez olacak şekilde başlanır. Siklusun 1.gününden HCG gününe kadar uygulanır.

Leuprolid tedavisinin 3.günü yüksek doz (300-450 IU/ gün) gonadotropin başlanır. Bu tedavi kısa protokole göre daha avantajlıdır. Uygulanan GnRH agonist dozu düşük olduğundan ve OKS ile cevap verebilecek korpus luteum oluşması engellendiğinden serum progesteron ve androjen konsantrasyonlarında artış olmaz.

Serum FSH değerinde artışlar izlenen, zayıf cevaplı olgular için iyi bir protokoldür. Bu protokole siklus iptal oranı azalır, serum pik E2 seviyesi, transfer oranı, klinik ve devam eden gebelik oranları artar. Yedi klinik çalışmayı içeren metaanalizde kısa ve uzun GnRH agonist tedavisinin benzer iptal ve gebelik oranlarının olduğu bildirilmiştir [65].

Flare protokolünde gebelik ve canlı doğum oranları düşük gibi görünse de flare protokolu folliküler cevabı geliştirir ve siklus iptal oranını azaltır. Dezavantajı, menstrasyonun OKS ile kontrol edilemediği hastalarda, hastayı sık sık kontrole çağırma gerekliliğidir. Flare protokolüyle, korpus luteumun geç kurtarılmasına bağlı serum progesteron ve androjen seviyeleri artmaktadır. Bu durum, oosit kalitesi, fertilizasyon ve gebelik üzerine ters etki göstermektedir.

#### **2.3.4.6 Eksojen gonadotropin + antagonist**

GnRH agonistleri, GnRH reseptörlerini down regüle ederek gonadotropinlerin GnRH'a karşı desensitize olmasını sağlar böylece gonadotropin sekresyonu önce stimule sonra inhibe olur. Antagonistler ise GnRH reseptörlerini doza bağlı kompetitif şekilde bloke eder, flare etki yaratmaz ve gonadotropinleri suprese eder [76].

Antagonistlerin agonistlere göre avantajları:

- Tedavi süresi agonistlere oranla daha azdır.
- Kullanılmasındaki amaç LH yükselmesini engellemek olduğundan ve etkisini hemen gösterdiğinden, antagonist tedavisi foliküler gelişimin geç dönemine kadar, yani gonadotropin tedavisinin 5-7 gününden sonrasına kadar ertelenebilir. E2 seviyeleri yükseldikten sonra bile uygulanabilir. Böylece GnRH agonist tedavisi ile gözlenen östrojen eksikliğine bağlı semptomlar görülmez [77].
- Agonistlerin, gonadotropin stimülasyonuna karşı ovaryan cevabı suprese eden etkileri de olmayacağından, kullanılan gonadotropin dozu ve süresi azalır. Dolayısıyla standart uzun protokolden fayda görmeyen zayıf cevaplı olgularda antagonist tedavisi faydalı olabilir.
- Agonistlerin flare etkisi olmayacağından folikül kisti oluşmaz.
- OHSS riski, agonistlerden daha azdır [78,79].

Dezavantajları ise:

- Hasta uyumu gerekmektedir.
- Antagonistler, endojen gonadotropin sekresyonunu agonistlerden daha iyi baskılar. Bu nedenle agonistlerle sağlanan ve folikülogenez için az da olsa gereken LH konsantrasyonları antagonistler ile

sağlanamaz. Serum E2 seviyeleri azalır ya da plato yapar [77,80]. Foliküler büyüme etkilenmemiş olsa bile, düşük doz hMG gerekebilir (75 IU).

- Gebelik oranları GnRH agonistlerinin kullanıldığı uzun protokollere oranla biraz daha düşüktür. Çünkü GnRH antagonistleri folikülogenezde rol oynayan hücrelerin mitotik programlanmasına, blastomer oluşumuna ve endometrial gelişim üzerine etkilidir.

Klinik kullanımda olan GnRH antagonistleri Ganirelix ve Cetrorelix'tir. Prematür LH yükselmesini önleyen minimum doz 0.25mg/gün'dür. Subkutan olarak uygulanır [81,82].

Gonadotropin stimülasyonunun 5-6. gününden sonra (sabit protokol) tedavi başlanmakla birlikte hastanın cevabına göre (esnek protokol) de düzenlenir. Sabit protokolle agonistler kadar kuvvetli şekilde LH yükselmesi önlenemez. Esnek protokolle önde giden folikül 13-14 mm olduğunda tedaviye başlanır ve bu protokol overyan stimülasyonu kolaylaştırır [83,84]. Tedavi kişiselleştirildiğinde, kullanılan total gonadotropin dozu daha az olup, sonuçlar daha başarılı olmaktadır. Esnek protokolun uygulandığı bir çalışmada elde edilen oosit sayısının ve klinik başarımın arttığı bildirilmiştir, ancak çalışmanın gücü kesin sonuçları ortaya koymak açısından yeterli bulunmamıştır [83].

### **2.3.5 Luteal Faz Desteği**

Luteal faz desteği stimülasyon siklusunun ikinci fazında hormon uygulanması durumunu ifade etmektedir. İn vitro fertilizasyon sikluslarında rutin olarak uygulanmaktadır. Desteğin amacı korpus luteumun yetersiz fonksiyonuna karşı profilaksidir. Luteal faz, embriyo transfer gününden human koriyonik gonadotropinin ölçümüne kadar geçen 2 haftalık periodu tanımlamaktadır.

İmplantasyon, uterusun hazırlanması, gebelik ve endometriumun stabilizasyonu için normal luteal fonksiyon temel unsurdur. Normal luteal faz, korpus luteumdan yeterli seviyede progesteron salınımı ve endometriumun sekretuar değişimi ile karakterizedir. Korpus luteum fonksiyonelliği, normoovulator siklusta pituitar gonadotropinlerin desteğine bağlıdır. Luteinize hormon sinyali olmadan korpus luteum disfonksiyone olarak, progesteron veya östrojen sekresyonu anormal şekilde oluşacaktır. İmplantasyon penceresi uterusun reseptif olduğu, ovulasyondan sonraki

8–10 günlük periodu tanımlamaktadır. Uygun progesteron veya östrojen stimülasyonu olmadan endometrial reseptivite bozulacaktır. Progesteronun primer etkisi stroma üzerine olmaktadır. Bu hormonal etki ile endometrium implantasyon zamanında, glandlarda maksimum sekretuar aktivite, perivasküler stromal hücrelerde genişleme ve embriyo tutulmasını kolaylaştıran fibronektin, laminin ve tip-4 kollojen içeren ekstrasellüler matriks sekresyonu oluşmaktadır. Fertilizasyon ve implantasyonu takiben gelişen blastokistin salgıladığı hCG, korpus luteumun devamını sağlamaktadır. Steroid üretiminin overden plasentaya geçişi haftalar almakta, plasental progesteron tespiti gestasyonun 50. gününde olmaktadır. Gonadotropin-releasing hormon agonistler ile yapılan uzun ovaryan stimülasyon protokolleri ve down regülasyon, luteal fonksiyonları etkilemektedir. Uzun protokol, luteal fazda progesteron seviyelerinin azalması ile sonuçlanmaktadır. GnRH-a kullanımı luteinizan hormon salınımının azalmasına ve dolayısı ile korpus luteumun fonksiyonlarının devamını sağlamada eksikliğe yol açmaktadır. Luteal faz desteği, eksojen hCG nin kaybolduğu ve erken implantasyonda endojen hCG'nin yükselmesi arasında oluşan boşluğu doldurmada faydalıdır [85].

Luteal faz desteği için kullanılan ilaçlar progesteronlar, östrojenler ve hCG'dir. Progesteron ve östrojen uygulanımı etkili hormon desteğidir, hCG ise bu hormonların korpus luteumda stimülasyonu için kullanılmaktadır.

### **2.3.6 Doğru Spermin Seçilmesi, Sperm Matüritesi ve DNA Fragmentasyonu**

Vücudun en büyük hücresi olan oosit, rekombinant bir özelliğe sahiptir. Gerek kendisindeki, gerekse spermdeki DNA fragmentasyonlarını belirli bir orana kadar onarma yeteneğine sahiptir.

Lyon hipotezine (Lyon Fenomeni -Mary Frances Lyon) göre, genetik olarak aktif dişi hücrelerinde iki adet X kromozomundan sadece bir tanesi aktiftir. X kromozomu inaktivasyonu, embriyonik gelişimin geç evrelerinde gerçekleşir. Fertilizasyon ve erken partenogenezde seks kromozomlarının aktif rolleri yoktur. Bu görevi, 3. otozomal kromozom üzerinde ki gen grubu replikaları (homolog) üstlenmiştir.

İlk 3 gün embriyolarında seks kromozomları henüz devreye girmemiştir, seks kromozomlarının iyi veya kötü kaliteli olmalarından embriyolar etkilenmezler. Bu nedenle, in vitro fertilizasyonda üçüncü gün embriyoları incelendiğinde, bunların günümüzde kullandığımız embriyo derecelendirilme kriterleriyle "iyi kalite"

embriyolar olduğunu görebiliriz. Transfer edilen embriyoların siblinglerini, 5. güne kadar kültüre ederek blastokiste kadar gidiş olup olmadığını izleme imkanı bulduğumuzda, bir kısım olgularda > % 30 blastokiste gitme oranı olduğunu veya bunun altında kaldığını görmekteyiz. Seks kromozomları üçüncü gün sonrasında devreye gireceğinden, blastokiste gidiş oranı, doğrudan seks kromozomlarının kalitesi ve DNA bütünlüğü ile ilgilidir.

Blastokiste ulaşma oranının > % 30 olduğu olgularda, hastanın gebelik elde edilebileceği hakkında iyi bir prediksyon yapılabilir. Blastokiste gitme oranının < % 30 olduğu olgularda, üçüncü günde transfer edilen embriyoların kalitesi ne olursa olsun, gebelik oranının düşük kalacağı predikte edilebilir.

Fertilizasyon kalitesi ve blastokiste gitme oranını belirleyen en önemli faktörlerden birisi sperm DNA integritesidir. Sperm DNA integritesinin tam veya tama yakın olmadığı durumlarda, fertilizasyon gerçekleşecek, hatta üçüncü gün embriyo gelişimine kadar ışık mikroskopunda algılanabilecek bir sorun izlenmeyecek, ancak daha sonra bu embriyoların üçüncü gün sonrasında arrest olduğu, blastokiste gitme oranlarının düşük olduğu ve gebelik oranlarının düşük kaldığı görülecektir. Bu nedenle ki DNA fragmentasyon indeksi çok iyi değerlendirilmelidir.

Sperm DNA fragmentasyon indeksi % 30'a kadar olan fertilizasyonlarda, oositin rekombinant fabrika özellikleri, sperm DNA fragmentasyonlarını kompanse edecektir. Ancak, sperm DNA fragmentasyonu > % 30 olan olgularda, her ne kadar ilk üç günlük embriyo gelişimi olumsuz etkilenmese de, daha sonra bunu sağlıklı blastokiste gidiş ve gebelik oranları takip etmeyecektir. Bu konuda Evenson ve ark. ile Bungum ve ark.'nın yayınladığı metaanaliz çalışmalarda birbiriyle uyumlu bulguların elde edilmiş olup bu çalışmalardan çıkan sonuçlar [86,87]:

DFI < %30 DNA fragmentasyonu olan olgularda,

- 7.3 kat daha fazla naturel konsepsiyon ve IUI başarısı
- IUI + IVF uygulanması halinde 3 kat başarı artışı
- Yanlızca IVF uygulanması halinde 2.2 kat başarı artışı
- IVF + ICSI uygulanması halinde 1.7 kat başarı artışı söz konusudur.

### **2.3.7 Azalmış Endometriyal Reseptivite**

Yardımcı üreme teknikleri, nedeni ne olursa olsun infertilite olgularında etkin bir tedavi seçeneğidir. Başarısız olunan olguların çoğunda etken faktör, embriyo transferi yapılmasına rağmen implantasyon için hazır bir endometrium ve sağlıklı bir blastokistin olmamasıdır. Ancak, bugünkü bilgilerimizle, implantasyon müdahale edilemeyen tek aşamadır. Desiduaya adezyon ve trofoblastik invazyon için hem maternal hem de embriyonik faktörlerin gerekliliği açıktır.

Endometrial reseptiviteyi saptayabilmek için farklı yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Elektron mikroskopuyla endometrial ultra morfolojik yapılar incelenebilmektedir. Bu yöntemle endometrial reseptiviteyi gösteren pinopodlar ve nükleer kanallar gösterilebilir. Blastokistin endometriumda sadece pinopod bulunan alanlara implante olduğu ve pinopodların implantasyon pencere döneminde ortaya çıkması ve sonra kaybolması nedeniyle endometrial reseptivitenin belirteçi olabileceği bildirilmiştir [88]. Ancak klinik olarak uygulanabilir bir yöntem değildir.

#### **2.3.7.1 İmplantasyon**

Blastokist uterin endometrium kıvrımlarından birine yerleşip zona pellusidadan tamamen çıkınca implantasyon başlar. İmplantasyon aşamaları olan karşı karşıya gelme (apposition), yapışma (attachment) ve invazyondan yukarıda bahsedilmiştir.

#### **2.3.7.2 Desiduanın immunolojik ve hematolojik özellikleri**

Seruloplazmin, a-1 antitripsin, sekretuar komponent, T-parçası, kompleman 3 ve 4, leukemia inhibitör faktör (LIF), granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), interlökin 6 (IL-6) endometrial glandlarda saptanmıştır [89].

Desidua bazalis ve parietalis'in %40'ını oluşturan makrofajlar immunosupresif, fagositik, antiinflamatuvar özelliklerle implantasyonda önemli rol oynarlar, sitokinler, peptidler ve interlökinlerin sentez ve regülasyonunda etkilidirler. Monositler, T lenfositler de stroma ve glandlarda yerleşmişlerdir. B lenfositler, plazma hücreleri, PMN lökositler ve 'natural killer' hücreler erken desiduada nadir görülürler. Endometrial granüle lenfositler birinci trimester sonunda en yüksek sayıya ulaşırlar ve diğer fonksiyonlarının yanında relaksin salgırlar.

Endometriumdaki lökosit sub-populasyonlarının oranı implantasyonun başarısını etkileyebilir. Trofoblastlar da klasik HLA (insan lökosit antijeni) antijenleri değil

HLA-G antijenleri salgılayarak lizisten kaçabilir. Kofaktör proteinler sitotrofoblast ve dev hücrelerde yüksek oranda bulunur ve lizisten korunmak için yardım eder.

### **2.3.7.3 İmplantasyon penceresi:**

Uterin reseptivite implantasyona uygun uterusu tanımlar ve bu dönem implantasyon penceresi denen kısa aralığa sınırlıdır; embriyolar uterusu bu dönemin dışında ulaşırlarsa gebelik oluşmayacaktır. İmplantasyon penceresinin tam olarak hangi zaman aralığını gösterdiğinin bilinmemesi ART sikluslarında majör sınırlayıcı faktörlerden biridir [89]. İmplantasyon penceresinin hücresel ve moleküler özellikleri vardır. Hücresel düzeyde, fibroblastik stromal hücrelerin glikojen ve lipid içeren büyük poligonal hücrelere transformasyonu ile karakterizedir. Desidual reaksiyon denen bu değişiklikler önce stromal kan damarlarının çevresinde başlar, daha sonra giderek endometriyumda yayılır ve desidua oluşur.

Postovulatuvar dördüncü günde endometriyal hücrelerde subnükleer vakuoller hücrelerin apikaline doğru kayarken nükleus bazale kayar. Postovulatuvar beşinci-altıncı günlerde, yani periimplantasyon döneminde, luminal uterin epitelin apikal yüzeyinde pinopodlar belirir. Postovulatuvar sekizinci günde pinopodlar geriler ve bunların yerini mikrovilluslar alır. Nikas ve ark.ları eksojen hormon olarak adet gören kadınlarda yaptıkları çalışmada, pinopodların sadece bir gün izlendiğini ve ömürlerinin 48 saati geçmediğini gösterdiler [90]. Bu bulgular implantasyon penceresinin ne kadar dar bir zaman aralığını sahip olduğunu kanıtladı. Aynı tedavi rejimindeki değişik kadınların implantasyon pencereleri de değişik zamanlarda izlenmiştir. Diğer bir önemli bulgu da, serum hormon değerleri ile pinopodlar arasında bir korelasyon olmamasıdır. Bu durumda, ART sikluslarında transfer penceresi hem embriyonun gelişimine hem de kadının maruz kaldığı hormonal uyarılarla pinopod gelişimine bağlıdır.

### **2.3.7.4 Uterin reseptivitenin belirteçleri**

Endometriyal hücre yüzeyinde bulunan Muc-1 glikoproteininin miktarı implantasyon fazında maksimuma çıkar. Bu madde, adeziviteyi artırır. Fare çalışmalarında, endometriyumda heparin sülfat proteoglikan, laminin ve tenasinin uterin reseptivite ile ilişkili olduğu saptanmıştır [90].



Reseptif fazda apikal plazma membranında önceleri sadece yanlara daha sonra bazal membrana ulasan 'gap junctions' ve bol desmoplakin I ve II içeren 'hemidesmosome like junctions' görülür [90].

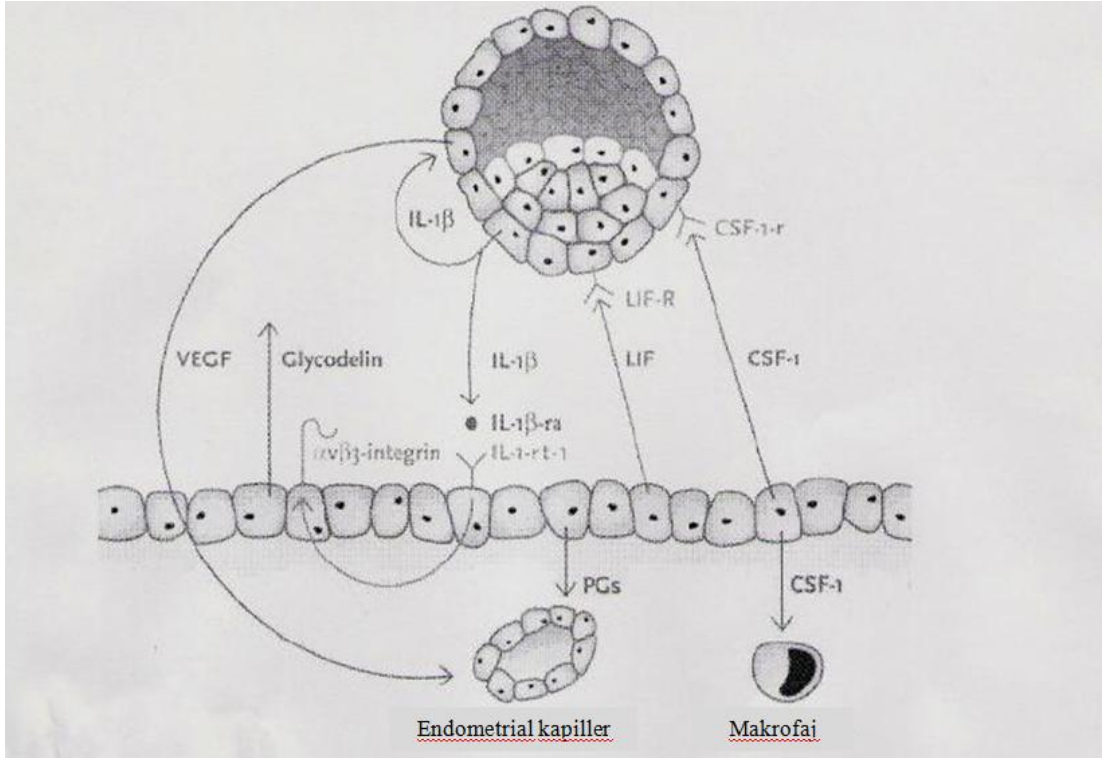
Cadherin denen başka bir molekülün endometrium ve blastokistte bol miktarda bulunduğu saptanmıştır. Bu molekül endometrial epitelyum trofektoderm aralığında da bulunur. E-cadherin embriyo kompaktlaşmasında gereklidir. Blastokist aşamasında E-cadherin bulunmayan embriyolarda trofektoderm epitelinin oluşmadığı ve blastokist kavitesinin görülmediği gösterilmiştir [90].

Fibronektin, laminin, entaktin, kollajen tip 4, hyaluronik asit gibi birçok ekstrasellüler matriks komponentleri in vitro olarak blastokist gelişimini destekler. Bu adezyon moleküllerinde ortak yapının tripeptid arginin-gilisin aspartik asit dizisi olduğu gösterilmiştir. Bu dizi integrin denen reseptörlerce tanınır ve bağlanır [90]. İmplantasyonda etkin olan steroidler sistemik etkiler yaparken, sitokinler otokrin, parakrin etkilerle rol oynarlar. Sitokinlerin etkileri hayvan deneylerinde gen hedefleme yöntemiyle oluşturulan gen delesyonları ile incelenmiştir.

Ovulasyondan 7–10 gün sonra her siklusta embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlamak amacıyla implantasyon penceresi döneminde birçok molekülün ekspresyonu meydana gelir. Embriyonun endometriuma implantasyonunda integrin molekülleri, L-selectin ligandları, mucin-1, HB-EGF (heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü) ve pinopodlar görev alır. Endometriumdan salgılanan sinyallere (leukemia inhibitör faktör reseptörü, colony stimulating faktör reseptörü, insulin-benzeri büyüme faktörü ve HB-EGF reseptörü) karşılık embriyodan sitokin ve büyüme faktörleri salgılanır. Glycodelin, inhibin ve interlökinler gibi immunmodülatör faktörler implantasyonda embriyonun maternal reddine engel olurlar. VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ve prostoglandinler implantasyonda angiogenezisde rol alırlar [6] (Şekil 2).

***Pinopodlar:*** Kabarcık şeklinde endometrium epitelinin apeksinde bulunan çıkıntılardır. Elektron mikroskop yöntemi pinopodları tespit etmek için en yararlı yöntemdir. Luteal fazın ortasında fertilitesi ispatlanmış 68 kadından endometrial biyopsi örnekleme ve kan örnekleme yapılmış. Progesteron seviyelerinde yükselmeye beraber pinopodların ortaya çıkışı elektron mikroskopuyla gözlenmiştir [88].

Blastokist implantasyonu için endometrial reseptivitenin düzenlenmesinde HOXA-10 geni rol alır. Farelerde yapılan çalışmada HOXA-10 geninin bloke edilmesi endometrial histolojiyi etkilemediği, pinopod sayılarında azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir [91]. Fertilitesi ispat edilen 5 kadından endometrial biyopsi örnekleme LH pikinden beş gün sonra alınmış ve endometrium örneklerinde implantasyon için blastokistin pinopod bulunan bölgeleri tercih ettiği gösterilmiştir [92]. Diğer taraftan luteal fazdan 11. gebelik haftasına kadar endometriumda pinopod oluşumunu gösteren çalışmada; pinopodların implantasyon penceresi dönemine özgü olmadıkları, belli bir süre progesteron etkisinde kalan endometriumda pinopod oluşumunun görüleceği bildirilmiştir [93]. Endometrial reseptiviteyi göstermede pinopodların tespit edilmesi implantasyon oranlarını arttırmak için etkin bir yöntem değildir.



**Şekil 2:** Embriyo ile endometrium arasındaki ilişkiyi sağlayan faktörler [6].

**Leukemia inhibitör faktör (LIF):** IL-6 (interlökin-6), IL-11 (interlökin-11), CT-1 (cardiotropin), OSM (oncostatin-M), CNTF (silier nörotrofik faktör), CLC (cardiotropin-like cytokine), NP (neuropoietin) gibi sitokin grubuna ait, dört alfa-heliks yapısında bir sitokindir [91]. Bu moleküller sinyal iletimini gp130 proteini yoluyla yaparlar. Farelerle yapılan bir çalışmada endometrium epitelinden, blastokist

implantasyonundan önce LIF mRNA ekspresyonunun artan seviyelerde gösterilmesi ve LIF geni olmayan farelerde implantasyon başarısızlığı olması, LIF'in implantasyonda önemli görevi olduğunu gösterilmiştir [94]. Endometrial kavite yıkama sıvılarında LIF düzeyine LH pikinden 10 gün sonra bakılan bir çalışmada, açıklanamayan infertilite tanısı olan hastalarda LIF düzeyi normal fertil gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur [95]. LIF'in implantasyondaki görevini araştıran çalışmalar devam etmektedir.

***İnterleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor (TNF), Transforming Growth Factor-J5 (TGF-J5) ve diğerleri:*** Bu sitokinler IVF sırasında embriyo kültür sıvılarında bulunmuştur. IL-6 yapısal olarak LIF'e benzer ancak IL-6 eksikliği olan fareler fertildir. IL-1 hem fare endometriumu hem de embriyosunda bulunur. TNF- $\alpha$  preimplantasyon embriyoların kültür ortamlarından izole edilebilir. Preimplantasyon döneminde TNF- $\alpha$  günlük enjeksiyonu ile uygunsuz çiftleşmeden kaynaklanan fetal anomaliler ve fetal kayıplar düzeltilebilmiştir. TGF-J5 in vitro olarak trofoblastlardan salgılanan onkofetal fibronektinin üretimini modüle eder.

***İntegrinler:*** İntegrinler, 18 alfa ve 8 beta zincire sahip glikoprotein yapıda hücre adezyon molekülleridir [96]. İntegrin subüniteleri; ekstraselüler, intraselüler ve transmembranöz alanlar içerir. Embriyolojik gelişme, hemostaz, tromboz, yara iyileşmesi, immun ve nonimmun savunma mekanizmaları ve onkojenik transformasyon gibi birçok fizyolojik olayda hücreler arası adezyonu sağlayarak görev alırlar [97]. Düzenli adet gören, endometrial patolojisi olmayan 45 kadında menstrual siklus boyunca osteopontin ve onun reseptörü olan beta-3 integrin düzeyine immunohistokimyasal yöntemlerle bakmışlar ve geç sekretuar fazda salınımlarının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [98]. Progesteron indirekt ve direkt yollarla endometrium epitelinden beta-3 integrin ve osteopontin ekspresyonunu artırır. İndirekt olarak stromal hücrelerde büyüme faktörlerinin düzeyini artırır ve büyüme faktörleri de parakrin yolla beta-3 integrin ekspresyonunu sağlar. Diğer taraftan progesteron direkt olarak da endometrium epitelinden beta-3 integrin ve osteopontin ekspresyonunu sağlayabilir [99].

***Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü:*** Altıncı kromozom üzerine yerleşmiş, insan vücudunun değişik bölgelerinde angiogenezisde görev alan bir büyüme faktörüdür [100]. Embriyonun implantasyonu ve plasantasyonu için angiogenezis gereklidir. VEGF, angiogeneziste önemli bir faktör olarak, embriyonun implantasyonunda

görev alması muhtemeldir [101]. Bir çalışmada, VEGF düzeyinin kan örneklerinde gonadotropin uygulamasıyla düştüğü ve embriyo transfer zamanı serum VEGF düzeyi yüksek olan IVF hastalarında gebelik oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir [102]. VEGF ölçümlerinin implantasyonda belirteç olarak diagnostik değerinin olabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Granülosit Koloni Stimulan Faktör (G-CSF):** Sitokinlerin ovaryan fonksiyon için önemli lokal faktörler olduğu görülmektedir. G-CSF hemotopoetik büyüme faktörleri ailesine aittir [103]. Primer olarak hemotopoetik hücrelerden üretilmesine rağmen osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel, epitel, insan over ve endometriumu tarafından da üretilir [104]. Overyan stimülasyon uygulanan sıklularda beyaz küre hücrelerinin arttığı, sonuç olarak da G-CSF düzeyinin kanda siklus boyunca yükseldiği gösterilmiştir [105]. Bazı araştırmacılar da G-CSF düzeyinin ovulatuvar fazda en fazla arttığını, bu yüzden G-CSF'nin ovulasyonda önemli role sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir [106]. Bir başka çalışmada servikovajinal sıvıda ve periferik kanda implantasyon belirteci olabilmesi için sitokinler çalışılmış, M-CSF (makrofaj-koloni stimulan faktör) ve EGF (epidermal büyüme faktörü) en yararlı biyokimyasal belirteçler olarak bulunmuştur [107]. EGF, zona pellusidadan 'hatching' ve trofoblastların büyümesini artırır.

### **2.3.8 Embriyo Transfer Tekniği**

ART sikluslarında gebeliğe ulaşmadaki en son basamak embriyo transferidir. İlk IVF bebeğinin doğumundan beri embriyo transferi (ET) tekniklerinde çok büyük değişiklikler olmamıştır. Transfer sırasında uterusun pozisyonu, tenakulum ile portionun tutulması, kateterde kan/mukus olması gibi parametreler bu konuda değişik görüşler olduğunu ortaya koymuştur. ET günü, transfer edilen embriyo sayısı ve grade'leri gebelik oranları üzerine etkili olabilmektedir [108].

Transferin zorluğu veya kolaylığı çoğu vakada oldukça subjektif bir yargı olmakla beraber transfer kateterinin endoservikal kanaldan zor geçtiği, kateterin ucunda kan bulunan veya transfer sonrasında hastanın kramp hissettiği transferler zor transfer olarak tanımlanmaktadır. Kolay transferler ve zor transferlerin sonuçlarını karşılaştıran bir meta analizde gebelik oranlarının zor transferlerde yaklaşık %30 azaldığı bildirilmiştir [109].

Embriyo transferinin etkileri konusunda yapılan bir başka çalışmada da ultrasonografi eşliğinde transfer yapmanın implantasyon oranlarını anlamlı derecede etkilediği gözlenmiştir [110]. Buna karşın transferi yaptıktan sonra kateterin hemen geriye çekilmesi veya 30 sn bekleddikten sonra çekilmesi arasında gebelik oranları açısından fark bulunamamıştır [111].

### **2.3.8.1 Blastokist transferi**

Selektif klivaj evresi embriyo transferleri ile bildirilen en yüksek implantasyon oranları blastokist transferleri ile bildirilenlerden düşüktür [112,113]. Ancak blastokist transferleri ile klivaj evresi embriyo transferinin değerlendirildiği bir Cochrane metaanalizinde rutin olarak blastokist transferi uygulamasının faydası gösterilebilmiş değildir [114]. Mükerrer klivaj evresi embriyo transferi sikluslarında gebelik elde edemeyen kadınlarda blastokist transferinin daha iyi sonuç verdiğini gösteren sadece bir prospektif randomize çalışma vardır [115]. Daha önceden 2-3 siklus klivaj evresi embriyo transferi ile gebelik elde edilemeyen 54 kadın 2-3. gün transferi ile 5. gün transferi arasında randomize edilmiştir. Blastokist transferi ile implantasyon oranı anlamlı olarak daha yüksek bildirilmiştir (%21.2 -%6). Randomize olmayan başka bir çalışmada mükerrer başarısız sikluslardan sonraki siklusta 3. gün transferi yapılan 22 kadın ile 5. gün transferi yapılan 15 kadını karşılaştırmış ve 5. günde transfer edilen embriyo sayısının anlamlı olarak daha az olmasına rağmen implantasyon oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmiştir [116]. En az üç siklus klivaj evresi embriyo transferiyle gebe kalamayan hastalarda blastokist transferiyle daha yüksek oranda gebelik elde edildiğini bildiren bir çalışma da yayınlanmıştır [117]. Ancak bu çalışma retrospektif olup, az sayıda klivaj evresi embriyosu olan hastalarda da in vitro kültür süresi uzatılarak blastokist transferi denenip denenmediği belirtilmemektedir. Bu nedenle blastokist transferi yapılan hastaların daha çok oosit ve klivaj evresi embriyosu olan zaten daha iyi prognozlu bir hasta grubundan oluşup oluşmadığı belirli değildir.

İyi kalitede embriyo transferlerine rağmen gebe kalamayan hastalarda blastokist transferi, embriyo gelişiminin daha uzun bir periyotta gözlenerek implantasyon potansiyeli daha yüksek embriyoların seçimine olanak sağlayabilir. Ancak transferin gerçekleşmeme olasılığı 3. gün transferlerine göre daha yüksek olabilmektedir.

### **2.3.8.2 İnterval transfer**

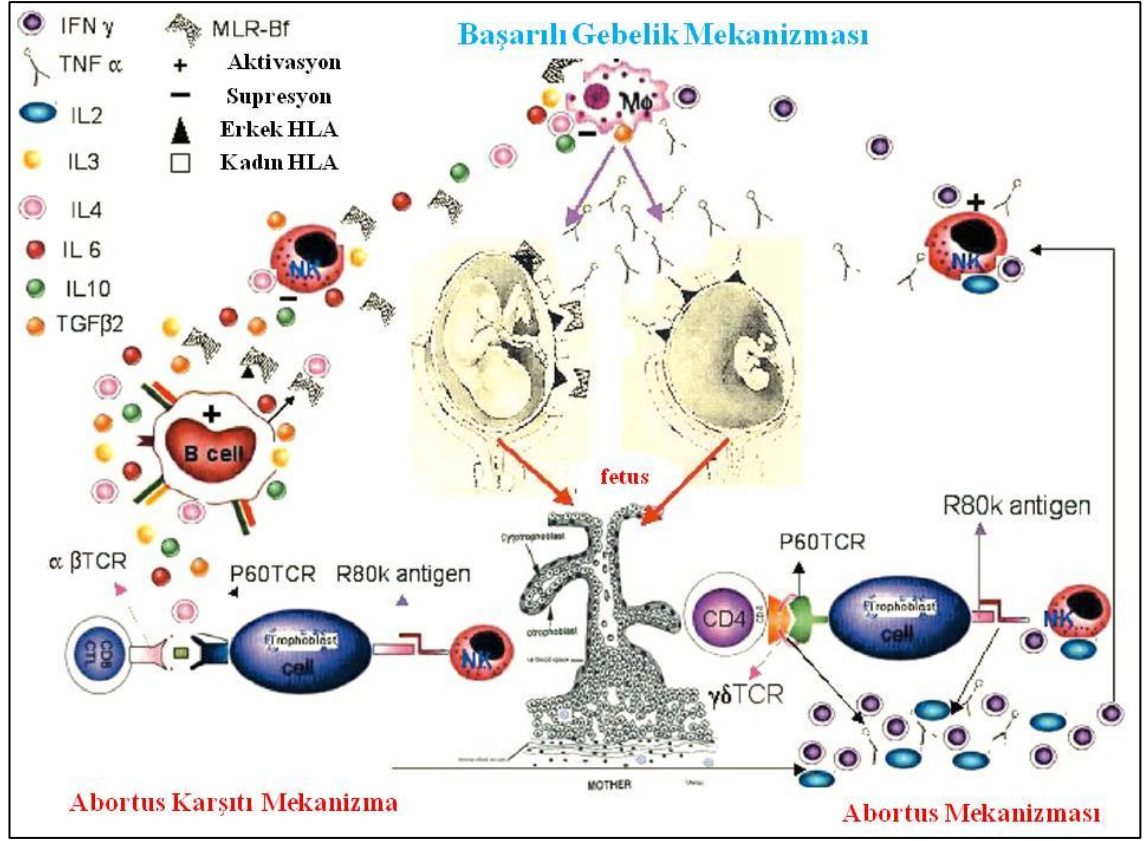
Klivaj evresi ve blastokist embriyoların ardışık olarak transferi, transfer iptali olasılığını azaltabilir [118]. İkinci veya üçüncü günde transfer edilecek embriyoların endometriyumla etkileşerek implantasyon için daha uygun bir ortamın oluşmasını sağlayarak daha sonra transfer edilecek olan embriyoların implantasyon olasılığını arttıracığı düşünülmüştür. İyi kalite embriyo transferlerine rağmen gebe kalamayan kadınlarda interval transferin sonuçlarının incelendiği retrospektif bir çalışmada 2. ve 4. gün transferleriyle %38, 2. ve 5. gün transferleriyle %60 gebelik bildirilmiştir [119]. Böyle bir stratejinin önerilebilmesi için tekrarlayan başarısızlıklarda etkinliğinin prospektif randomize çalışmalarda değerlendirilmesi gereklidir.

### **2.3.9 İmmunolojik faktörler**

Tekrarlayan IVF başarısızlığı olgularında periferik lenfositlerde T helper (Th) 1 ve 2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [120]. Normal gebelikte Th2 konsantrasyonu Th1 konsantrasyonundan yüksek olmaktadır. Tekrarlayan abortus ve tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları vakalarında Th1/Th2 oranının fertil kontrollerden yüksek olduğu bildirilmiştir [121]. Bazı çalışmalarda periferik natural killer (NK) hücrelerin arttığı bulunmuş olmakla beraber bu bulgu tam olarak doğrulanabilmiş değildir [122].

### **2.4 Gebelik ve İmmunité**

Gebelikte anneye ve fetusa ait immun sistemin yeterli ve doğru çalışması fetusun yaşamını devam ettirebilmesi için çok önemlidir. İlk başlarda fetus, izole durumda steril bir çevrede gelişir ve fetus için immun sistem çok gerekli değildir. Ancak gebeliğin ilerleyen dönemlerinde anneye ait immun sistemdeki değişikliklerle birlikte fetusun immun sisteminin de farklılaşması, gebeliğin sağlıklı gelişimi için gereklidir (Şekil 3) [123].



**Şekil 3:** Gebelikte Abortus ve Abortus Karşıtı İmmünolojik Mekanizma [123].

Gebelik sürecinde maternal immün cevap çeşitli faktörlerin etkisiyle baskılanmaktadır. Bu baskılanma hem hücresel hem de humoral immün sistemde gözlenmektedir. Gebe bayanlarda timusun dramatik olarak değişime uğradığı, timus korteksinin büzüşüp, medullanın büyüdüğü bilinmektedir.  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  kortikal timositler kaybolur (Eksojen glukokortikoidlerin yüksek düzeylerinin  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  hücrelerde apoptozu indükledikleri gösterilmiştir). Gebeliğin sonunda, timus ağırlığı ve timosit sayısı belirgin biçimde azalır. Timustaki bu gerilemenin çeşitli hormonlar kontrolünde olduğu, laktasyon durunca timusun hızla normale döndüğü görülmüştür. Bu değişimlerin paternal ya da fetal antijenlere karşı potansiyel reaktif klonların delesyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [124]. Timustaki bu değişime rağmen gebelikte periferik kanda maternal T hücre, T hücre alt grup sayısı ve B hücre sayısının değişmediği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Buna karşın T hücre fonksiyonunda azalma görülebilmektedir. Th1 ve Th2 sitokin dengesi incelendiğinde ise Th1 sitokin profilinin gebelik süresince baskılandığı ve dengenin Th2 yönüne kaydığı görülür. IL-2 oluşturan Th1 sitokin profili gebelik süresince

baskılanır ve profil Th2 yönüne kayar. Th1 cevabı fetus için zararlı olabilir. Çünkü fetal allograftın rejeksiyonunu provoke eder. Hamile bayanlarda Th1/Th2 sitokin oranı belirgin biçimde düşüktür ve bu oran, doğumdan sonra da bir süre devam eder [125]. Th1/Th2 sitokin oranında Th2 sitokinlerinin baskınlığı özellikle fetoplental çevrede belirgindir. Desidual Th1 hücrelerinin azalması, Fas-FasL aracılığı ile oluşan apoptoz ile ilişkilendirilmiştir [126]. Fetoplental ünitenden alınan süpernatantlarda, artmış IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-3 düzeyleri saptanır. IFN- $\gamma$  ekspresyonu geçici olarak baskılanmıştır. Gebelikte nötrofil aktivitesi de belirgin olarak azalmış bulunur. Th2 dominansına uygun olarak maternal immun cevap hücrel immuniteden uzaklaşır ve antikor yapımına doğru kayar. Gebe farede immunglobulin izotipi, kompleman fikse eden, fetal alloantijenlere reaktif olan IgG2a (insanda IgG1) izotipinden IgG1 (insanda IgG4) izotipine yönelir. Gebelik süresince RA geçici remisyona girer. Buna karşılık aşırı otoantikor yapımı ile ilişkili olduğu bilinen SLE alevlenmeler gösterebilir [126].

Gebelerde maternofetal karşılıklı yüzeylerde Th2 sitokin yapımının artmış bulunması, fetal yaşam bakımından önemlidir ve muhtemelen, immunolojik toleransı korumaya yönelik bir durumu ifade eder. NK aktivitesi gebede azalmıştır. Farelerde, IFN- $\gamma$  ile NK aktivitesinin indüklenmesi fetal rezorpsiyona yol açar. Uteroplental TNF- $\alpha$  yapımı gebelik süresince artsa bile, sitokin, sinsisyotrofoblastlar tarafından sentezlenen solubl TNF- $\alpha$  reseptörleri ile nötralize edilir. Gebelerde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin azaldığı, supresör CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin arttığı ve B hücre immunitesinin değişmediği bildirilmiştir [127]. Trofoblastik hücreler CD95L sentezlemektedirler. Bu şekilde trofoblastlar, tehlike yaratabilecek T hücrelerini apoptoza yönlendirerek elimine ederler [128]. Gebelikte dengenin Th2 yönüne kayması fetusa karşı geliştirilen tolerans ile ilişkilendirilmektedir. Bazı araştırmacılar da gebelikte immun sistemin baskılanmasının patojen istilası için bir fırsat olabileceğini, böyle bir durumun da türün geleceğini riske atacağını söylemişlerdir. Aslında gebelikte immun sistemin baskılanmadığı, gebe bayanlardaki birçok hücrenin gebe olmayan bayanlar ile aynı sayı ve fonksiyonda olduğunu bildirmişlerdir. Gebelikte granülositlerin, monosit/makrofajların sayı ve fonksiyonlarının artmasına karşın NK hücre fonksiyonu, özellikle sitotoksik kapasiteleri ve IFN- $\gamma$  sentez kapasiteleri azalmaktadır. Kompleman sisteminin komponentleri ve akut faz proteinleri de gebelik süresince artmıştır. Dolayısıyla gebelikte fetusun güvenliğini sağlayan



selektif immunolojik değişmelerin, bir immun yetmezlik gibi değerlendirilmesi doğru değildir. Doğal immunitenin gebelik sırasında aşırı düzeyde aktif olması, anne yönünden (bazı enfeksiyonların ağırlığında artış, pre-eklampsi) ve fetus yönünden (düşük riski) zararlı olabilir. İnsanda maternal enfeksiyonlarda pro-enflamatuvar sitokin yapımı doğum ağrılarını başlatarak erken doğumu indükleyebilir [129,130].

#### **2.4.1 Allograft Olarak Fetus**

Fetus immunojeniktir ve gebeliğin 12. haftasında fetal HLA Sınıf II antijenleri belirir. Yarı antijen yapısı babaya ait (paternal) olduğu için fetus, esas itibariyle bir semi-allograft' tır. Ancak aralarında yüzeyel bir organ-graft benzerliği bulunsa bile semi-allogenik plasenta ve maternal uterus arasındaki ilişkiler, transplantasyon biyolojisinde geçerli kurallara göre yönetilemez. İmplantasyon, fetustan köken almış yabancı hücrelerin belli ölçüde maternal dokulara invazyonunu gerektirmektedir. Gebeliğin oluşması ve güvenle sürmesi, aslında fetal ve paternal antijenlere karşı immun tepkisizliği değil, tam tersine maternal bir immun tepkinin doğmasını gerekli kılmaktadır. Anne ve babanın MHC yakınlığının fazla olduğu durumlarda tekrarlayan spontan düşüklerin sayısının arttığına yönelik bazı raporlar da bir immun aktivasyonun gerekliliği hipotezini desteklemektedir. Bu çalışmalarda kadınlar, babanın MHC antijenleri (lenfositleri) ile aşılandıkları taktirde, anti-paternal antikorların oluştuğu ve düşüklerin önlenemediği iddia edilmektedir.

Gebelikte fetusa karşı maternal bir immun tepki vardır ve bu tepki 12. haftadan itibaren artan titrede anti-paternal HLA antikorlarının ve paternal antijenlere karşı maternal sitotoksik T hücre cevabının gelişmesi olarak açıkça belirir. Ancak fetal/paternal antijenlere karşı otolog T hücre cevabını modüle eden maternal T supresör hücre etkinliği de ortaya çıkar ve böylece fetusa karşı gelişebilecek humoral ve sellüler tepkiler baskılanır. Fare deneyleri, gebelikte 3 tip supresör hücrenin çalıştığını gösteriyor: Lenfoid dokuda bulunan ve T hücre karakteristiği göstermeyen supresörler; klasik T supresörler ve supresör faktörler sentezleyen trofoblast hücreleri. Gebelik sırasında annede IgG sınıfı blokan antikorlar da gelişir. Bu antikorlar paternal antijenleri bloke ederek, bunların maternal immun sistem tarafından tanınmasını önler ve paternal antijenlere karşı maternal lenfosit cevabını baskılar. Blokan antikorlar gebe olmayanlarda bulunmamıştır [131].

Trofoblast, ovumu uterus duvarına bağlar ve embriyonun beslenmesini sağlar; koryon ve amniyonu oluşturur. Trofoblastın koryonik villusu örten iç tabakasına sitotrofoblast, dış tabakasına sinsisyotrofoblast denir. Trofoblast hücreleri IFN- $\gamma$  ile indüklenmelerine rağmen (ilk trimesterde HLA-C ekspresyonu hariç), MHC Sınıf-I ve Sınıf-II moleküllerini eksprese etmezler ve bu nedenle bir antijen sunucu hücre (ASH) gibi fonksiyon yapamazlar. Bu durum fetusu maternal T hücre ataklarından korur. Bu hücreler yapısal olarak, sadece non-klasik molekül olan HLA-G eksprese ederler. Bu molekül, düşük düzeyde olmak üzere başka dokularda da eksprese edilebilir. HLA-G,  $\beta 2$  mikroglobulin ile asosiye olup düşük düzeyde polimorfizm gösterebilir. CD8<sup>+</sup> diferansiyasyon molekülü, HLA-G'yi tanır ve ona bağlanır. Trofoblastlarda HLA-G ekspresyonu, ilk trimesterde çok yüksek düzeyde olup 3. trimesterde iyice azalmış bulunur. HLA-G antijeninin fonksiyonu tam bilinmemekle beraber, semiallogeneik fetusa karşı, annenin immun toleransında önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Desidua hücrelerinin öldürücü hücre inhibitör reseptörleri (KIR) ve CD94/NKG2 reseptörlerini eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu reseptörler trofoblastlardaki HLA-G'yi tanırlar. Böylece, alloantijenlere karşı hücrel immun cevabın komponenti olan NK hücreleri, trofoblastlarda eksprese edilen HLA-G molekülleri ile silahsız bırakılır. MHC Sınıf-I molekülleri, öldürücü hücre inhibitör reseptörleri (KIR) için ligandırlar ve hücre yüzeyinde yer almadıklarında, normal olarak sitolitik NK hücre cevabı tetiklenir. NK hücrelerinde muhtemelen birden fazla farklı KIR bulunmaktadır. NK hücrelerinin, inhibitör KIR'ları aracılığı ile hücre yüzeylerindeki Sınıf-I moleküllerini spesifik olarak tanımaları, onların sitolitik aktivite göstermesini engelleyen HLA-G ise muhtemelen bütün NK hücre serilerinin sitolitik aktivitesini bloke etmektedir. Bu inhibisyon, anti-HLA-G monoklonal antikorları ile ortadan kaldırılabilir. Trofoblastlarda HLA-G ekspresyonu fetusa karşı maternal toleransın oluşmasında önemli rol oynar. NK hücreleri ise trofoblast invazyonunu sınırlamada rol oynar [131].

#### **2.4.2 Plasenta**

Plasenta, gebelikteki fizyolojik aktiviteleri düzenleyen bir immun organ gibi değerlendirilebilir. Plasenta protein ve steroid hormonlar sentezler; fetal akciğer, böbrek, ince barsak ve karaciğer gibi fonksiyon yapar; materno-fetal ünite immun regülasyona katılır. Plasenta immun süzgeç gibi çalışan güçlü bir bariyerdir ve paternal antijenlere karşı oluşmuş antikorları dolaşımdan toplayarak, bunların fetusa

ulaşmalarını engeller. Bu antikorlar pinositoz ile alınrlar ve potent trofoblastik proteazlar ile yıkılarak zararsız hale getirilirler.

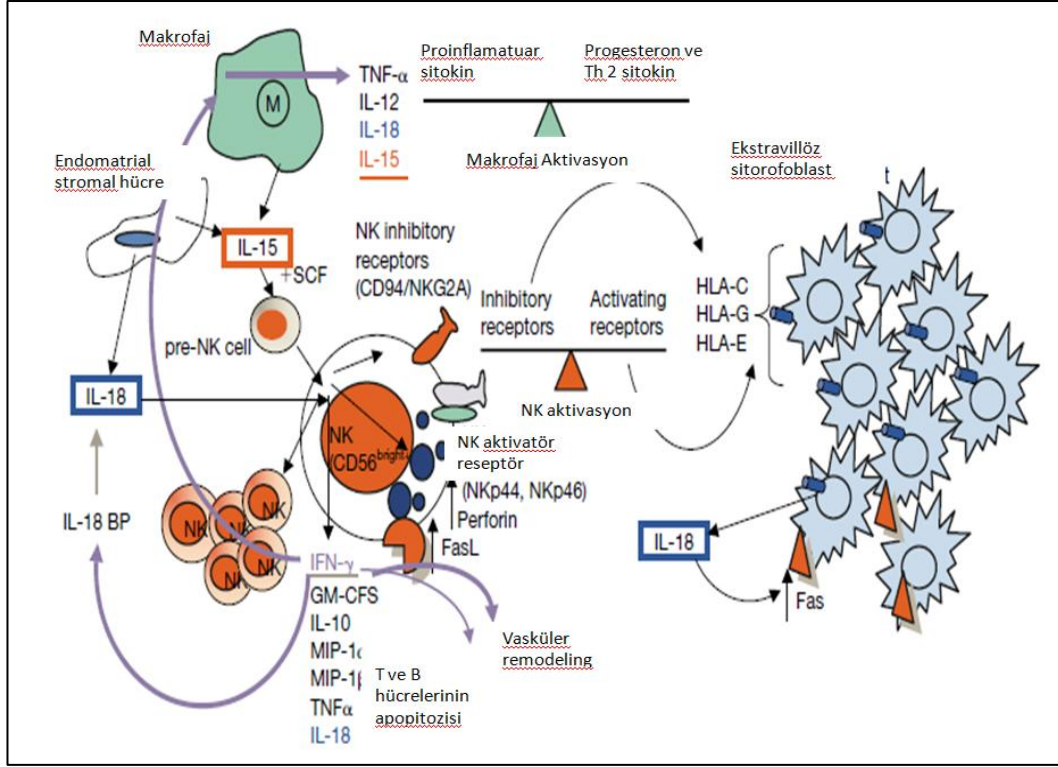
#### **2.4.2.1 Semi-Allograft olarak plasenta**

Koryonik kese plasentanın bir kısmını oluşturduğundan, hem babaya hem de anneye ait genlerin geçtiği, embriyoyu ve embriyo dışındaki yapıları oluşturacak dokular, anne tarafından uterus içerisinde bir allograft olarak algılanabilir. Kan sinusoidleri içerisinde maternal immun hücrelere maruz kalmasına rağmen, yüzen koryonik villusların sinsisyotrofoblast hücrelerinde MHC antijenlerinin bulunmayışı, red cevabını uyandırmaz [132]. Bununla beraber bağlı villusları oluşturan ve uterin desidua dokuyu invaze eden ekstravillöz sitotrofoblast hücreleri MHC Sınıf I antijenlerini (HLA-G) ekspresse etmektedir. Bu hücreler desidua içerisinde maternal T lenfositler ve NK hücrelerine maruz kalmaktadır ve bu nedenle immun saldırının potansiyel olarak hedefidir [133]. Bu hücrelerin korunmasının en az iki mekanizma yoluyla gerçekleştirildiğine inanılmaktadır.

Birincisi desidua hücrelerin, desidua içerisinde T ve NK hücrelerinin aktivasyonunu önleyen prostaglandinler E2 gibi aktif immunsupressor molekülleri lokal olarak üretmeleridir [134]. İkincisi ise, ekstravillöz trofoblast hücrelerindeki MHC Sınıf I antijenlerinin ekspresyonudur. Ekstravillus trofoblast hücrelerinde ekspresse olan, klasik olmayan MHC sınıf I antijenlerinden HLA-G' nin nonpolimorfik yapısı ve NK hücre inhibitör reseptörleriyle olan etkileşimleri bu hücreleri maternal immun cevaptan koruyan faktörlerdendir.

Plasental trofoblast hücreleri yüzeylerinde Sınıf II MHC molekülleri bulundurmazlar. İnsan vücudundaki tüm diğer hücrelerden farklı olarak, trofoblast hücrelerinin yüzeyinde klasik Sınıf I MHC transplantasyon antijenlerinden HLA-A ve HLA-B bulunmaz. Bunun yerine, plasental hücrelerin bir alt grubunun, özellikle villus dışı sitotrofoblastik (ekstravillus sitotrofoblast) hücrelerin yüzeyinde klasik Sınıf I-MHC ürünü olan HLA-C ve klasik olmayan MHC sınıf I antijenlerinden HLA-E ve G bulunurlar [133]. İmmun sistemde NK hücreleri, yüzeylerinde MHC olmayan hücreleri tanıyıp sitotoksik aktivite ile bu hücreleri elimine ederler [135]. Trofoblast hücrelerinin yüzeyinde hiçbir MHC molekülünün bulunmaması bu hücreleri implantasyon bölgesinin her tarafında yaygın olarak bulunan NK hücrelerinin hedefi haline getirecektir. Trofoblast hücrelerinin yüzeyindeki HLA-C, E ve G, NK

hücreleri aracılığıyla doğrudan öldürülmeden korunmaya ek olarak, NK hücre fonksiyonlarını inhibe edici reseptör etkileşimleriyle maternal immün cevabı baskılayıcı ya da toleransı artırıcı rollere de sahip olabilirler (Şekil 4) [133].



**Şekil 4:** Maternal Fetal Arayüzün Biyolojik Önemi (Immunology of Pregnancy 2005'den alınmıştır.)

İmplantasyonun gerçekleşmemesinde immunolojik faktörlerin rol oynayabileceği görüşü steroid kullanımı, intravenöz immunoglobulin (IVIG) uygulaması ve allojenik lenfosit terapisi gibi uygulamaların denenmesine neden olmuştur.

### 3. MATERYAL VE METODLAR

Olgularımızı, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesindeki Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi (ÜYTM) ve İstanbul Fertijin Tüp Bebek Merkezi'ne Ocak 2008-Ocak 2012 yılları arasında başvuran ve en az 2 defa tüp bebek tedavisi görmesine rağmen gebe kalamamış 500 hasta oluşturdu. Çalışma retrospektif - prospektif olarak planlandı. Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Etik Kurul Onayı (tarih: 10.01.2012, no: 157) alındıktan sonra hastaların dosyaları tarandı. Çalışmaya prospektif olarak dahil edilen yeni hastalardan "bilgilendirilmiş onam formu" alındı.

Olgu seçim kriterleri olarak ;

- En az 2 defa IVF denemesine rağmen gebe kalamamış olmak
- Primer ya da sekonder infertilite
- 20 yaş üstü, 40 yaş altı kadınlar
- Vücut kitle indeksi (VKİ) 18'den büyük, 30'dan küçük olmak
- Düzenli menstruel siklusa sahip hastalar (21-32 gün)
- Prematür over yetmezliği olmaması
- Bazal FSH < 12 U/ml, >9 U/ml olan hastalar
- Long agonist ve antagonist uygulanan vakalar

Tekrarlayan spontan abortusu olanlar, 20 yaş altı ve 40 yaş üstü hastalar, diyabet, hipertansiyon ve metabolizma bozukluğu olan çiftler çalışmaya dahil edilmedi. Hepatit B, HIV ve HCV seroloji pozitifliği olan çiftler çalışma dışı bırakıldı. İleri derecede over rezervi düşük olan hastalar çalışmaya alınmadı. Histerosalpingografi ya da ofis histeroskopi ile endometrial kavitenin değerlendirilmesi sonucunda polip, submükoz miyom, hidrosalpenks gibi lezyonu olan vakalar çalışmaya alınmadı. Mikrodoz ve diğer kısa protokol uygulanan vakalar çalışmaya dahil edilmedi.

Taraması yapılan hastaların dosyalarında ilk muayenelerinde kimlik ve yaş tespiti, obstetrik ve jinekolojik özgeçmişleri, menstruel siklus düzenleri yer almaktaydı. Fizik muayenelerinde kan basıncı, boy, ağırlık ve vücut kitle indeksleri ( $\text{kg/m}^2$ )

vardı. Sekonder seks karakter gelişimi değerlendirilmişti. Rutin pelvik muayeneleri yapılmıştı. Tedavi öncesinde aşağıdaki laboratuvar değerlerine bakıldığı görüldü.

- Erken foliküler fazda ( 2-3. gün ) ise; bazal USG yapıldı ve uterus boyutları, endometrium kalınlığı, over boyutları, folikül sayısı ve çapları ölçüldü. Bunun için Voluson 730 Pro (GE Medical Systems Milwaukee, USA) marka ultrasonografi cihazı ve 5 MHz' lik vajinal prob kullanıldı.
- Bazal (3. gün) FSH, LH, E2, Prolaktin (Elecsys, Meinheim, Almanya kitleriyle ve Roche Elecsys 1010 cihazı ile) değerleri ölçüldü.
- Tiroid fonksiyon testleri (Roche diagnostic, Achen , Almanya kitleri ile ve Roche Elecsys 1010 cihazı ile ) değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 324'üne multidoz antagonist, 176'sına agonist uzun protokol uygulandı. Her iki protokolda de over stimülasyonuna menstrual siklusun 3. gününde başlandı. Stimülasyonda r-FSH (Puregon; MSD, NJ/USA) ya da (Gonal-F; Merck-Serono, Geneva/Switzerland) ve/veya Hp-hMG (Menopur, Ferring, Sweden) kullanıldı. Başlangıç dozu belirlenirken her bir olgu için tahmini over cevabı göz önüne alındı. Buna göre ortalama 300 IU ile başlayan dozlarla sabah ve/veya akşam sc enjeksiyonlar karın bölgesine hastanın kendisi tarafından uygulandı. Stimülasyonun 6-7. gününden itibaren USG ile folikül sayı boyutu ve serum östrodiol ölçümleri ile değerlendirilen over cevabına göre yeni doz ayarlaması yapıldı ve stimülasyon hCG gününe dek devam etti.

### **3.1 Ovulasyon İndüksiyon Protokolleri**

Antagonist prokolde gonadotropinlerle over stimülasyonu devam ederken, dominant folikül boyutu  $\geq 14$  mm olarak saptandığında yada E2  $>400-600$  pg/ml olduğunda GnRH antagonisti Cetrotide flakon ( Cetrotide flakon 0.25 mg, Merck-Serono, Geneva/Switzerland) 1x1 s.c başlandı. GnRH antagonisti hCG enjeksiyon gününe dek devam edildi.

Her iki protokolda de oosit maturasyonu için hCG uygulama kriteri aynıydı. Önde giden folikül 18 mm olduğunda veya foliküllerden ikisi 17 mm olduğunda üriner hCG 10000 IU (Pregnyl amp, MSD, NJ/USA) veya r-hCG 250  $\mu$  gr (Ovitrelle, Merck-Serono, Geneva/Switzerland) ile ovulasyon tetikleme yapıldı. Oosit toplama

işlemi HCG uygulamasından 36 saat sonra gerçekleştirildi. ICSI standart proseduru uygulanarak oosit toplanmasından 3 gün sonra skorlanan embriyolardan tercihen tip A iyi kalitede olanlarından 1-4 adet uterin kaviteye transfer edildi. Luteal destek sağlamak amacıyla intravajinal mikronize progesteron 3x2 (Progestan yumuşak kapsul, 100 mg , Kocak ilac , Türkiye ) ek olarak 310 hastaya estradiol (Estrofem tb, Novo Nordisk A/S, Denmark) ve 189 hastaya sildenafil sitrat (Viagra, Pfizer, NY/USA) kullanıldı.

Lenfosit aşısı transfer öncesi birer ay arayla 3 kez, transferden sonra ise 2 kez intradermal olarak uygulandı.

### 3.2 Paternal Lenfosit Aşısının Hazırlanışı ve Uygulanışı

Paternal lenfosit aşısının hazırlanmasında klinik rehberlerde bildirilen teknik uygulandı [136].

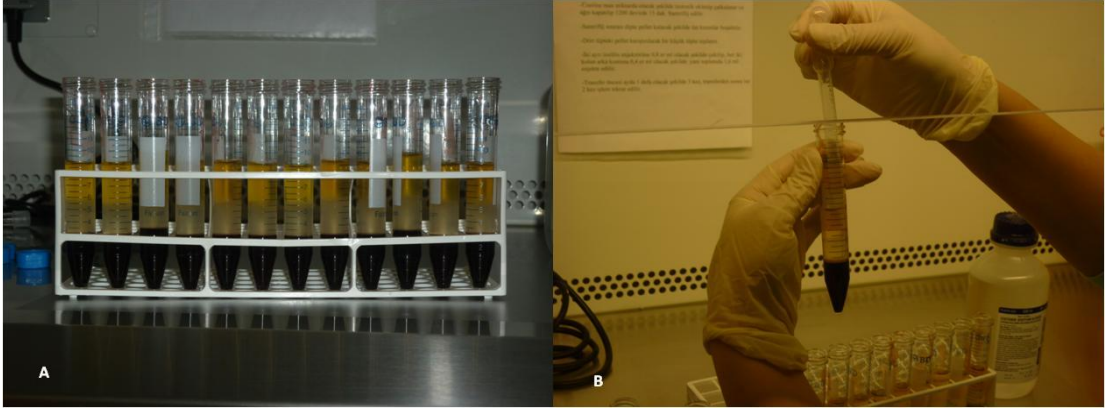
- Erkek eşten 9 tane EDTA'lı tüpe 10 ml'den toplam 90 ml kan alındı.
- Oniki tane konik tüpe 3'er ml Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS-Oslo/Norvey) solüsyonu koyuldu.
- Alınan kan örneği bu oniki tüpe solüsyonla kan karışmayacak şekilde eklendi (3 ml solüsyon üzerine 7 ml kan).



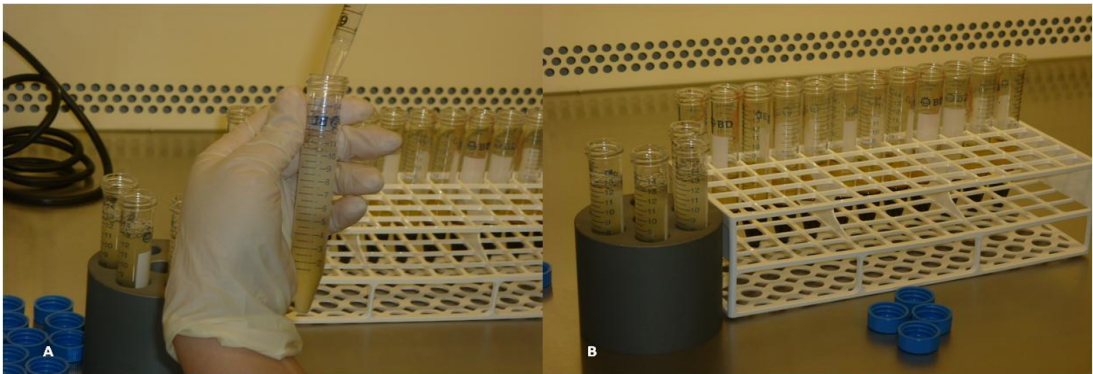
- Tüpler ağızları kapatılmadan 1500 devirde 30 dak. Santrifüj edildi.



- Santrifüj sonrası ortada oluşan beyaz kısımlar 4 ayrı tüpe paylaştırıldı (Yaklaşık olarak 3 tüpteki beyaz kısım 1 tüpe olacak şekilde).

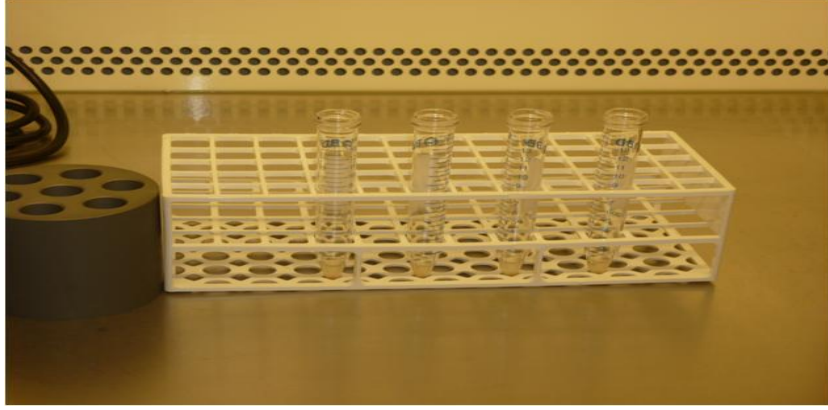


- Üzerine maksimum miktarda olacak şekilde izotonik eklenip çalkalandı ve ağzı kapatılıp 1200 devirde 15 dak. santrifüj edildi.

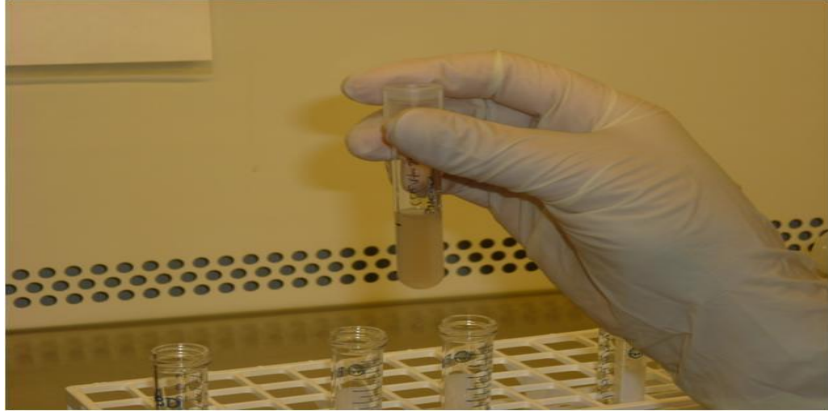




- Santrifüj sonrası dipte pellet kalacak şekilde üst kısımlar boşaltıldı.



- Dört tüpteki pellet karıştırılarak bir küçük tüpte toplandı.



- İki ayrı insülin enjektörüne 0,8 er ml olacak şekilde çekilip, her iki kolun arka kısmına, iki farklı bölgeye 0,4 er ml olacak şekilde yani toplamda 1,6 ml enjekte edildi.



Embriyo transferi öncesi 3 defa, transfer sonrası 2 defa lenfosit aşısı uygulanan tüm olguların indüksiyon süresi, kullanılan ortalama gonadotropin dozu, elde edilen oosit

sayısı, MII oosit sayısı, fertilizasyon oranı (fertilize oosit/ICSI uygulanan oositX100), transfer edilen embriyo sayısı, ET günü, hastalardaki gebe kalma oranı ve bahsedilen tüm parametrelere göre gebelik oranları araştırıldı. Ayrıca vakalar kendi içinde gebe kalanlar ve kalmayanlar, protokolu agonist olanlar ve antagonist olanlar, lütral destek için estradiol verilenler ve sildenafil sitrat verilenler olarak alt gruplara ayrıldı ve bunlara göre değerlendirmeler yapıldı.

İstatistik hesaplamalar için SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences version for Windows - Chicago, IL/USA) paket programı kullanıldı. Grupların genel demografik özelliklerinin karşılaştırılmasında tanımlayıcı istatistiksel analizlerden faydalanıldı. Gebe olan ve olmayan grupların niceliksel verilerinin karşılaştırılmasında Student-t test kullanıldı. Grupların non-parametrik verilerinin karşılaştırılmasında Ki-Kare ( $\chi^2$ ) testi kullanıldı. Sonuçlar değerlendirilirken  $p \leq 0.05$  düzeyi istatistiksel anlamlı oran olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Olgularımızı, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesindeki Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi (ÜYTM) ve İstanbul Fertijin Tüp Bebek Merkezi'ne Ocak 2008-Ocak 2012 yılları arasında başvurmuş en az 2 defa tüp bebek tedavisi görmesine rağmen gebe kalamamış 500 hasta oluşturdu.

Vakaların genel demografik özellikler Tablo 3'de sıralanmıştır. Olguların ortalama yaşı  $33.5 \pm 0.2$  (ortalama  $\pm$ SEM-standart error of means) yıl idi. Çalışmaya dahil edilen 500 vakanın ortalama infertilite süresi  $8.8 \pm 0.2$  yıl olarak hesaplandı. Vakaların hormon profiline bakıldığında ortalama FSH düzeyi  $8.5 \pm 0.4$  (U/ml), LH  $7.0 \pm 0.4$  (U/ml), Östradiol (E2)  $61.3 \pm 4.1$  (pg/dl), PRL  $16.4 \pm 0.5$  (ng/ml) ve TSH  $1.79 \pm 0.05$  (U/ml) olarak hesaplandı.

**Tablo 3:** Olguların demografik özellikleri (n=500)

	Ort	$\pm$	SEM
<b>Yaş (yıl)</b>	33.5		0.2
<b>Eşinin Yaşı (yıl)</b>	36.6		0.2
<b>İnfertilite Süresi (yıl)</b>	8.8		0.2
<b>FSH (U/ml)</b>	8.5		0.4
<b>LH (U/ml)</b>	7.0		0.4
<b>E2 (pg/dl)</b>	61.3		4.1
<b>Prolaktin (ng/ml)</b>	16.4		0.5
<b>TSH (U/ml)</b>	1.79		0.05

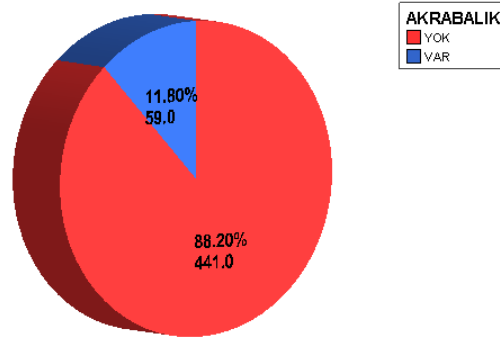
Çiftlerin kan grupları Tablo 4'de gösterilmiştir. Kadınların %38.4'ü A Rh (+), %15.2'si B Rh(+), %29'u 0 Rh(+), %4.4'ü AB Rh(+), %5.0'i A Rh(-), %2.2'si B

Rh(-), %4.4'ü 0 Rh(-), %1.4'ü AB Rh(-) idi. Eşlerinin kan gruplarının oranları ise yukarıdaki sıralamaya göre sırasıyla %33, %19.6, %30.0, %5.4, %4.4, %1.2, %5.8, %0.6 olarak izlendi.

**Tablo 4: Çiftlerin Kan Grupları**

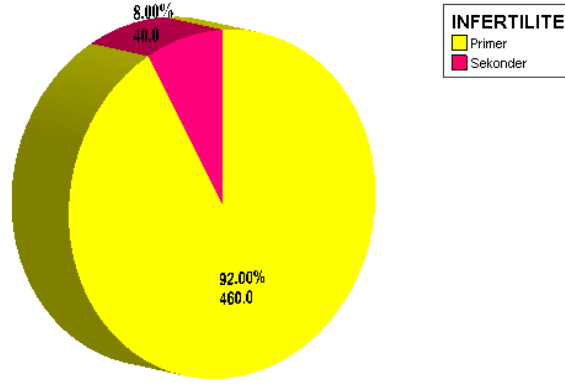
	Kadın		Erkek	
	n	%	n	%
<b>A Rh+</b>	192	38.4	165	33.0
<b>B Rh+</b>	76	15.2	98	19.6
<b>0 Rh+</b>	145	29	150	30.0
<b>AB Rh+</b>	22	4.4	27	5.4
<b>A Rh-</b>	25	5.0	22	4.4
<b>B Rh-</b>	11	2.2	6	1.2
<b>0 Rh-</b>	22	4.4	29	5.8
<b>AB Rh-</b>	7	1.4	3	0.6

Çiftlerin akrabalık durumları Şekil 5'de verilmiştir. Olguların akrabalık durumlarına bakıldığında tüm çiftlerin 59'u, yani %11.8'inin akraba olduğu görüldü. Çiftlerin 441'inde, yani %88.2'sinde akrabalık yoktu.



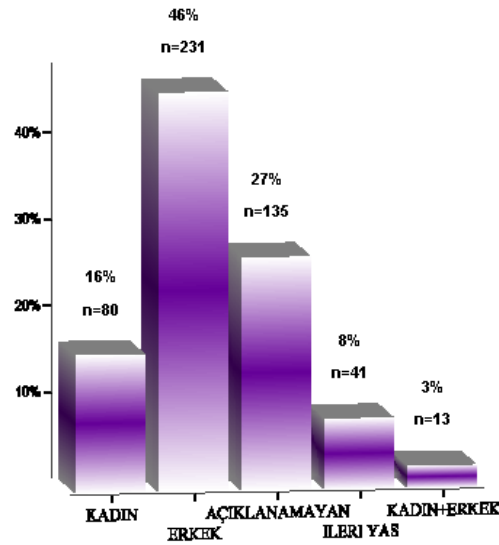
**Şekil 5: Çiftlerin Akrabalık Durumları**

Hastaların infertilite tipleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Çiftlerin 460 (%92)'nin primer infertilitesinin olduğu izlenirken, 40 (%8) çiftin sekonder infertilitesi olduğu görüldü.



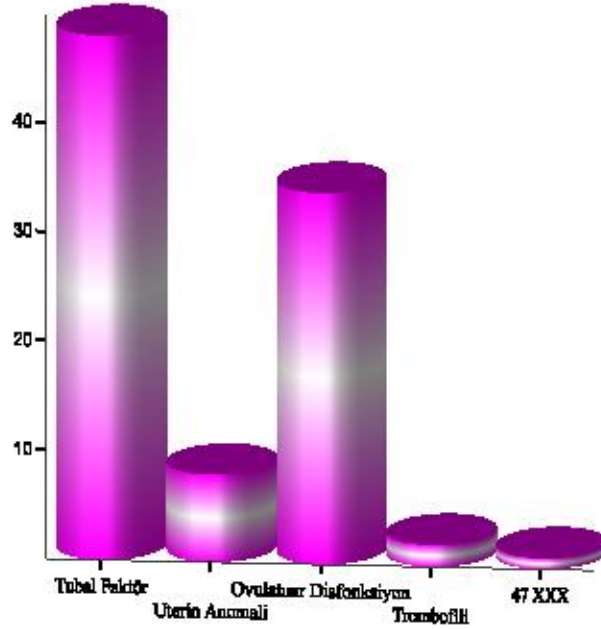
Şekil 6: İnfertilite Tipleri

Beş yüz olgunun tamamına bakıldığında infertilite nedenleri Şekil 7'de gösterildiği gibidir. Çiftlerin 231'inde erkek faktörü, 135'inde açıklanamayan infertilite, 80'inde kadın faktörü, 41'inde ileri yaş nedeni ve 13'ünde mikst (erkek + kadın faktörü) faktörün infertiliteye neden olduğu izlenmiştir.



Şekil 7: İnfertilite Nedenleri

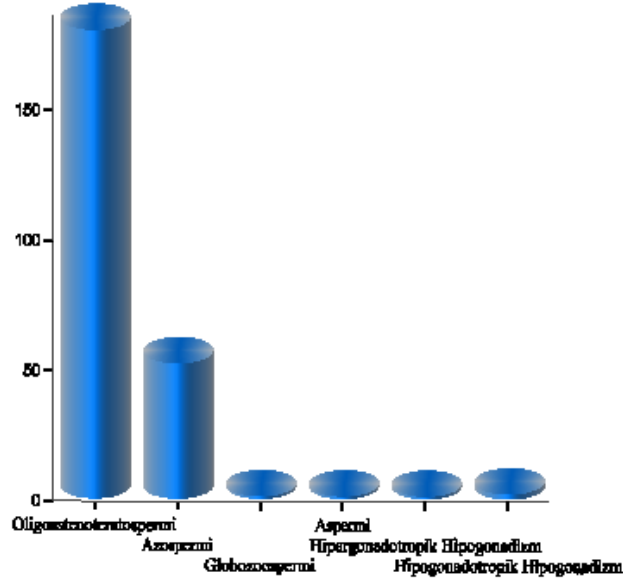
Çiftlerin 93'ünde infertilite nedeni kadın faktörü olarak izlenmiş olup kadın faktörünün alt grupları Şekil 8'de gösterilmiştir. Kadın faktörü nedeniyle başvuran çiftlerin 48 (%9.6)'inde tubal faktör, 34 (%6.8)'inde ovulatuvar disfonksiyon, 8 (%1.6)'inde uterin faktörler, 2 (%0.4) tanesinde trombofili ve 1 (%0.2) tanesinde kromozomal anomali (47,XXX) olduğu görülmüştür. Vakaların 13'ünde kadın faktörüyle birlikte erkek faktörü de izlenmiştir.



**Şekil 8:** İnfertilite Nedeni Kadın Faktörü Olan Hastalar

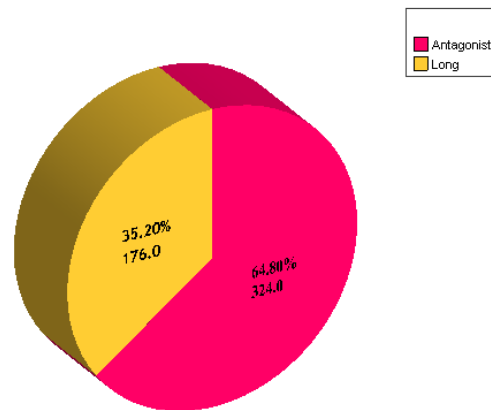
Çiftlerin 244'ünde infertilite nedeni erkek faktörü olarak izlenmiş olup erkek faktörünün alt grupları Şekil 9'da gösterilmiştir. Erkek faktörü nedeniyle başvuran çiftlerin 180 (%36.0)'ünde oligoastenoteratospermi, 52 (%10.4)'ünde azospermi, 1 (%0.2)'inde globozoospermi, 1 (%0.2) tanesinde aspermi ve 1 (%0.2) tanesinde hipergonadotropik hipogonadizm, 2 (%0.4)'ünde de hipogonadotropik

hipogonadizm olduğu görülmüştür. Vakaların 13'ünde erkek faktörüyle birlikte kadın faktörü de izlenmiştir.



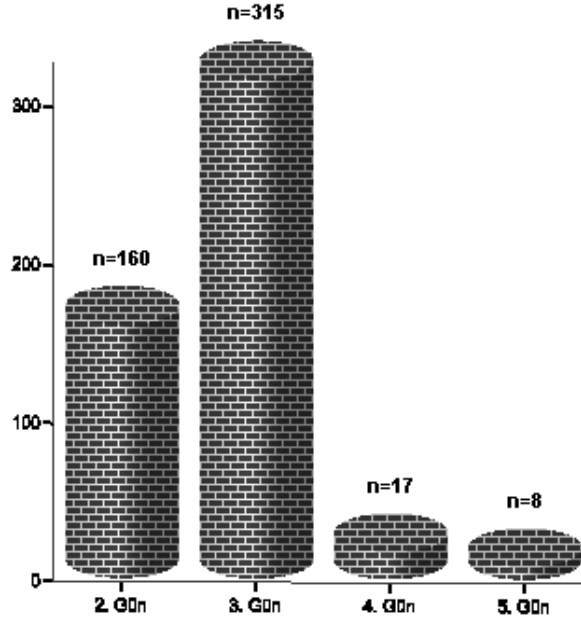
Şekil 9: İnfertilite Nedeni Erkek Faktörü Olan Hastalar

Tedavi protokollerine göre (Şekil 10) vakaların 324 (%64.8) tanesine antagonist protokol, 176 (%35.2) tanesine ise long agonist protokolu ile tüp bebek tedavisi uygulanmıştır.



Şekil 10: Tedavi Protokolleri

Vakalara 2, 3, 4 ve 5. günlerde embriyo transferleri uygulanmıştır (Şekil 11). Vakaların 315 (%63)'üne 3. gün, 160 (%32)'ine 2. gün, 17 (%3.4)'üne 4. gün, 8 (%1.6)'üne 5. gün embriyo transferi yapılmıştır.



**Şekil 11:** Embriyo Transfer Günü

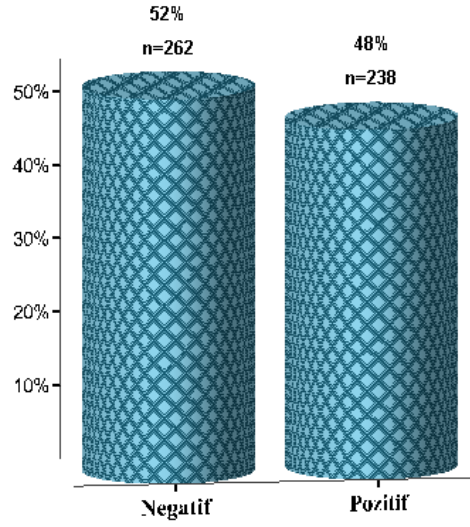
Olguların tedaviyle ilgili genel özellikler Tablo 5'de sıralanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 500 olgunun ortalama tedavi süresi 10.6 (min:6, max:16) gün, kullanılan ortalama gonadotropin dozu 3553 (min:650, max:9000) Ünite, ortalama oosit sayısı 11 (min:1, max:38), ortalama MII oosit sayısı 8 (min:1, max:32), ortalama fertilizasyon oranı %68.1 (min:%13.3, max:%100) ve ortalama ET sayısı 2 (min:1, max:4) olarak izlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm vakaların gebelik sonuçları Şekil 12'de gösterilmiştir. Bu vakalar daha önceki tedavilerinde gebe kalamamış hastalardan seçilmiştir. Olguların 262 (%52)'sinde gebelik izlenmezken, uygulanmış tedaviye rağmen daha önceki tedavilerinde gebelik elde edilememiş 238 (%48) kadında gebelik izlenmiştir.



**Tablo 5:** Tüm Olguların Tedaviyle İlgili Genel Özellikleri

	<b>Ort</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Tedavi süresi (Gün)</b>	10.6	6	16
<b>Toplam Gonadotropin Dozu (Unite)</b>	3553	650	9000
<b>Oosit Sayısı (n)</b>	11	1	38
<b>MII Oosit Sayısı (n)</b>	8	1	32
<b>Fertilizasyon (%)</b>	68.1	13.3	100
<b>ET Sayısı</b>	2	1	4



**Şekil 12:** Tüm Olguların Gebelik Sonuçları

Tedavi sonuçlarına göre hastalar gebe kalan ve gebe kalamayanlar olarak 2 grupta incelenmiştir (Tablo 6). Gebe kalanların yaşı  $32.4 \pm 0.3$  yıl, gebe kalamayanlarıki ise  $34.5 \pm 0.3$  olarak hesaplanmıştır ( $p=0.001$ ). Her iki grup için hastaların eşlerinin yaşları karşılaştırıldığında gebe kalanlarıki  $36.0 \pm 0.4$  yıl iken, diğer gruptakilerinki  $37.2 \pm 0.3$  ile istatistiksel anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $p=0.03$ ). İnfertilite süresi gebe grupta  $8.6 \pm 0.3$  yıl, diğer grupta  $8.9 \pm 0.3$  yıl idi ( $p=0.58$ ). Her iki grup hormon profili açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Gebe kalan ve kalamayan gruplardaki hormon profili sırasıyla FSH  $8.6 \pm 0.6$  U/ml,  $8.4 \pm 0.4$  U/ml ( $p=0.82$ ), LH  $6.8 \pm 0.7$  U/ml,  $7.1 \pm 0.4$  U/ml ( $p=0.75$ ), E2

60.0±5.5 pg/dl, 62.7±6.0 pg/dl (p=0.74), PRL 17.1±0.8 ng/ml, 15.7±0.5 ng/ml (p=0.17) ve TSH 1.6±0.05 U/ml, 1.9±0.08 U/ml (p=0.10) idi. Tedavi süresi gebe grupta 10.5±0.1 gün iken, diğer grupta 10.6±0.1 idi (p=0.35). Toplam kullanılan gonadotropin dozu gebe olan grupta anlamlı olarak (p=0.001) daha düşük bulundu (3174 üniteye karşın 3898 ünite). Elde edilen toplam oosit sayısı (12.2±0.4'e karşı 10.3±0.4) ve MII oosit sayısı (9.2±0.4'e karşı 7.5±0.3) gebelik elde edilen grupta anlamlı olarak daha yüksek idi (p=0.006 ve p=0.002). Her iki grup fertilizasyon oranı ve ET sayısı açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Gebe kalan ve kalamayan gruplardaki fertilizasyon oranları %68.8±1.3 ve %67.4±1.4 (p=0.48) olarak izlendi. Gruplardaki ET sayısı ise retrospektif olarak 2.7±0.1 ve 2.5±0.1 (p=0.12) idi.

**Tablo 6:** Gebelik Sonuçlarına Göre Vakaların Genel Özellikleri

	Gebe			Gebe Değil			P
	Ort	±	SEM	Ort	±	SEM	
<b>Yaş (yıl)</b>	32.4		0.3	34.5		0.3	<b>0.001</b>
<b>Eşinin Yaşı (yıl)</b>	36.0		0.4	37.2		0.3	<b>0.03</b>
<b>İnfertilite Süresi (yıl)</b>	8.7		0.3	8.9		0.3	0.58
<b>FSH (U/ml)</b>	8.6		0.6	8.4		0.4	0.82
<b>LH (U/ml)</b>	6.8		0.7	7.1		0.4	0.75
<b>E2 (pg/dl)</b>	60.0		5.5	62.7		6.0	0.74
<b>Prolaktin (ng/ml)</b>	17.1		0.8	15.7		0.5	0.17
<b>TSH (U/ml)</b>	1.6		0.05	1.9		0.08	0.10
<b>Tedavi süresi (Gün)</b>	10.5		0.1	10.6		0.1	0.35
<b>Toplam Gonadotropin Dozu (Unite)</b>	3174		93	3898		105	<b>0.001</b>
<b>Oosit Sayısı (n)</b>	12.2		0.4	10.3		0.4	<b>0.006</b>
<b>MII Oosit Sayısı (n)</b>	9.2		0.4	7.5		0.3	<b>0.002</b>
<b>Fertilizasyon (%)</b>	68.8		1.3	67.4		1.4	0.48
<b>ET Sayısı</b>	2.7		0.1	2.5		0.1	0.12

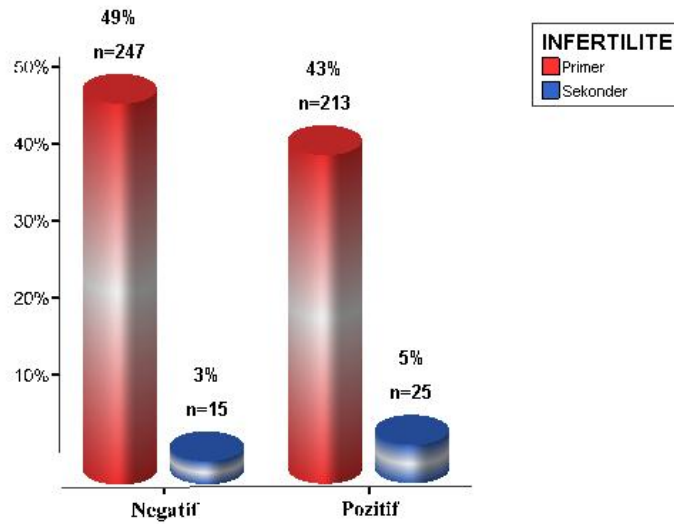
Çalışmaya dahil edilen olguların infertilite tiplerine göre gebe kalıp kalmama durumları Tablo 7'de gösterilmiştir. Gebe kaların 213 (%89.5)'ü primer infertil, 25

(%10.5)'i sekonder infertil grupta yer almaktadır. Gebe kalamayanların ise 247 (%94.3)'si primer infertil iken, 15 (5.7)'i sekonder infertildir. Primer infertile olan 460 hastanın 213 (%46.3) tanesi gebe kalabilirken, 247 (%53.7) tanesi gebe kalamamıştır. Buna karşın sekonder infertil olan 40 hastanın 25 (%62.5)'i tedavi sonrası gebe kalırken, 15 (%37.5)'i gebe kalamamıştır (p=0.04).

**Tablo 7:** Gebelik Sonuçlarının İnfertilite Tipleriyle Karşılaştırılması

	Gebelik						P
	Var			Yok			
	n	±	%	n	±	%	
<b>Primer İnfertil</b>	213		89.5	247		94.3	<b>0.04</b>
<b>Sekonder İnfertil</b>	25		10.5	15		5.7	

Olguların gebelik sonuçlarının infertilite nedenleriyle karşılaştırılması Şekil 13'te verilmiştir. Gebelik görülen olguların 213 (%43)'ü primer infertil, 25 (%5)'i sekonder infertil olarak izlenmiştir. Gebelik izlenmeyen olguların ise 247 (%49)'si primer infertil iken, 15 (%3)'i sekonder infertil olduğu görülmüştür.



**Şekil 13:** Gebelik Sonuçlarının İnfertilite Tiplerine Göre Kıyaslanması

Gebe kalan ve kalamayan grupların genel infertilite nedenleri Tablo 8'de verilmiştir. Gebe kalan gruptaki infertil çiftlere bakıldığında 36 (%15.1)'sı kadın faktörü, 124 (%52.1)'ü erkek faktörü, 61 (%25.6)'i açıklanamayan infertilite, 13 (%5.5)'ü ileri yaş ve 4 (%1.7)'ü mikst faktör kaynaklıdır. Gebe kalamayanların ise 44 (%16.8)'ü kadın faktörü, 107 (%40.8)'si erkek faktörü, 74 (%28.2)'ü açıklanamayan infertilite, 28 (%10.7)'i ileri yaş ve 9 (%3.4)'u mikst faktör nedenlidir. İnfertilite sebebi kadın faktörü olan 80 hastanın 36 (%45)'sı gebe kalmış, 44 (%55) tanesi ise gebe kalamamıştır. Erkek faktörü tanısı nedeniyle 231 vakanın 124 (%53.7)'ü gebe kalmış, 107 (%46.3)'ü ise gebe kalamamıştır. Açıklanamayan infertilitesi olan 135 çiftin 61 (%45.2)'i gebe kalmış olup, 74 (%54.8)'ü gebelik elde edilememiştir. İleri yaş nedeniyle tedaviye alınan 41 hastadan 13 (%31.7)'ü gebe kalırken, 28 (%68.3)'i gebe kalamamıştır. Mikst nedenlerden dolayı gelen 13 hastanın 4 (%30.8)'ü gebe kalırken, 9 (%69.2)'u gebe kalamamıştır (p=0.04).

**Tablo 8:** Gebelik Sonuçlarının Kadın İçin İnfertilite Nedenleriyle Karşılaştırılması

	Gebelik						P
	Var			Yok			
	n	±	%	n	±	%	
<b>Kadın Faktörü</b>	36		15.1	44		16.8	
<b>Erkek Faktörü</b>	124		52.1	107		40.8	
<b>Açıklanamayan İnfertilite</b>	61		25.6	74		28.2	<b>0.04</b>
<b>İleri yaş</b>	13		5.5	28		10.7	
<b>Mikst Faktörler</b>	4		1.7	9		3.4	

Gebelik sonuçlarına göre kadın faktörü nedenli infertil hastalar sınıflandırılmıştır (Tablo 9). Tubal faktörlü olguların 17 (%41.5)'sinde gebelik mevcut iken, 31 (%59.6)'inde gebelik görülmemiştir. Uterin kaynaklı infertil çiftlerin 3 (%7.3)'ü gebe kalmışken, 5 (%9.6)'i gebe kalamamıştır. Ovulatuvar disfonksiyonu olan hastaların 19 (%46.3)'ünde gebelik oluşmuşken, 15 (%28.8)'inde gebelik oluşmamıştır. Trombofilisi olan 2 hastanın 1 (%2.4)'i gebe kalmış, 1 (%1.9) gebe

kalamıştır. Kromozom anomalisi (47,XXX) olan 1(%2.4) hasta gebe kalmıştır (p=0.30).

**Tablo 9:** Gebelik Sonuçlarının Kadın İnfertilite Nedenleriyle Kıyaslanması

	Gebelik						P
	Var			Yok			
	n	±	%	n	±	%	
<b>Tubal faktör</b>	17		41.5	31		59.6	
<b>Uterin Anomali</b>	3		7.3	5		9.6	
<b>Ovulatuvar Disfonksiyon</b>	19		46.3	15		28.8	0.30
<b>Trombofili</b>	1		2.4	1		1.9	
<b>Kromozom anomalisi (47,XXX)</b>	1		2.4	0		0	

Gebelik sonuçlarına göre erkek faktörü kaynaklı infertil hastalar sınıflandırılmıştır (Tablo 10). Gebe kalanların 94 (%75.8)'i oligoastenoteratospermi (OAT), 28 (%22.6)'sı azospermi, 1 (%0.8)'i globozoospermi, 1 (%0.8)'i hipogonadotropik hipogonadizm tanılı çiftler oluşturmaktadır. Gebe kalamayanlar ise OAT'si olan 86 (%76.1), azospermisi olan 24 (%21.2), aspermili 1 (%0.9), hipergonadotropik hipogonadizm olan 1 (0.9) ve hipogonadotropik hipogonadizm olan 1 (0.9) hastadır (p=0.67).

**Tablo 10:** Gebelik Sonuçlarının Erkek İnfertilite Nedenleriyle Karşılaştırılması

	Gebelik						P
	Var			Yok			
	n	±	%	n	±	%	
<b>Oligoastenoteratospermi</b>	94		75.8	86		76.1	
<b>Azospermi</b>	28		22.6	24		21.2	
<b>Globozoospermi</b>	1		0.8	0		0	
<b>Aspermi</b>	0		0	1		0.9	0.67
<b>Hipergonadotropik Hipogonadizm</b>	0		0	1		0.9	
<b>Hipogonadotropik Hipogonadizm</b>	1		0.8	1		0.9	

Tüm hastaların kan grupları gebe kalan ve kalmayanlar olarak Tablo 11'de incelenmiştir. Gebe kalanların kan grupları sırasıyla A Rh(+) 89 (%37.4), B Rh(+) 42 (%17.6), 0 Rh (+) 63 (%26.5), AB Rh(+) 7 (%2.9), A Rh(-) 15 (%6.3), B Rh(-) 6 (%2.5), 0 Rh (-) 11 (%4.6) ve AB Rh(-) 5 (%2.1)'dir. Gebe kalmayanlarınki ise A Rh(+) 103 (%39.3), B Rh(+) 34 (%13.0), 0 Rh (+) 82 (%31.3), AB Rh(+) 15 (%5.7), A Rh(-) 10 (%3.8), B Rh(-) 5 (%1.9), 0 Rh (-) 11 (%4.2) ve AB Rh(-) 2 (%0.8) olarak saptanmıştır (p=0.29).

**Tablo 11:** Gebelik Sonuçlarının Kan Gruplarıyla Karşılaştırılması

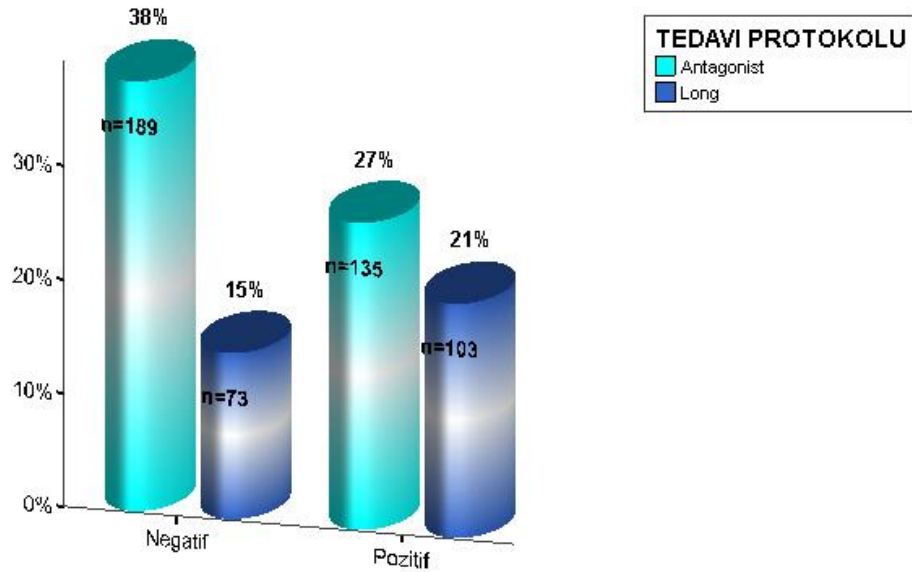
	<b>Gebelik</b>						<b>P</b>
	<b>Var</b>			<b>Yok</b>			
	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	
<b>A Rh+</b>	89		37.4	103		39.3	0.29
<b>B Rh+</b>	42		17.6	34		13.0	
<b>0 Rh+</b>	63		26.5	82		31.3	
<b>AB Rh+</b>	7		2.9	15		5.7	
<b>A Rh-</b>	15		6.3	10		3.8	
<b>B Rh-</b>	6		2.5	5		1.9	
<b>0 Rh-</b>	11		4.6	11		4.2	
<b>AB Rh-</b>	5		2.1	2		0.8	

Tablo 12'de tedavi protokollerine göre gebelik sonuçları verilmiştir. Gebe kalan gruptaki infertil çiftlerin 103 (%43.3)'üne long agonist protokol, 135 (%56.7)'ine antagonist protokol uygulanmıştır. Gebe kalmayan gruptakilerin 73 (%27.9)'üne long agonist, 189 (%72.1)'ine antagonist protokol uygulanmıştır. Tedavi protokollerine kendi içerisinde bakıldığında long agonist uygulanan 176 hastanın 103 (%58.5)'ü gebe kalmışken, 73 (%41.5)'ü gebe kalamamıştır. Antagonist uygulanan 324 hastanın 135 (%41.7)'i gebe kalmışken, 189 (%58.3)'ü gebe kalamamıştır (p=0.001).

**Tablo 12:** Gebelik Sonuçlarının Tedavi Protokolleriyle Karşılaştırılması

	Gebelik						P
	Var			Yok			
	n	±	%	n	±	%	
<b>Long Agonist</b>	103		43.3	73		27.9	<b>0.001</b>
<b>Antagonist</b>	135		56.7	189		72.1	

Olguların gebelik sonuçlarının tedavi protokolleriyle karşılaştırılması Şekil 14'de verilmiştir. Gebelik görülen olguların 135 (%27)'ine antagonist protokol, 103 (%21)'üne long agonist protokol uygulanmıştır. Gebelik izlenmeyen olguların ise 189 (%38)'una antagonist protokol uygulanmışken, 73 (%15)'üne long agonist protokol uygulanmıştır.



**Şekil 14:** Gebelik Sonuçlarının Tedavi Protokolleriyle Karşılaştırılması

Olguların gebe olup olmama durumuna göre ET günleri Tablo 13'de karşılaştırılmıştır. Gebelik oluşan gruptaki hastaların 65 (%27.3)'üne 2. gün, 160 (%67.2)'ına 3. gün, 8 (%3.4)'üne 4. gün, 5 (%2.1) 5. gün ET uygulanmıştır. Gebe

kalamayan grubun ise yukarıdaki sıraya göreye sıralaması 95 (%36.3), 155 (%59.2), 9 (%3.4) ve 3 (%1.1) idi. Bulgular açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. (p=0.16).

**Tablo 13:** Gebelik Sonuçlarının ET Günüyle Karşılaştırılması

	<b>Gebelik</b>						<b>P</b>
	<b>Var</b>			<b>Yok</b>			
	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	
<b>2. gün ET</b>	65		27.3	95		36.3	0.16
<b>3. gün ET</b>	160		67.2	155		59.2	
<b>4. gün ET</b>	8		3.4	9		3.4	
<b>5. gün ET</b>	5		2.1	3		1.1	

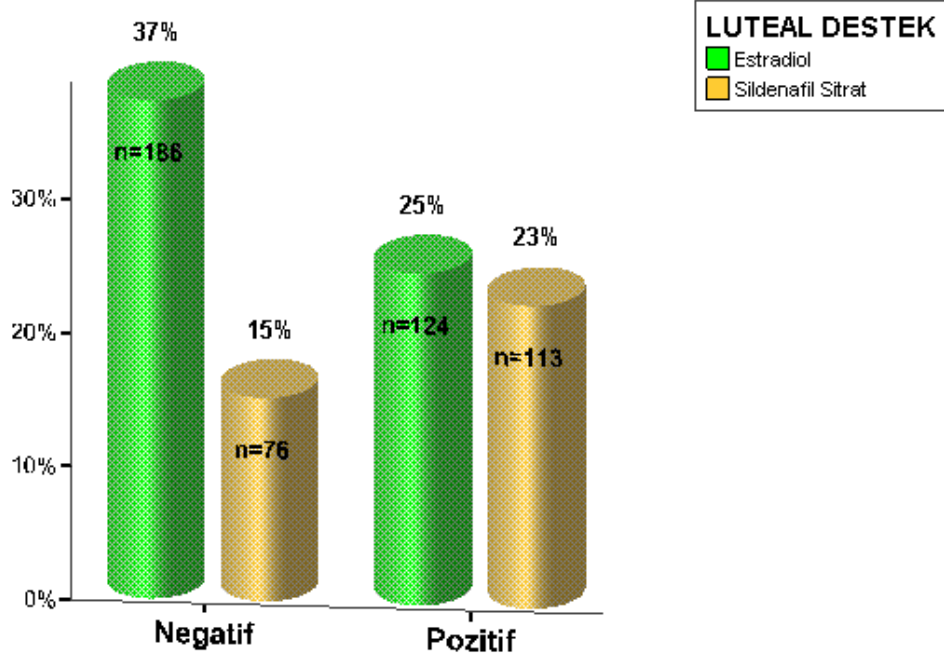
Uygulanan luteal destek protokolleri gebelik sonuçlarına göre incelenmiş olup (Tablo 14) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Progesterona ek olarak gebelik sonucu pozitif olan grubun 124 (%52.3)'üne estradiol, 113 (%47.7)'üne sildenafil sitrat kullanılmıştır. Gebelik sonucu negatif olan grubun ise 186 (%71.0)'sına estradiol, 76 (%29.0)'sına sildenafil sitrat kullanılmıştır. Estradiol alan 310 hastanın 124 (%40)'ü gebe kalmışken, 186 (%60)'sı gebe kalamamıştır. Buna karşın sildenafil sitrat alan 189 hastanın 113(%59.8)'ü gebe kalmışken, 76 (%40.2) gebe kalamamıştır (p=0.001).

**Tablo 14:** Gebelik Sonuçlarının Luteal Destek Protokolleriyle Karşılaştırılması

	<b>Gebelik</b>						<b>P</b>
	<b>Var</b>			<b>Yok</b>			
	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>±</b>	<b>%</b>	
<b>Estradiol</b>	124		52.3	186		71.0	<b>0.001</b>
<b>Sildenafil Sitrat</b>	113		47.7	76		29.0	



Olguların gebelik sonuçlarının luteal destek protokolleriyle karşılaştırılması Şekil 15'de gösterilmiştir. Gebelik görülen olguların 124 (%25)'üne luteal destek için progesterone ek olarak Estradiol verilmiş, 113 (%23)'üne ise Sildenafil sitrat verilmiştir. Gebelik izlenmeyen olguların ise 186 (%37)'sına Estradiol verilmişken, 76 (%15)'sına Sildenafil sitrat verilmiştir.



**Şekil 15:** Gebelik Sonuçlarının Luteal Destek Protokolleriyle Karşılaştırılması

Tüm hastaların genel özellikleri uygulanan protokollere göre Tablo 15'de kıyaslanmıştır. Antagonist protokol uygulanan hastaların ortalama yaşı  $35.1 \pm 0.3$  yıl iken, long protokolu uygulananları ise  $30.7 \pm 0.3$  olarak hesaplanmıştır ( $p=0.001$ ). Her iki grup için hastaların eşlerinin yaşları karşılaştırıldığında antagonist uygulananları  $32.8 \pm 0.3$  yıl iken, diğer gruptakilerin  $34.5 \pm 5.0$  ile istatistiksel anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p=0.001$ ). İnfertilite süresi antagonist grupta  $8.9 \pm 0.2$  yıl, diğer grupta  $8.6 \pm 0.3$  yıl idi ( $p=0.56$ ). Her iki grup hormon profili açısından karşılaştırıldı. Antagonist ve long protokol uygulanan gruptaki hormon profili sırasıyla FSH  $9.3 \pm 0.5$  U/ml,  $6.6 \pm 0.2$  U/ml ( $p=0.002$ ), LH  $7.6 \pm 0.5$  U/ml,  $5.5 \pm 0.3$  U/ml ( $p=0.02$ ), E2  $65.1 \pm 5.3$  pg/dl,  $51.0 \pm 4.6$  pg/dl ( $p=0.12$ ), PRL  $16.2 \pm 0.6$

ng/ml,  $16.7 \pm 0.8$  ng/ml ( $p=0.68$ ) ve TSH  $1.8 \pm 0.1$  U/ml,  $1.7 \pm 0.1$  U/ml ( $p=0.43$ ) idi. Tedavi süresi antagonist kullanılanlarda  $10.4 \pm 0.1$  gün iken, diğer grupta  $10.8 \pm 0.1$  idi ( $p=0.001$ ). Toplam kullanılan gonadotropin dozu antagonist protokol uygulananlarda anlamlı olarak ( $p=0.001$ ) daha yüksek bulundu ( $3965$  üniteye karşın  $2796$  ünite). Elde edilen toplam oosit sayısı ( $9.2 \pm 0.4$ 'e karşı  $14.8 \pm 0.5$ ) ve MII oosit sayısı ( $6.6 \pm 0.3$ 'e karşı  $11.3 \pm 0.4$ ) antagonist uygulanan grupta anlamlı olarak daha düşük idi ( $p=0.001$  ve  $p=0.001$ ). Her iki grup fertilizasyon oranı ( $68.5 \pm 1.2$ 'e karşı  $67.2 \pm 1.6$ ) açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0.54$ ). Gruplardaki ET sayısı ise retrospektif olarak  $2.4 \pm 0.1$  ve  $3.0 \pm 0.1$  ( $p=0.001$ ) idi.

**Tablo 15:** Tedavi Protokolüne Göre Vakaların Karşılaştırılması

	Antagonist			Long Agonist			P
	Ort	±	SEM	Ort	±	SEM	
<b>Yaş (yıl)</b>	35.1		0.3	30.7		0.3	<b>0.001</b>
<b>Eşinin Yaşı (yıl)</b>	32.8		0.3	34.5		5.0	<b>0.001</b>
<b>İnfertilite Süresi (yıl)</b>	8.9		0.2	8.6		0.3	0.56
<b>FSH (U/ml)</b>	9.3		0.5	6.6		0.2	<b>0.002</b>
<b>LH (U/ml)</b>	7.6		0.5	5.5		0.3	<b>0.02</b>
<b>E2 (pg/dl)</b>	65.1		5.3	51.0		4.6	0.12
<b>Prolaktin (ng/ml)</b>	16.2		0.6	16.7		0.8	0.68
<b>TSH (U/ml)</b>	1.8		0.1	1.7		0.1	0.43
<b>Tedavi süresi (Gün)</b>	10.4		0.1	10.8		0.1	<b>0.001</b>
<b>Toplam Gonadotropin Dozu (Unite)</b>	3965		92	2796		94	<b>0.001</b>
<b>Oosit Sayısı (n)</b>	9.2		0.4	14.8		0.5	<b>0.001</b>
<b>MII Oosit Sayısı (n)</b>	6.6		0.3	11.3		0.4	<b>0.001</b>
<b>Fertilizasyon (%)</b>	68.5		1.2	67.2		1.6	0.54
<b>ET Sayısı</b>	2.4		0.1	3.0		0.1	<b>0.001</b>

## 5. TARTIŞMA

Tekrarlayan in vitro fertilizasyon başarısızlığı, ardışık üç veya daha fazla IVF/ICSI ET siklusunda toplam 10 adet morfolojik olarak iyi kalitede embriyonun anatomik olarak normal yapıya sahip uterusu transferini takiben gebelik oluşmaması olarak kabul edilmektedir [8]. Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının etyolojisi aydınlatılamamıştır ve sorunun muhtemelen tek bir nedeni yoktur. O nedenle ki, çiftlerin üç veya daha fazla başarısız deneme sonrası immunolojik, anatomik, genetik ve diğer faktörler açısından tekrar değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Gebelik oluşum mekanizmaları tek bir parametre ile açıklanamayacak kadar karmaşık olaylar dizisidir. Tekrarlayan gebelik başarısızlıklarında belirlenebilen tek bir mekanizmadan söz etmek imkansızdır. Gebelik oluşturması beklenen embriyonun bozulmuş genetik yapısı, yumurta gelişimi sırasında kullanılan ilaç protokollerinin uygun olmaması, embriyonun geliştiği kültür ortamlarının yeterli olmaması, embriyo dış zarının kalınlaşması gibi embriyoya ait nedenler birer sebep olabilir. Endometriumu etkileyen doğumsal uterus bozuklukları, kavitede embriyonun tutunmasını engelleyen polip, miyom, daha önceki enfeksiyon veya küretajlara bağlı yapışıklıklar, embriyonun rahim içinde tutunup büyümesini etkileyen pıhtılaşma fonksiyon bozuklukları, yüksek kalitede de olsa gelişen embriyonun tutunup büyümesini engelleyebilen diğer faktörlerdir.

Üreme performansının yetersizliklerinde immunolojik faktörlere önemli bir pay biçilmesine rağmen, ne yazık ki alloimmun nedenleri tanıyabilen bir tanı testi yoktur. Her ne kadar habituel abortusları olan hastalarda bakılan MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) supresyon testi, anti-paternal lenfosit antikorlar (komplement bağımlı mikrositotoksitesite testi, flow cytometry crossmatch(FCXM)) gibi testler alloimmun hastalıkların araştırılmasında kullanılsa da bunların tanı koymadaki başarıları yüksek değildir [137]. Ayrıca oldukça yüksek sayıdaki kanıtlar [138,139], NK hücre aktivitesinin tekrarlayan düşüklerde arttığını göstermiştir. Bu nedenle ki fonksiyonel veya kantitatif NK hücre aktivitesi ölçümleri gebelik prognozunu ve

tedavisini monitorize etmekte kullanılmıştır [140,141]. Hayakawa ve ark.ları ise yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna kıyasla tekrarlayan implantasyon başarısızlığı veya düşüğü olan hastalarda Th1 (IFN $\gamma$  üreten CD4 hücreleri) / Th2 (IL 4 üreten CD4 hücreleri) oranının arttığını bildirmiştir [142]. Anti-kardiyolipin ve anti-nükleer antikorlar ve dolaşımdaki anti-paternal lenfosit antikorlar da alloimmun hastalıkları araştırmada kullanılabilen diğer parametreler arasında sayılabilir. Ancak bütün bu tanısal modalitelere karşı tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda immunolojik tanı için rutin kullanılabilen herhangi bir test yoktur.

Başarılı bir gebelik immunolojik olarak tam bir paradoks oluşturur. Fetus anne için semiallograft olmasına karşın gebelikte 280 gün boyunca anne tarafından sorunsuz bir şekilde vücutta taşınır. İmmünolojik faktörler tekrarlayan düşük veya IVF başarısızlıklarında ana etmenlerden biri olarak suçlanmıştır [143]. İmmun sistemin kapasitesini, temel immunité ve inflamasyon kuralları çerçevesinde kendinden olmayan antijenleri tanıyarak tahrip etmek oluşturur. Gebelik veya implantasyon sırasında paternal antijenler vücut için yabancıdır. Bu nedenle maternal immunité semiallojenik fetusu tolere etmeli ve implantasyona izin vermelidir. Ekstravillöz trofoblastlarda MHC'nin ekspres olmaması [144], Th1 ve Th2 sitokin dengesinin Th2 yönüne kayması ve Th1 sitokin profilinin gebelik süresince baskılanması [145] ve NK aktivitesinin azalması [146] gibi koruyucu mekanizmalar fetusun yabancı olarak tanınıp red edilmesini engeller. Sağlıklı bir gebeliğin oluşumu ve devamı maternal ve fetal hücreler arasında uyumlu bir ilişkiyi gerektirir. Her iki taraf da annenin fetusa karşı, fetusun de anneye karşı toleransını sağlayacak mekanizmalar geliştirir. Maternal immün sistem siklik değişiklikler gösterir [143]. İmplantasyondan itibaren oluşan karşılıklı tolerans mekanizmaları ve bu siklik değişiklikler ile fetusun atılmasının önüne geçilir. Bu mekanizmalardaki bozukluklar fetusun immunolojik olarak yabancı kabul edilmesini ve implantasyon başarısızlığına veya tekrarlayan düşüklere neden olabilir.

İmmünolojik ve immunofenotipik kanıtlar, açıklanamayan tekrarlayan implantasyon başarısızlığında lokal ve periferal NK hücre aktivasyonu ve Th1 dominansının rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Bu tür vakalarda immunoterapinin tedavi başarısına olumlu katkı sağlayacağı öne sürülmüştür. Az sayıda hasta içeren ilk çalışmalarda IVIG ile değişen oranlarda başarı bildirilmişse de daha sonra çift kör prospektif randomize plasebo kontrollu bir çalışmada canlı doğum oranında bir artış

gösterilememiştir [147,148]. Daha sonra yapılan ön çalışmalarda IVIG ve anti-TNF $\alpha$  (Infliximab) tedavinin gebelik başarı oranlarını arttırdığı bildirilmiştir [149]. Yine de tekrarlayan IVF başarısızlığında IVIG uygulamasının faydası tartışmalıdır. Plasebo kontrollü bir Kanada çalışmasında tekrarlayan IVF başarısızlığında IVIG tedavisinin canlı doğum oranlarını arttırmadığını ortaya konulmuştur [148]. Daha sonra ASRM, yayınladığı pratik bültende IVIG'in deneysel bir tedavi olduğunu ve sadece bilgilendirilmiş onam veren hastalara, ancak etik kurul onayı çıktıktan sonra uygulanabileceğini bildirmiştir [150]. Başka bir anti-TNF $\alpha$  olan Etanercept'in tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda TNF- $\alpha$  ve Th1 embriyotoksik sitokinleri salgılayan aktive NK hücrelerini suprese edip gebelik oranlarına olumlu etki yaptığı bildirilmiştir [151].

Gebeliklerin en büyük komplikasyonlarından biri olan spontan düşüklerin nedenleri arasında anne ile fetus arasındaki immunolojik sapmanın yer aldığı gösterilmiştir [136]. Geçmişte transfüzyon yapılmış olan transplant hastalarında allograft organ rejeksiyonu oranlarının daha düşük olduğu görülmüştür. Bu bulguyla hareketle paternal lenfosit immunizasyonu yapılan kişilerde semiallograft olarak kabul edilen gebelik başarısının yüksek olduğu gösterilmiştir [152]. Taylor ve Faulk [153] açıklanamayan düşükleri olan hastalarda ilk defa paternal lenfosit immunizasyonunu uygulanabileceğini bildirdikleri tarihten itibaren bu yöntem alloimmun nedenli düşüklerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialist Group (RMITG) 1994 yılında 9 randomize çalışmayı alarak paternal lenfosit immunizasyonun etkinliğini değerlendirmişlerdir [154]. Bu çalışmada canlı doğum oranı 1.16 (%95 CI, 1.01-1.34) olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında IVIG tedavisini önerenlerde olmuştur. Her iki tedavinin etkinliği tartışmalıdır [136].

Birçok immunolojik problem tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında sebepler arasında yer almaktadır. Birebir aynı mekanizma ile olmasa da habituel abortuslarda da bazı immunolojik sebepler suçlanmıştır. Tekrarlayan düşüğü olan hastalara lenfosit immunoterapisinin fayda sağladığı çeşitli çalışmalar ile [136,155,156] gösterilmiştir. Clark ve Chaouat'un hayvan çalışmaları sonrası paternal lenfosit immunizasyonu insanlarda kullanılmaya başlanmıştır [157]. Bu çalışmalarda araştırmacılar CBA/J dişi fareleri, DBA/2 erkek farelerin lenfositleriyle aşıladıktan sonra DBA/2 tip farelerle çiftleştirerek rekürren spontan düşüklere olan eğilimi azaltmışlardır. Tekrarlayan düşükleri önlemede paternal lenfosit immunizasyon

tedavisinin anahtar rolü, Th2 aktivitesini uygun bir şekilde restore etmesidir [142,158]. Aynı zamanda bazı idiyopatik infertilite vakalarında Th2 hipoaktivitesinin suçlanması gerçeği, paternal lenfosit immunizasyonunun bu tür hastalarda da terapötik bir öneri olarak sunulmasını sağlamıştır [159-161]. Paternal lenfosit immunizasyonunun bazı immunolojik değişiklikleri düzelterek sonraki gebelik başarısını arttırdığına inanılmaktadır [145]. Çalışmalarda paternal lenfosit immunizasyonunun olumlu immunosit değişiklikleri yaparak [162] ve sitokin dengesini Th2 aktivitesi yönüne kaydırarak [142,158] etki ettiği gösterilmiştir. Yakın zamanda Gafter ve ark.ları paternal lenfosit immunoterapisi uygulanan kadınların monosit kültürlerinde IL-6 düzeyinin düştüğünü bildirmişlerdir [163]. Bazı in vitro çalışmaları düşük doz IL-6'nın asimetrik antikor sentezini stimüle ettiğini göstermiştir. Bu çalışmalar IL-6'nın trofoblastlarda plasental antijeni (R80K) [164] ve NK hücrelerini [165] bloke eden asimetrik antikorların sentezini regüle ettiğini ortaya çıkarmıştır. Lenfosit immunizasyonu yapılan kadınlarda CD8<sup>+</sup> αβ hücrelerinin CD4<sup>-</sup> ve CD8<sup>-</sup> hücrelerine dönüştürdüğü ve ayrıca bunlardan bağımsız olarak IL-4 ve IL-10 üretimini artırarak NK hücre aktivasyonunu, karşıt inflamasyonu ve alloantikor formasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [166,167].

Bir çok data paternal lenfosit immunoterapisinin implantasyon sonrası immuno-modulatuar proteinleri stimüle ettiğini speküle etmiştir. Ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Paternal lenfosit immunizasyonunun APCA (anti-paternal sitotoksik antikor) [168], Ab2 (anti-idiotypic antibodies) [169], MLR-Bf (mixed lymphocyte reaction blocking antibodies) [170] ve progesteronun indüklediği blokan faktörlerin (PIBf) [171] ekspresyonunu artırarak etki ettiği bildirilmiştir. Bu faktörler NK hücrelerinin aşırı aktivitesini inhibe edip Th2'de kayma yaparak fetusu annenin immun sisteminin toksik etkilerinden korur ve başarılı bir gebelik sağlar [123]. Yakın zamanlı bazı çalışmalarda paternal lenfosit immunizasyonunun NK hücre aktivitesinin azalmasına bağlı Th1 tip reaktiviteden Th2 tip reaktiviteye geçişi artırarak etkili olduğu iddia edilmiştir [142]. Paternal lenfosit immunizasyonu en az 2 defa IVF-ET uygulanıp başarısız olan vakalara önerilmektedir. Li ve ark.larının 36 vakalık çalışmalarında paternal lenfosit immunizasyonu yapılan ve daha önceki IVF tedavilerinde başarısız sonuçları olan vakalarda gebelik oranı %89.6 [172] iken, Check ve ark.larının 37 vakalık ön çalışmalarında paternal lenfosit immunizasyonu uygulanan böyle vakalarda gebelik oranını %70.3 olarak saptamışlardır. Kontrol

grubunda ise bu oran %45.9 da kalmıştır. Canlı doğum oranı ise çalışma grubunda %51.3, kontrol grubunda ise %16.2 olarak bildirilmiştir [173]. Yukarıdaki küçük çaplı araştırmalarda yüksek gebelik oranlarının aksine bizim geniş serili çalışmamızda gebelik oranı %48 olarak saptandı. Bu grupta en az 2 defa IVF-ET yapılan hastalar olduğu göz önünde bulundurulduğu taktirde bu oranın düşük olmadığı görülür. İlk iki çalışma sadece pilot çalışma niteliğindedir ve vaka sayıları oldukça yetersizdir.

Üçten fazla başarısız IVF siklusu olan 686 hastada allojenik lökosit immunizasyonu uygulamasını retrospektif olarak değerlendiren bir çalışmada immunizasyondan sonra 6 ay süren geçici bir olumlu etki bildirilmiştir [174]. Ancak çalışmanın tasarımı nedeniyle sonuçlar dikkatli yorumlanmalıdır. Tekrarlayan IVF başarısızlığı vakalarında partnerin lökositleri ile immunizasyon yapılan benzer bir çalışmada olumlu bir etki gösterilememiştir [175]. Tekrarlayan IVF başarısızlığı vakalarında prospektif randomize bir çalışma bulunmamakla beraber tekrarlayan abortus vakalarında yapılan prospektif randomize bir çalışmada allojenik lökosit izoimmunizasyonunun faydalı bir etkisi gözlenmemiştir [176]. Tekrarlayan düşüğü olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada lenfosit immunoterapisi alan grupta tekrar düşük olma oranı %26 iken, sadece progesteron verilen kontrol grubunda bu oran %57.1 olarak saptanmıştır [156]. Bu çalışma ile immunoterapinin yalnız başına progesteron tedavisinden çok daha etkin olduğu kanıtlanmıştır.

Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialist Group (RMITG)'un 1994 yılında [154] yaptığı derlemeye zıt olarak 1999 yılında Ober [176] tarafından geniş bir multisentrik çalışma yayımlanmıştır. Burada tekrarlayan düşüğü olan 91 kadına paternal mononükleer hücre transferi (çalışma), 92 kadına ise steril salin (kontrol) uygulanmış ve çalışmayla kontrol grubu arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Hatta immunize edilen grupta başarılı ve devam eden gebelik oranı daha düşük saptanmıştır. Bunun üzerine bu grup paternal lenfosit immunizasyonun gebelik başarısını etkilemediğini ve önerilmemesi gerektiğini vurgulamıştır. Daha sonra Scott tarafından [177] yapılan analizde de tıpkı Ober ve ark.larının vurguladığı gibi paternal lenfosit immunizasyon tedavisinin plaseboya bir üstünlüğünün olmadığı öne sürülmüştür. Bu yayınlar oldukça tartışmalı bulunmuştur. Bir çok grup tarafından her iki çalışmada da bir takım problemlerin olduğu ileri sürülmüştür. Birincisi örneklem büyüklüğünün lenfosit immunizasyon grubunda küçük olduğu, ikincisi ise anti-

nükleer antikor pozitif olan hastaların çalışma dışı bırakılmadığıdır [178]. Üçüncü bir tartışmalı konu ise immunize edilen 7 hastada karyotip anomalisi bulunması ve bunların çalışmaya dahil edilmesidir. Ek olarak bu çalışmalarda yapılan immunizasyon metoduda da tartışmalı bulunmuştur. Intention to treat meta-analizlerinde ek bir canlı doğum elde etmek için paternal lenfosit immunizasyonu yapılması gereken hasta sayısı 11.2 olarak hesaplanmıştır [179]. Açık ve kesin bir yargıya varana kadar paternal lenfosit immunizasyonunun tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olanlarda tartışmalı bir tedavi modalitesi olacağı üzerinde durulmuştur [178].

Check ve ark.larının tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan vakalarını randomize edip bir gruba paternal lenfosit immunizasyonu yaptıkları retrospektif çalışmalarında; aşılana grupta (n=94) transfer edilen embriyo başına canlı doğum oranı %30.8, diğer grupta (n=98) ise %19.7 ile anlamlı olarak (p=0.02) yüksek gebelik oranı elde etmişlerdir [180]. Bu çalışma ile lenfosit immunoterapisinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda umut vaat eden bir tedavi olduğu vurgulanmış, ancak bunun için geniş serilere ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir.

Paternal lenfosit immunizasyonu yapıldıktan 12 ay sonra gebelik elde edilememesi işlemin başarısız olduğu anlamına gelir [123]. Ancak birçok yayında tartışmalı olan nokta işlemin sadece gebelikten önce uygulanmış olmasıdır. Halbuki paternal lenfosit immunizasyonu 2-4 haftalık aralıklarla gebelik öncesi düzenli olarak ve birkaç kez de gebelik esnasında uygulanması gerekir. Ancak bu şekilde uygulanmış olmasına rağmen gebelik oluşmazsa işlemin başarısız olduğuna karar verilir. Maejima ve ark.ları paternal lenfosit kullanılarak yapılan immunoterapiyi sadece gebelik öncesi ve gebelik elde ettikten sonra da uygulanan hastalar olmak üzere iki gruba randomize ettikleri çalışmalarında daha başarılı sonuçların ikinci grupta olduğunu saptamışlardır [181]. Carp ve ark.ları da serokonversiyonu sağlamak için destekleyici ilave dozların gerekli olduğunu vurgulamıştır [182]. Pandey ve ark.ları da lenfosit immunoterapisinin etkinliğinin gebelik öncesi ve gebelik sırasında yapıldığında daha fazla olduğunu bildirmiştir [123]. Aynı araştırmacılar ayrıca paternal lenfosit immunizasyonu yapılan hastalarda serokonversiyonun (APCA, MLR-Bf, NK hücre aktivitesinin supresyonu, Th1'den Th2 reaktiviteye geçiş, Ab2, PIBf vb.nin) pozitifleşmesinin tedavinin başarısına işaret edebileceğini speküle



etmişlerdir. Benzer şekilde Gafter ark.ları [163] da 9 seropozitif alloimmun kadından 7'sinin gebe kaldığını ve canlı doğum yaptığını bildirmiştir. Bazı araştırmacılar ise preimmunize kadında otoimmun antikor (anti-nükleer antikor, anti-fosfolipid antikor) veya alloimmun antikor (APCA, Ab2, MLR-Bf) pozitifliği varlığında immunoterapi başarısının ilginç bir şekilde düşük olduğunu yayınlamışlardır [183,184].

Paternal lenfosit immunizasyonunda başarının doz bağımlı olduğu ileri sürülmüştür. Koruyucu optimal etki için tek enjeksiyonda en az  $100 \times 10^6$  veya  $>100 \times 10^6$  hücre verilmesi gereklidir [123]. İmmunoterapide uygulanan lenfosit sayısı kritik önem taşır.  $60-150 \times 10^6$  dan düşük lenfosit transferinde suboptimal etki oluşur, karşıt olarak aşırı lenfosit uygulaması ( $>500 \times 10^6$ ) da etkili olmayabilir [185,186]. Biz çalışmamızda sadece intradermal uygulamayı kullandık. Benzer şekilde çalışmalarda intradermal veya intravenöz yolun başarı üzerine daha fazla etki ettiği, buna karşın subkutan, intrakutan ve intramuskuler uygulamalarda başarının daha az olduğu bildirilmiştir.

Amerika İlaç ve Gıda Dairesi Başkanlığı hücre ve hüresel ürünlerin insanlara uygulanmasını sadece klinik araştırma projelerinin bir parçası olarak tavsiye etmektedir. FDA'nın tavsiye niteliğindeki bu bildirisinden sonra ABD'de paternal lenfosit immunizasyonunun kullanımı durmuştur. Buna karşın Japonya'da üniversite kliniklerinin %80'inde bu yöntem tedavilere yardımcı olarak kullanılmaktadır [136]. Alloimmunizasyonun yan etkileri seyrek, ancak bu tedavinin transfüzyon reaksiyonu, graft versus host reaksiyonu, Hepatit B ve HIV gibi viral enfeksiyonların transmisyonu gibi potansiyel riskleri vardır. Paternal lenfosit immunizasyonunun bildirilen en önemli yan etkisi ciltte oluşan graft versus host benzeri reaksiyondur. Yetmiş vakalık seride 1 vakada böyle bir reaksiyon bildirilmiştir [187]. Ciltte oluşan bu doku reddi reaksiyonunu önlemenin yolu uygulama öncesi hücrelerin ışınlanmasıdır. Bizim 500 vakalık serimizde buna benzer bir reaksiyona rastlanmadı. Ayrıca anaflaksi, lokal veya sistemik enfeksiyon görülmedi. Sadece 2 hastada ilk uygulama sonrası 37.5 dereceyi geçmeyen ve kendiliğinden düzelen subfebril ateş görüldü. Yine de bu reaksiyona özel bir ilgi göstermek gerekir, çünkü bu fenomen hayatı tehdit edici olabilir. İşlemin hastane koşullarında yapılması hayati önem taşır. Viral hastalıkların transfer riski ise detaylı bir serolojik tarama ile önlenir. Bizim serimizde herhangi bir viral geçiş ve benzeri bir komplikasyon görülmedi.

Ayrıca paternal lenfosit immunizasyonu yapılan kadınlarda ikiz gebelik, erken doğum, intrauterin gelişme geriliği ve bazı konjenital anomaliler gibi çeşitli yan etkiler bildirilmiştir [176,188]. Fakat bu yan etkiler diğer geniş serilerde saptanmamıştır [189].

Paternal lenfosit immunizasyonun bildirilen diğer bir olumsuz etkisi ise aşılanan kadınların serumunda sperm antikorlarını arttırmasıdır. Yapılan bir çalışmada aşı uygulanan 10 kadından 7'sinde (%70) anlamlı bir şekilde sperm antikorlarının arttığı ve bunun ilerdeki gebe kalma üzerine olumsuz etki edebileceği speküle edilmiştir [190]. Ancak sonraki çalışmalarda anti sperm antikorlarının IVF/ICSI sonuçları üzerine olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir [191,192]. Güncel literatür verileri nedeniyle biz çalışmamızda anti sperm antikor baktırmaya gerek duymadık.

Lenfosit immunoterapisi maternal kanda HLA-alloantikorları üretir. Aslında bu antikorlar normal gebelikte de görülür ve fetus üzerine olumsuz bir etkisi yoktur [154]. İmmünoterapi sonrası doğan çocukta bu alloantikora bağlı olarak gelişmesi varsayılan durumların başında hemolitik hastalık, alloimmun trombositopeni ve alloimmun nötropeni gelir [193]. Fakat geniş serili meta-analizlerde bu sorunlarla karşılaşılmamıştır [154].

## 6. SONUÇ

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının etyolojisi aydınlatılamamıştır ve sorunun muhtemelen tek bir nedeni yoktur. O nedenle ki, çiftlerin üç veya daha fazla başarısız deneme sonrası immunolojik, anatomik, genetik ve diğer faktörler açısından tekrar değerlendirilmeleri gerekmektedir. Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan kadınlarda tıpkı tekrarlayan spontan düşük yapan vakalardaki gibi organ spesifik ve/veya organa spesifik olmayan otoantikörlerin arttığı bilinmektedir [194]. Bu antikörlerin implantasyon başarısızlığına neden olduğu net olarak ortaya konulamamıştır. Tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalara prednizolon, heparin ve aspirin yalnız başına veya immunoglobulinlerle (IVIG) kombine olarak ve paternal lenfositlerin kullanıldığı aktif immunoterapi gibi bir çok terapötik girişim kullanılmıştır. Ancak günümüzde IVF ile birlikte bu girişimlerin kullanılması deneysel modelde kalmıştır. Kontrollü randomize prospektif geniş serili vaka çalışmaları yetersizdir.

Bizim çalışmamız 500 vaka ile literatürdeki en geniş serili çalışma olacaktır. Bu çalışma ile tekrarlayan IVF başarısızlığı olan hastalarda paternal lenfosit immunizasyonu devam eden gebelik oranını %48'ler seviyesine çıkarmıştır. Standardize ve yaygın olarak uygulanabilen testler ve etkinliği kanıtlanmış tedavi yöntemleri olmadığından, tekrarlayan IVF başarısızlığında allojenik lenfosit izoimmunizasyonu ancak iyi tasarlanmış bir klinik çalışma koşullarında çiftlere önerilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Mosher WD, Pratt WF, Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56:192-193.
2. Steptoe PC, Edwards RG, Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366-369.
3. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL et al. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991;55:114-118.
4. Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM et al. Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod* 1996;11:2739-2745.
5. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2:307-321.
6. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R et al. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004;9:692-715.
7. Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E et al. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2504-2510.
8. 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.383-385.
9. Croxatto HB, Ortiz ME, Díaz S, Hess R et al. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 1978;132:629-634.
10. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992;58:537-542.
11. Check JH, Nowroozi K, Chase J, Nazari A et al. Comparison of pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer between the donors and

- the recipients in a donor oocyte program. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:248-250.
12. Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005;11:382-391.
  13. Emiliani S, Delbaere A, Devreker F, Englert Y. Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive. *Reprod Biomed Online* 2005;10:527-540.
  14. Tietze C, Reproductive span and rate of reproduction among Hutterite women. *Fertil Steril* 1957;8:89-92.
  15. Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A, The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:783-786.
  16. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD, Postovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Human Reproduction* 1998;13:394-397.
  17. Jordan J, Craig K, Clifton DK, Soules MR, Luteal phase defect: the sensitivity and specificity of diagnostic methods in common clinical use. *Fertil Steril* 1994;62:54-57.
  18. Miller PB, Soules MR, The usefulness of urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol* 1996;87:13-17.
  19. Martinez AR, Bernardus RE, Vermeiden JP, Schoemaker J, Time schedules of intrauterine insemination after urinary luteinizing hormone surge detection and pregnancy results. *Gynecol Endocrinol* 1994;8:1-4.
  20. Meyer WR, Smith PM, Clark MR, Cusmano LL, Fritz MA, Therapeutic cup insemination with cryopreserved donor sperm: prognostic value of cervical mucus score at insemination and the number of motile sperm in mucus at 24 Hours. *Fertil Steril* 1996;66:435-439.
  21. Wentz AC, Physiologic and clinical considerations in luteal phase defects. *Clin Obstet Gynecol* 1979;22:169-172.
  22. Wentz AC, Endometrial biopsy in the evaluation of infertility. *Fertil Steril* 1980;33:121-124.
  23. de Crespigny LC, O' Herlihy C, Robinson HP, ultrasonic observation of the mechanism of human ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:636-639.

24. Ecocard R, Marret H, Rabilloud M, Bradai R, Boehringer H, Girotto S, Barbato M, Sensitivity and specificity of ultrasound indices of ovulation in spontaneous cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;91:59-62.
25. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Stenkampf MP, Efficacy of treatment of unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998;70:207-210.
26. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril* 2012 May;97(5):1039-1043.
27. Scott Jr RT, Hofmann GE, Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1995;63:1-5.
28. Bukman A, Heineman MJ, Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:581-585.
29. Barroso G, Oehninger S, Monzo A, Kolm P, Gibbons WE, Muasher SJ, High FSH:LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3 : impact on follicular development and IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:499-502.
30. Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA, Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 2003;18:35-38.
31. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S, Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190-193.
32. Dzik A, Lambert-Messerlian G, Izzo VM, Soares JB, Pinotti JA, Seifer DB, inhibin-B response to EFORT is associated with the outcome of oocyte retrieval in the subsequent in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 2000;74:1114-1117.
33. Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J, Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003;18:1422-1427.
34. Ranieri DM, Phopong P, Khadum I, Meo F, Davis C, Serhal P, Simultaneous evaluation of basal FSH and estradiol response to GnRH analogue (F-G test) allows effective drug regimen selection for IVF. *Hum Reprod* 1996;11:1393-1396.
35. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R, Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT) : A simple and reliable screening test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994;9:1607-1609.

36. Fabreques F, Balasch J, Creus M, Carmona F, Puerto B, Quinto L, Casamitjana R, Vanrell JA; Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:13-16.
37. Nikolaou D, Templeton A, Early ovarian ageing: a hypothesis: detection and clinical relevance. *Hum Reprod* 2003;18:1137-1139.
38. Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP, Serum anti-mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17: 3065-3068.
39. Leach RE. Intensive hormone monitoring in women with unexplained infertility: evidence for subtle abnormalities suggestive of diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 1997;68:413-420.
40. Seoud MA, Patterson R, Muasher SJ, Coddington CC, 3rd. Effects of myomas or prior myomectomy on in vitro fertilization (IVF) performance. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:217-221.
41. Stovall DW, Parrish SB, Van Voorhis BJ, Hahn SJ, Sparks AE, Syrop CH. Uterine leiomyomas reduce the efficacy of assisted reproduction cycles: results of a matched follow-up study. *Hum Reprod* 1998;13:192-197.
42. Yaralı H, Bükülmez O. The effect of intramural and subserous uterine fibroids on implantation and clinical pregnancy rates in patients having intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266:30-33.
43. Anania CA, Stewart EA, Quade BJ, Hill JA, Nowak RA. Expression of the fibroblast growth factor receptor in women with leiomyomas and abnormal uterine bleeding. *Mol Hum Reprod* 1997;3:685-691.
44. Pabuccu R, Ceyhan ST, Onalan G, Goktolga U, Ercan CM, Selam B. Successful treatment of cervical stenosis with hysteroscopic canalization before embryo transfer in patients undergoing IVF: a case series. *J Minim Invasive Gynecol* 2005;12:436-438.
45. Mastrominas M, Pistofidis GA, Dimitropoulos K. Fertility Outcome after Outpatient Hysteroscopic Removal of Endometrial Polyps and Submucous Fibroids. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3:S29.
46. Lass A, Williams G, Abusheikha N, Brinsden P. The effect of endometrial polyps on outcomes of in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:410-415.
47. Heinonen PK, Kuismanen K, Ashorn R. Assisted reproduction in women with uterine anomalies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;89:181-184.

48. Garcia-Velasco JA, Arici A. Surgery for the removal of endometriomas before in vitro fertilization does not increase implantation and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2004;81:1206-1209.
49. Veeck LL. The morphological estimation of mature oocytes and their preparation for insemination. In Jones HW Jr, Jones GS, Hodgen GD, Rosenwaks Z, (eds), *In Vitro Fertilization-Norfolk*. Baltimore: Williams&Wilkins 1986;81-86.
50. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO 2002;102-125.
51. Stadtmayer L, Ditkoff EC, Session D, Kelly A, High dosages of gonadotropins are associated with poor pregnancy outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1994;61:1058-1061.
52. Land JA, Yarmolinskaya MI, Dumoulin JC, Evers JL, High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1996;65:961-964.
53. Schatcher M, Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Bern O, Ron-el R, Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase - a function of improved embryo quality. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:197-200.
54. Pinkas H, Orvieto R, Avrech OM, Rufas O, Ferber A, Ben-Rafael Z, Fisch B, Gonadotropin stimulation following GnRH -a priming for poor responders in invitro fertilization - embryo transfer programs. *Gynecol Endocrinol* 2000;14:11-12.
55. Padilla SL, Dugan K, Maruschak V, Shalika S, Smith RD, Use of the flare-up protocol with high dose human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotrophins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril* 1996;65:796-799.
56. Surrey ES, Bower J, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW, Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:419-421.
57. Copperman AB, Antagonists in poor-responder patients. *Fertil Steril* 2003;80 (suppl I): S16-18.
58. Fahy UM, Cahill DJ, Wardle PG, Hull MG, In-vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum Reprod* 1995;10:572-575) (Ng EH , Chui DK, Tang OS, Lau EY, Yeung WS, Chung HP, In vitro fertilization and embryo transfer during natural cycles. *J Reprod Med* 2001;46:95-98.



59. Ingerslev HJ, Hojgaard A, Hindkjaer J, Kesmodel U, A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. *Hum Reprod* 2001;16:696-699.
60. Diamond MP, Hill GA, Webster BW, Herbert CM, Rogers BJ, Osteen KG, Maxson WS, Vaughn WK, Wentz AC, Comparison of human menopausal gonadotropin, clomiphene citrate, and combined human menopausal gonadotropin-clomiphene citrate stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1108-1111.
61. Corfman RS, Mila MS, Bellavance TL, Ory SC, Erickson LD, Ball GD, A novel ovarian stimulation protocol for use for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1993;60:864-867.
62. Dor J, Ben Shlomo, Levran D, Rudak E, Yunish M, Mashiach S, The relative success of gonadotropin-releasing hormone analogue, clomiphene citrate, and gonadotropin in 1099 cycles of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992;58:986-989.
63. Edwards RG, Lobo R, Bouchard P, Time to revolutionize ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1996;11:917-920.
64. Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, Schats R, Bernards JM, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J, Dose-finding study of triptorelin acetate for prevention of a premature LH surge in IVF : a prospective randomized, double blind, placebo-controlled study. *Hum Reprod* 2000;15:2333-2336.
65. Hughes EG, Federkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA, The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: meta-analysis of randomised controlled trial. *Fertil Steril* 1992;58:888-891.
66. Daya S, Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;CD001299.
67. Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay AL, Huynh D, Kempton W, Timing of initiation and dose schedule of leuprolide influence the time course of ovarian suppression. *Fertil Steril* 1998;50:400-403.
68. Urbancsek J, Witthaus E, Midluteal buserelin is superior to early follicular phase buserelin in combined gonadotropin-releasing hormone analog and gonadotropin stimulation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:966-969.
69. Ron-El R, Hermann A, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E, Gonadotropins and combined gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropins protocols in a randomized prospective study. *Fertil Steril* 1991;55:574-577.

70. Keltz MD, Jones EE, Duleba AJ, Polcz T, Kennedy K, Olive DL, Baseline cyst formation after luteal phase gonadotropin-releasing hormone agonist administration is linked to poor in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:568-517.
71. Segal S, Shifren JL, Isaacson KB, Leykin L, Chang Y, Pal L, Toth TL, Effect of a baseline cyst on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1999;71:274-277.
72. Rizk B, Tan SL, Kingsland C, Steer C, Mason BA, Campbell S, Ovarian cyst aspiration and the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;54:661-664.
73. Balasch J, Vidal E, Penarrubia J, Casamitjana R, Carmona F, Creus M, Fabregues F, Vanrell JA, Suppression of LH during ovarian stimulation ; analysing threshold values and effects ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod* 2001;16:1636-1639.
74. Oliveira JB, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Borges MC, Frango JG, Jr., Endometrial ultrasonography as a predictor of pregnancy in an in vitro fertilization programme after ovarian stimulation and gonadotropin-releasing hormone and gonadotrophins. *Hum Reprod* 1997;12:2515-2518.
75. Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, Olivennes F, de Ziegler D, Frydman R, New look at endometrial echogenicity : objective computer- assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization - embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;74:274-277.
76. Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Cuuzinet B, Schaison G, Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:820-823.
77. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R, The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002; 8:279-282.
78. Ludwig M, Felberbaum RE, Devroey P, Albano C, Riethmuller-Winzen H, Schuler A, Engel W, Diedrich K, Significant reduction of the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) by using the LHRH antagonist Cetrorelix (cetrotide) in controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 2000;264:29-32.
79. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K, Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:175-178.
80. de Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, Mannaerts BM, Coelingh Bennink HJ, Fauser BC, Dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-

- stimulating hormone (Puregon) and various doses of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (orgalutran/antagon). *Fertil Steril* 2001;75:688-691.
81. The Ganirelix Dose-finding study group, A double blind , randomized,dosefinding study to assess the efficacy of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Hum Reprod* 1998;13:3023-3026.
  82. Albano C, J, Camus M, Riethmuller-Winzen H , Siebert-Weigel M, Diedrich K, Van Steirteghem AC, Devroey P, Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997;67:917-920.
  83. Ludwig M , Katalinic A, Banz C, Schroder AK, Loning M, Weiss JM, Diedrich K, Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF : results of a prospective , randomized study. *Hum Reprod* 2002;17:2842-2845.
  84. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R, The use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist (cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer : a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod* 1998;13:2411-2414.
  85. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smits J, Van Steirteghem A, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant folliclestimulating hormone, gonadotropin-releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025–1029.
  86. Bungum L, Bungum M, Humaidon P, Anderson CY. The predictive value of sperm chromatin structure assay parameters for the outcome of IUI, IVF, ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401-1408.
  87. Schlafke S, Enders AC: Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *BiolReprod* 1975;12:41-65.
  88. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA et al. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril* 2003;79:970-974.
  89. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones Hw Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999;14(Suppl) 2: 99-106.
  90. Turpeenniemi Hujanen T, Freinbirg R, Kauppile A. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995;64:132-136.

91. Sherwin JRA and Sharkey AM. Regulation of embryo-endometrial interactions at implantation. *Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Parthenon Publications Group 2005;3:405-419.
92. Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L et al. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999;14:515-520.
93. Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E et al. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril* 2007;87:1015-1021.
94. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359:76-79.
95. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC et al. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997;12:569-574.
96. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-687.
97. Gilmore AP, Burridge K. Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* 1996;4:647-651.
98. von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C et al. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril*. 2001;76:775-81.
99. Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* 2003;68:809-815.
100. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
101. Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol Hum Reprod* 2000;6:935-941.
102. Dorn C, Reinsberg J, Kupka M, van der Ven H et al. Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 concentrations in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet* 2003;268:187-193.
103. Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res* 1988;15;48:5624-5637.

104. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L et al. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:3259-3263.
105. Hock DL, Huhn RD, Kemmann E. Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation. *Hum Reprod* 1997;12:2143-2146.
106. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J et al. Detection of granulocyte colonystimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 2004;81:786-791.
107. Gargiulo AR, Fichorova RN, Politch JA, Hill JA et al. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil Steril* 2004;82:1226-1234.
108. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. The ineffective loading process of the embryo transfer catheter alters implantation and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2001 Sep;76(3):630–632.
109. Sadek S., Sallam H., and Agemeya A., Does difficult embryo transfer affect the results of IVF and ICSI - a meta analysis of controlled studies. *Fertil Steril* 2004. 81(Suppl3): p. S22-25.
110. Barri PN. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000 Mar;15(3):616–620.
111. Martinez F, Coroleu B, Parriego M, Carreras O, Belil I, Parera N, HereterL, Buxaderas R, Barri PN. Ultrasound-guided embryo transfer: immediate withdrawal of the catheter versus a 30 second wait. *Hum Reprod* 2001;16(5):871–874.
112. Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., et al., Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*, 1999. 14(9): p. 2345-2349.
113. Gardner D.K., Lane M., Stevens J., et al., Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73(6): p. 1155-1158.
114. Blake D., Proctor M., Johnson N., et al., Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2002(2): p.CD002118.
115. Levitas E., Lunenfeld E., Har-Vardi I., et al., Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004;81(3): p. 567-571.

116. Cruz J.R., Dubey A.K., Patel J., et al., Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple in vitro fertilization failures? *Fertil Steril* 1999;72(2): p. 218-220.
117. Barrenetxea G., Lopez de Larruzea A., Ganzabal T., et al., Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril* 2005;83(1): p. 49-53.
118. Phillips S.J., Dean N.L., Buckett W.M., et al., Consecutive transfer of day 3 embryos and of day 5-6 blastocysts increases overall pregnancy rates associated with blastocyst culture. *J Assist Reprod Genet* 2003;20(11): p. 461-464.
119. Loutradis D., Drakakis P., Dalianidis K., et al., A double embryo transfer on days 2 and 4 or 5 improves pregnancy outcome in patients with good embryos but repeated failures in IVF or ICSI. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004;31(1):p.63-66.
120. Kwak-Kim J.Y., Chung-Bang H.S., Ng S.C., et al., Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003;18(4): p.767-773.
121. Ng S.C., Gilman-Sachs A., Thaker P., et al., Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002;48(2): p. 77-86.
122. Rai R., Sacks G., and Trew G., Natural killer cells and reproductive failure--theory, practice and prejudice. *Hum Reprod* 2005. 20(5): p.1123-1126.
123. Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 2004;3:1– 28.
124. Clarke A.G., Kendall M.D., The thymus in pregnancy: The interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunol Today* 1994;15:545-551.
125. Moncayo H., Solder E., Abfalter E., Moncayo R., Cytokines and the maternal-fetal interface. *Immunol Today* 1994;15:295.
126. Reinhard G., Noll A., Sclebusch H., Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:933-938.
127. Lin H., Mosmann T.R., Gailbert L., Tuntipopitit S., Wegmann T.G., Synthesis of Thelper2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *Journal Immunology* 1993;155:5436-5443.

128. Thellin O., Coumans B., Zorzi W., Igout A., Heinen E., Tolerance to the foeto-placental 'graft' : ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology* 2000; Volume 12, Issue 6, Pages 731-737.
129. Reid MST.Striking a balance in maternal immune response to infection. *Lancet* 1998;351:1670-1671.
130. Sacks G, Sargent I, Redman Ch. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999;20:114-118.
131. Erlebaher A. Why isn't the fetus rejected? *Current Opin Immunol* 2001;13:590-590.
132. Faulk W.P., Temple A., Distribution of beta-2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature* 1976;262:199.
133. Ian L., Sargent, Angela Borzychowski M., Christopher W.G., NK cells and human pregnancy - an inflammatory view. *Trends in Immunology* 2006;Vol.27, No.9.
134. Parhar R.S., Yagel S., Lala P.K., PGE2-mediated Immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential antitrophoblastactivity. *CeliImmunol* 1989;120:161.
135. Lewis L. Lanier A., NK cell recognition. *Rev. Immunol* 2005; 23:225-274.
136. Takeshita T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: Is paternal lymphocyte immunization a relic of the past? *J Nihon Med Sch.* 2004 Oct;71(5):308-313.
137. Maruyama T, Makino T, Sugi T, Iwasaki K, Ozawa N, Matsubayashi H, Nozawa S: Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortions who underwent paternal leukocyte immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1528-1536.
138. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N, et al.:Preconceptional natural killer cell activity as predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-1342.
139. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE:Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+ and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:93-99.
140. Coulam CB, Coodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD: Systemic CD56+ cell can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:93-99.

141. Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Sakuragi N, Fujimoto S: High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46:132-136.
142. Hayakawa S, Karasaki-Suzuki M, Itoh T, Ishii M, Kanaeda T, Nagai N, Takahashi-Yamamoto N, Tochigi M, Chishima F, Fuji TK, Oyama J, Kitanaka S, Satoh K: Effect of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th1/Th2 balance and TCR V beta and V gama repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43:107-115.
143. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev.* 2011 May;241(1):20-38.
144. Mattsson R. The non-expression of MHC class II in trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:383–384.
145. Wilczyński JR, Radwan P, Tchórzewski H, Banasik M. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012 Apr;60(2):151-160.
146. Tillery A., Silver R., Dalton J., Kjersti M., Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2006; 11: 279-295.
147. Coulam C.B., Krysa L.W., and Bustillo M., Intravenous immunoglobulin for in-vitro fertilization failure. *Hum Reprod* 1994. 9(12): p. 2265-2269.
148. Stephenson M.D. and Fluker M.R., Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril* 2000;74(6): p.1108-1113.
149. G. Ndukwe, S. Fishel, S. Thornton, K. Dowell, A. Shaker, L. Carmichael. Improved Outcome in Unexplained Repeated IVF Failures After Immunotherapy With Intravenous Immunoglobulin [IVIg] and AntiTNFalpha Drugs. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl.1):S262.
150. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Intravenous immunoglobulin (IVIg) and recurrent spontaneous pregnancy loss. *Fertil Steril* 2006 Nov;86(5 Suppl 1):S226-227.
151. M. Jerzak, M. Klochowicz, A. Go'rski, W. Baranowski. Etanercept Immunotherapy In Women With A History Of Recurrent Miscarriage. *Fertil Steril* 2010;94(Suppl.4):S46.
152. Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, Reginald PW, Underwood JL, Beard RW: Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet* 1985; 941-943.



153. Taylor C, Faulk WP. Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions. *Lancet* 1982; 2:68–70.
154. The Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialist Group. Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32:55-72.
155. Check JH. A practical approach to the prevention of miscarriage: Part 3- Passive immunotherapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2010;37(2):81-83.
156. Check JH, Tarquini P, Gandy P, Lauer C. A randomized study comparing the efficacy of reducing the spontaneous abortion rate following lymphocyte immunotherapy and progesterone treatment versus progesterone alone in primary habitual aborters. *Gynecol Obstet Invest* 1995;39(4):257-261.
157. Clark DA, Chaouat G. Loss of surface CD200 on stored allogeneic leukocytes may impair anti-abortive effect in vivo. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:13–20.
158. Gharesi-Fard B, Zolghadri J, Kamali-Sarvestani E. Effect of leukocyte therapy on tumor necrosis factor-alpha and interferongamma production in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:242–250.
159. Beer AE. Th-1/Th-2 natural killer cell activation systemically and locally in the endometrium and therapeutic options and outcome. *J Reprod Immunol* 2003;58:I.27.
160. Drakakis P, Loutradis D, Makrigiannakis A et al. Alloimmunization in patients with multiple pregnancy failures in IVF-ET. *J Reprod Immunol* 2003;58(5):3.
161. Michelon T, Michelon J, Badalotti M et al. Pregnancy and birth rate following immunotherapy in infertile women. *J Reprod Immunol* 2003;58(5):1.
162. Yang H, Qiu L, Di W et al. Proportional change of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril* 2008;92:301–305.
163. Gafter U, Sredni B, Segal J, Kalechman Y. Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion. *J Clin Immunol* 1997;17:408–419.
164. Zenclussen AC, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R, Malan Borel I. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor serum levels in recurrent

- spontaneous abortion women immunized with paternal white cells. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:22–29.
165. Jalali GR, Arck P, Surridge S, Markert U, Chaouat G, Clark DA, Underwood JL, Mowbray JF. Immunosuppressive properties of monoclonal antibodies and human polyclonal alloantibodies to the R80 K protein of trophoblast. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:129–134.
  166. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:297–306.
  167. Kruse N, Greif M, Moriabadi NF, Marx L, Toyaka KV, Rieckmann. Variations in cytokine mRNA expression during normal pregnancy. *Clin Exp Immunol* 2000;119:317–322.
  168. Orgad S, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H. The prognostic value of anti-paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 1999;14(12):2974–2979.
  169. Ito K, Tanaka T, Tsutsumi N, Obata F, Kashiwagi N. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum Reprod* 1999;14(3):650–655.
  170. Adachi H, Takakuwa K, Mitsui T, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Results of immunotherapy for patients with unexplained secondary abortions. *Clin Immunol* 2003;106:175–180.
  171. Check JH, Arwitz M, Gross J, Peymer M, Szekeres-Bartho J. Lymphocyte immunotherapy (LI) increases serum levels of progesterone induced blocking factor (PIBF). *Am J Reprod Immunol* 1997;37:17–20.
  172. Li L, Li SW, Jin S, Huang Z, Luo S, Wang Y. Assessment of the value of leukocyte immunization IVF-ET. *Fertil Steril* 2009;92(Suppl.3):S20.
  173. Check JH, Liss JR, Check ML, Diantonio A, Duroseau M. Lymphocyte immunotherapy can improve pregnancy outcome following embryo transfer (ET) in patients failing to conceive after two previous ET. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl.2):S12-13.
  174. Kling C., Magez-Zunker J., Jenisch S., et al., Experience with allogenic leukocyte isoimmunization (AI) for implantation failure in the in vitro fertilization program. *Am J Reprod Immunol*, 2002;48:p.147-150.
  175. Carp H.J., Toder V., Mashiach S., et al., Effect of paternal leukocyte immunization on implantation after biochemical pregnancies and repeated failure of embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 1994;31(2-3): p.112-115.

176. Ober C., Karrison T., Odem R.R., et al., Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet* 1999;354(9176): p.365-369.
177. Scott JR: Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2003; CD 000112.
178. Clark DA: Shall we properly re-examine the status of allogenic lymphocyte therapy for recurrent early pregnancy failure? *Am J Reprod Immunol* 2004;51:7-15.
179. Clark DA. Immunological factors in pregnancy wastage: fact or fiction. *Am J Reprod Immunol* 2008 Apr;59(4):277-300.
180. Check JH, Liss J, Check ML, Diantonio A, Choe JK, Graziano V. Leukocyte immunotherapy improves live delivery rates following embryo transfer in women with at least two previous failures: a retrospective review. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2005;32(2):85-88.
181. Maejima M, Fujii T, Yamashita T, Hara N, Hamai Y, Miki A, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y. Immunotherapy before and during pregnancy improves pregnancy outcome in women who suffer from recurrent abortion and did not benefit from immunotherapy before pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:12–15.
182. Carp HJ, Toder V, Torchinsky A, Portuguese S, Lipitz S, Gazit E, Mashiach S. Allogenic leukocyte immunization after five or more miscarriages. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Hum Reprod* 1997;12:250–255.
183. Clark DA, Arck PC, Jalali R, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Underwood JL, Mowbray JF. Psycho-neuro-cytokine/ endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:330–337.
184. Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, Pando M, Larriba J, Irigoyen M, Cortelezzi M, Auge L, Lombardi E, Etchepareborda JJ, Contreras Ortiz C, Fainboim L. Is the paternal mononuclear cells' immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol* 2000;44:129–135.
185. Clark DA, Daya S. Trials and tribulation in the treatment of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1991;25:18–24.
186. Smith JB, Cowchock FS, Lata JA, Hankinson BT. The number of cells used for immunotherapy of repeated spontaneous abortion influences pregnancy outcome. *J Reprod Immunol* 1992;22:217–224.

187. Katz I, Fisch B, Amit S, Ovadia J, Tadir Y. Cutaneous graft-versus-host-like reaction after paternal lymphocyte immunization for prevention of recurrent abortion. *Fertil Steril* 1992 Apr;57(4):927-929.
188. Tanaka T, Umesaki N, Nishio J, Maeda K, Kawamura T, Araki N, et al. Neonatal thrombocytopenia induced by maternal anti- HLA antibodies: a potential side effect of allogenic leukocyte immunization for unexplained recurrent aborters. *J Reprod Immunol* 2000;46:51– 57.
189. Pandey MK, Agrawal S. Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: a current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization for women with recurrent spontaneous abortion. *Int Immunopharmacol* 2004 Feb;4(2):289-298.
190. R. Pyrzak, D. N. Curole, P. H. Rye, R. P. Dickey, S. N. Taylor, P.Y.Taylor, P.Y.N. Taylor, P.Y. The Effect of Leukocyte Immunotherapy on the Development of Maternal Sperm Antibodies. *Fertil Steril* 1997; 68(Suppl.1): S20-S21.
191. Niederberger C. Re: sperm DNA damage and seminal oxidative status after shock-wave lithotripsy for distal ureteral stones. *J Urol* 2012 Jul;188(1):161.
192. Zini A, Fahmy N, Belzile E, Ciampi A, Al-Hathal N, Kotb A. Antisperm antibodies are not associated with pregnancy rates after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2011 Jun;26(6):1288-1295.
193. Pearlman SA, Meek RS, Cowchock FS, Smith JB, McFarland J, Aster RH: Neonatal alloimmune thrombocytopenia after maternal immunization with paternal mononuclear cells: successful treatment with intravenous gamma globulin. *Am J Perinatol* 1992;9:448-451.
194. Steck T. Immunotherapy for prevention of abortion and for improving implantation in extracorporeal fertilization. *Zentralbl Gynakol.* 2001 Jun;123(6):357-60.