

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOMETRİYAL HÜCRELERİN
KO-KÜLTÜR ORTAMINDA EMBRİYO VARLIĞINA
VERDİKLERİ YANITIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Elif GELENLİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOMETRİYAL HÜCRELERİN
KO-KÜLTÜR ORTAMINDA EMBRİYO VARLIĞINA VERDİKLERİ
YANITIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Elif GELENLİ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu

(Proje No: 2009-55) tarafından desteklenmiştir.

KOCAELİ

2010

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Endometriyal Hücrelerin Ko-Kültür Ortamında Embriyo Varlığına Verdikleri Yanıtın İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması

Tez yazarı : Elif GELENLİ

Tez savunma tarihi :03.08.2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN	
ÜYE(DANIŞMAN):	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
ÜYE:	Doç. Dr. Eray ÇALIŞKAN	
ÜYE:		
ÜYE:		

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2010

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı; anne adaylarından alınan endometriyal hücrelerin, ko-kültür ortamında zigot aşamasından, blastosist aşamasına kadar embriyo varlığında hücre adezyon moleküllerinden Trofinin ve CD26 (dipeptidil peptidaz IV) ekspresyonlarının immünfloresan teknikle araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza yaşları 26 ile 36 arasında değişen 11 kadın katıldı. Kadınların menstrüel döngülerinin 21.günü (luteal fazda) endometriyal biyopsileri alındı. Endometriyal hücelere ko-kültür yöntemi uygulandı. Kadınlara kontrollü ovaryen hiperstimulasyon (KOH) uygulandı. Yumurta çatlatma iğneleri (hCG) yapıldıktan 2 gün sonra ultrasonografi eşliğinde yumurtaları toplandı. Embriyoloji laboratuvarında seçilen oositlere intrasitoplazmik sperm injection (ICSI) uygulandı. Elde edilen embriyoların bir kısmı (n=25) ko-kültür ortamına ve diğer bir kısmı (n=80) konvansiyonel kültür ortamına alındı. Embriyoların erken gelişme dönemleri (1.-2.-3.-4.-5.gün) incelendi ve iyi kalitedeki embriyolar 5.gün anne adayının uterusuna bir katater ile transfer edildi. Aktarılan embriyoların olduğu ko-kültür kabındaki endometriyal hücreler fikse edildi. Endometriyal hücelere Trofinin ve CD26 ekspresyonlarını belirlemek üzere immünohistokimya protokolü uygulandı. Endometriyal ko-kültür hücrelerinde Trofinin ve CD26 ekspresyonları floresan mikroskopta incelendi.

Bulgular: Bu çalışmanın sonunda gebe kalan grupta, yaş ortalamasının gebe kalamayan gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu ($p \leq 0.05$) olduğu saptandı. Gebe kalan grupta, embriyoların 1.gününde endometriyal ko-kültürde Trofinin (+) boyanmış hücre sayısının gebe kalamayan gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu ($p \leq 0.05$) olduğu görüldü. Embriyo varlığında endometriyal ko-kültürde CD26 (+) boyanmış hücre sayısı ise gebe kalan ve gebe kalamayan gruplarda ise anlamlı bir farklılık göstermedi.

Sonuç: Endometriyal ko-kültür çalışmasına katılan kadınların yaklaşık yarısında gebelik gerçekleşmiş, diğer yarısında ise gerçekleşmemiştir. Ko-kültür ortamlarıyla yapılan immünohistokimyasal çalışmaların, konvansiyonel kültür ortamlarının geliştirilmesini sağlamada faydalı olacağı inancındayız. Ayrıca ko-kültür ortamlarının embriyonunun anne uterusuna ait hücrelerle erken dönemde iletişiminin sağlanmasında yararı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelime: Hücre adezyon molekülleri (CAM); trofinin; CD26 (dipeptidil peptidaz IV); embriyo; ko-kültürler.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the expressions of Trophinin and CD26 (dipeptidyl peptidase IV) by immunofluorescence technique from cell adhesion molecules (CAM) in the existence of embryo from zygote to blastocyte stage in co-culture medium of received endometrial cells from mother applicants.

Materials and methods: Eleven women participated in the study whose ages varied from twentiesix-to thirtysix years. Endometrial biopsies were received 21. day (luteal stage) of menstrual cyclus of women. Co-culture technique applied to endometrial cells. Controlled ovarian hyperstimulation (COH) applied to women. Oocytes were picked up with ultrasonography (US) after 2 days oocyte rupture (β hCG) injection was done. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) applied to selected oocytes in the embryology laboratory. Some of embryos obtained (n=25) were cultivated in co-culture medium and some of them (n=80) were received in the conventional culture medium. Early developmental stages (1.-2.-3.-4.-5.days) of embryos were examined and good quality embryos were transferred in 5th day to the mother's uterus by a cateter. Endometrial cells were fixed in co-culture medium of transferred embryos. An immunohistochemistry procedure were applied to determine Trophinin and CD26 expressions in the endometrial cells. Trophinin and CD26 expressions were examined in endometrial co-culture cells by fluorescence microscopy.

Findings: At the end of this study, average of age was determined to be less significantly in pregnant group, compared to non-pregnant group (p=0.05). Number of Trophinin (+) stained cells was low significantly in pregnant group, in first day of embryos compared to non-pregnant group in endometrial co-culture (p=0.05). There was no significant difference in the number of CD26 (+) stained cells in existence of embryo in endometrial co-culture between the pregnant and non-pregnant groups.

Conclusion: Approximately half of the participant women in endometrial co-culture study were pregnant, the rest were not pregnant. We believe that immunohistochemical studies with co-culture medium will be useful to improve the conventional culture mediums. We consider that co-culture mediums have advantage over the communications with endometrial cells of embryos in early developmental stages.

Key Words: Cell adhesion molecules (CAM); trophinin; CD26 (dipeptidyl peptidase IV); embryo; co-cultures.

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan; her konuda sonsuz destek veren değerli Danışman hocam;

Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a,

Ana Bilim Dalımızda Yüksek Lisans Eğitimimi aldığım sürece bilgilerinden yararlandığım ve minnettar olduğum değerli hocalarım;

Prof.Dr. Süreyya Ceylan'a, Prof. Dr.Hakkı Dalçık'a, Doç.Dr. Serdar Filiz'e,

Doç.Dr. Süheyla Gonca'ya, Yard. Doç. Dr. Yusufhan Yazır'a,

Anabilim Dalımızda pek çok bilgi ve tecrübeyi paylaştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım;

Araş. Gör. Dr. Pelin Coştur Bıyüksüz'a, Bio. Fatih Karakaya'ya, Uzm. Bio. Özcan Budak'a,

Bio. Begüm Alyürük ve Bio. Gözde Yazıcıoğlu'na,

Projemiz kapsamında ve endometriyal biyopsilerin alınmasında ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam;

Doç. Dr. Eray Çalşkan'a,

Embriyoların elde edilmesinde ve değerlendirilmesinde emeği geçen

Araş. Gör. Ender Yalçınkaya'ya,

Hastaların takibinde her türlü desteği veren hemşire ***Nevin Eğerci'ye,***

Uzm. Bio. Orkun Başarır'a,

Her zaman sevgi dolu yaklaşımlarıyla bana destek veren ***Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi***

Tüp Bebek Merkezi Ekibi'ne;

Endometriyal ko-kültürlerin hazırlanmasında, boyanmasında ve immunfloresan fotoğrafların çekilmesinde katkılarını esirgemeyen Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama

Merkezi Müdürü ***Prof. Dr. Erdal Karaöz'e ve Çalışma Arkadaşları'na,***

İstatistiklerimizin uygulanmasında danıştığım Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi;

Doç. Dr. Çiğdem Çağlayan'a,

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürümüz;

Prof. Dr. Ümit Biçer'e; Enstitü Yönetimi ve Çalışanları'na;

Hayatım boyunca, eşsiz sevgisi, güveni ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan gurur

kaynağım ve en büyük varlığım canım

Anneciğim, Babacığım; Hediye&Necaattin Gelenli ve

Biricik Kardeşim Bekir Gelenli'ye,

Tüm Sevdiklerim'e

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii- viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix-xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii-xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kadın Üreme Sistemi Anatomisi ve Histolojisi	4
2.1.1. İç Genital Organlar	4
2.1.1.1. Ovaryum	4
2.1.1.1a. Ovaryum Folikülleri	5
2.1.1.1b. Ovulasyon	7
2.1.1.1c. Korpus Luteum (Sarı Cisim)	8
2.1.1.2. Ovidukt-Tuba Uterina-Fallop tüpleri	9
2.1.1.3. Uterus	10
2.1.1.3a. Serviks Uteri	11
2.1.1.4. Vagina	12
2.1.2. Dış Genital Organlar	13
2.2. Embriyoloji	13
2.2.1. Gametogenez	13-15
2.2.2. Menstrüyel Döngü	15-17
2.2.3a. Fertlizasyon olmuşsa	17
2.2.3b. Fertlizasyon olmamışsa	17
2.2.3c. Gametlerin taşınması	18
2.2.3d. Oositin taşınması	18
2.2.3e. Spermin taşınması	18-19
2.2.3f. Spermin olgunlaşması	19
2.2.3g. Gametlerin yaşam süreleri	20
2.2.3.1. Fertilizasyon (Döllenme)	20
2.2.3.2. Döllenmenin evreleri	20-23
2.2.3.3. Döllenmenin sonuçları	23
2.2.3.4. Zigotun yarıklanması	24
2.2.3.5. Blastosist gelişimi	24-25
2.3. Üreme Fizyolojisi ve Adezyon Molekülleri	25
2.3.1. İntegrin Adezyon Molekülü Ailesi	26-27
2.3.2. Selektin Adezyon Molekülü Ailesi	28
2.3.3. FolikülerAtrezi, Lutealiz ve Adezyon Molekülleri	29
2.3.4. Adezyon Molekülleri ve Ovulasyon	30
2.3.5. Döllenme ve Adezyon Molekülleri	31
2.3.6. Endometriyum, Adezyon Molekülleri ve İmplantasyon	32
2.4. Açıklanamayan infertilite ve integrinler	33-34
2.4.1. İmplantasyon ve Moleküler etkileşimler	34-35
2.4.1a. Blastosistin kavitede serbest olduğu dönem	35
2.4.1a-i. İmplantasyon için gerekenler	35
2.4.1a-ii. İmplantasyonun başlangıcındaki sinyalleşme olayları	36

2.4.1a-iii. İmplantasyon hazırlığında uterusun bağlayıcı epitelinde meydana gelen değişiklikler	37-38
2.4.1b. Blastosistin yapışma ve içeri girme dönemi	38
2.4.1b-i. Endometriyal epitel ve trofoektodermin karbonhidrat epitoplari	39
2.4.1b-ii. Endometriyal yanıt ve trofoblastik hücre invazyonunda integrinlerin rolü	39-40
2.4.1b-iii. Heparan sülfat proteoglikan-	40
2.4.1b-iv. Trofinin Trofinin-Tastin-Bystin kompleksi	41-43
2.4.1b-iv. CD26 (Dipeptidil peptidaz IV)	43
2.4.1b-v. İnvazyon sırasında diğer adezyon moleküllerinin rolü	44
2.4.1b-vi. Blastosist için adeziv ligandların maskelenmesi	44
2.4.1c. Plasentasyon dönemi	45-46
2.4.2. İmplantasyon ve apoptozis	46-47
2.5. İnfertilite nedenleri	48-49
2.5.1. Kadına ait sebepler	49-53
2.5.2. Erkeğe ait sebepler	53-55
2.5.3. Açıklanamayan infertilite	55-56
2.6. IVF-ET	56
2.6a. Embriyonun dondurularak saklanması	56
2.6b. ICSI	56
2.6c. Yardımlı in vivo fertilizasyon	57
2.7. Endometriyal ko-kültür endikasyonları	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	58-76
3.1. Endometriyal Ko-kültür Hazırlığı	58-59
3.1a. Endometriyal Ko-kültür Hazırlığında Kullanılan Malzemeler	59
3.1b. Endometriyal Ko-kültür Hazırlığında Kullanılan Solusyon ve Kimyasal Maddeler	59-60
3.1c. Endometriyal Ko-kültür Protokolü	61-62
3.2. Oosit toplama-OPU	62-63
3.3. İntrasitoplazmik Sperm İnjection-ICSI	63-64
3.4. OPU Sonrası Embriyolar	65
3.4a. OPU Sonrası 1. gün Embriyolar	65
3.4b. OPU Sonrası 2. gün Embriyolar	65
3.4c. OPU Sonrası 3. gün Embriyolar	65
3.4d. OPU Sonrası 4. gün Embriyolar	66
3.4e. OPU Sonrası 5. gün Embriyolar	66-67
3.5. Erken ve İleri Dönem Embriyo Gelişimi	67
3.5a. Erken Dönem Embriyo Gelişimi	67-70
3.5b. İleri Dönem Embriyo Gelişimi	70-71
3.5c. Blastosist Dönemi Sınıflandırması	71-72
3.6. İmmunohistokimya	73
3.7. İstatistiksel analiz	73-74
3.8. Fotoğraftaki hücrelerin sayımı	74-76
4. BULGULAR	77-83
Bulgulara ait Şekiller	84-97
5. TARTIŞMA	98-104
6. SONUÇ	105
KAYNAKLAR DİZİNİ	106-113
ÖZGEÇMİŞ	114-116

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	:Angiotensin Converting Enzyme-Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AFA	:Anti Fosfolipid Antikorlar
ASA	:Anti Sperm Antikorlar
Bax	:Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	:B-cell lymphoma 2
BDNF	:Brain Derived Neurotrophic Factor
CEACAM1	:Karsinoembriyonik antijen ailesinden bir adezyon molekülü
CAM	:Cell Adhesion Molecule- Hücre adezyon molekülü
CD26	:Dipeptidyl peptidase IV
CD44	:Cluster of differentaition of leukocytes
CL	:Corpus luteum, sarı cisim
CNTF	:Ciliary Neurotrophic Factor
COX-2	:Cyclooxygenase 2
CSF	:Coloni Stimulating Factor-Koloni Uyarıcı Faktör
DAPI	:4'-6'-Daimino-2-Phenyl İndole
DAX-1	:Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene 1
DCM	:Desidual stromal hücreler
DES	:Diethylstilbestrol
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Dezoksiribonukleik asit
E2	:Estradiol-17
ECM	:Ekstraselüler matriks
EDTA	:Etilen DiAmin Tetra asetik asit
EGF	:Epidermal Growth Factor-Epidermal Gelişim Faktörü
E-kadherin	:Epitelyal kadherin
ELAM-1	:Endotelial Lökosit Adhezyon Molekülü-1
EPG-EGF	:Early Pregnancy Factor-Erken Gebelik Faktörü
ER	:Endoplazmik retikulum
ET	:Embriyo transferi
EVCT	:Ekstra Villöz Sito Trophoblast
FGF	:Fibroblast Büyüme Faktörü

FSH	:Folikül Stimulating Hormon
GAG	:Glikozaminoglikan
GIFT	:Gamet intra-fallopian transfer
GNRH	:Gonadotropin Releasing Hormon
GPI	:Glikozilfosfatidilinositol
HA	:Hyaluronik Asit
HB-EGF	:Heparin Binding Growth Factor-Heparin Bağlayıcı Büyüme Faktörü
HBSS	:Hank's Balanced Salt Solution
hCG	:İnsan Koryonik Gonadotropini
HLA-G	:Human Leukocyte Antigen 6- İnsan Lökosit Antijen-G
HSA	:Human Serum Albumin
HSPG	:Heparan Sülfat ProteoGlikan
HTF	:Human Tubal Fluid
IAEK:	:İnsan Araştırmaları Etik Kurulu
ICAM	:İntersellüler Hücre Adezyon Molekülü
ICSI	:İntracytoplasmic sperm injection
IGF	:İnsülin Like Growth Factor-İnsülin Benzieri Büyüme Faktörü
IGF 1	:İnsülin Benzieri Büyüme Faktörü 1
IGF 2	:İnsülin Benzieri Büyüme Faktörü 2
IGFBP	:İnsülin like growth factor Binding Protein
IL-1	:Interleukin-1
IL-6	:Interleukin-6
IL-8	:Interleukin-8
IVF	:İn Vitro Fertilizasyon
LE	:Luminal epitelyum
LFA-1	:Leukocyte Function Associated Antigens-1, lökosit fonksiyonları ile ilişkili molekül-1
LFD	:Luteal faz defekti
LH	:Luteinizan Hormon
LPS	:Lipopolisakkarit
KOH	:Kontrollü ovaryen hiperstimülsayon
KÖGEM	:Kök Hücre ve Gen Tedavileri Merkezi
LAK	:Lupus antikoagulant
LE	:Luminal Epitel

LFD	:Luteal Faz Defektleri
LIF	:Lökemia İnhibitör Factor
LH	:Lüteinizan Hormon
LUF	:Luteinize unrüptüre follikül sendromu
MadCAM-1	:Mucosal Addressin CAM-1
MCP-1	:Monosit Kemotaktik Protein-1
MMP-2	:Matriks Metallo Proteinazlar-2
MMP-9	:Matriks Metallo Proteinazlar-9
Muc-1	:Mucin-1
N-kadherin	:Nöral kadherin
NPB	:Nucleolar precursor bodies-Nukleolar öncül cisimcikler
OPU	:Oocyte Pick Up- Oosit, yumurta toplama
P4	:Progesteron
PBS	:Phosphate Buffered Saline
PCOD	:Polikistik Over Hastalığı
pECAM-1/CD31	:Platelet Endotel Adhesion Molecule
PGC	:Primordial Germ Cells-İlkel Germ Hücreleri
PGT	:Preimplantasyon Genetik Tanı
PGI-2	:Prostaglandin ve prostasiklin -2
PH	:Power of Hydrogen
PİH	:Pelvik İnflamatuvar Hastalık
P- kadherin	:Plasental kadherin
PKT	:Post Koital Test
PN	:Pronukleus
RER-GER	:Kaba endoplazmik retikulum
RGD	:Arginine-Glycine-Aspartic Acide (Arg-Gly-Asp)
Rpm	:Revolutions per minute
SCR	:Kısa tekrarlayan diziler (<i>short consensus repeats</i>)
SF-1	:Steriodogenic factor-1
SOX-9	:SRY-related HMG (High Mobility Group) box
TCR	:T hücre reseptörü
TE-TF	:Trofoektoderm
TNF	:Tümör nekroz faktör
TGF	:Transforming Growth Factor

TGF- β	:Transforming Growth Factor-beta 1
TIB	:Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı
TIMMP	:Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
US	:Ultrasonografi
VCAM	:Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	:Vascular Endothelial Growth Factor, Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLA	:Very Late Antigen

ŞEKİLLER DİZİNİ

2. Genel Bilgiler Bölümüne Ait Şekiller:

Şekil 2.1 Ovaryum Follikülleri.....	5
Şekil 2.2. Oosit gelişiminde Gap junction lar ile mesaj iletişimi	6
Şekil 2.3. Kadın üreme organları ve sekonder oositin döllenişmesi	10
Şekil 2.4. PGC'nin gonadal çıkıntıya göçü.....	13
Şekil 2.5. Spermilerin korona radiata hücrelerini ve zona pellusia'yı geçişi	21
Şekil 2.6:Döllenişme, yarıklanma , implantasyon gelişimin ilk haftası.....	23
Şekil 2.7. İntegrin molekülü.....	25
Şekil 2.8. Selektin molekülü.....	28
Şekil 2.9. Adezyon molekülleri.....	31
Şekil 2.10. İmplantasyonun erken ve geç dönemlerinde blastosist ve zona pellisuda.....	36
Şekil 2.11. Embriyonun tutunma ve invazyonu.....	39
Şekil 2.12. Trofinin aracılı hücre adezyonu ve aktivasyonu.....	42
Şekil 2.13. Trophinin'in implantasyonda ekspresyonu.....	43
Şekil 2.14. Plasentasyon dönemi.....	46

3. Gereç ve Yöntem Bölümüne Ait Şekiller:

Şekil 3.1. Kültür ortamlarının hazırlanışı.....	75
Şekil 3.2. Vajinal ultrasonografi ile oosit toplanması.....	77
Şekil 3.3. Ultrasonografi ile görüntülenen folliküller.....	78
Şekil 3.4. Invert mikroskopta mikropipetlerle ICSI işlemleri.....	79
Şekil 3.5. ICSI işlemleri.....	79
Şekil 3.6. Embriyo transfer işleminin ultrasonografik görüntüsü.....	81
Şekil 3.7. Özel bir katater yardımıyla embriyo transferi.....	82
Şekil 3.8. Embriyolarda pronukleus değeriendirilmesi.....	83
Şekil 3.9a. Embriyoda bölünme evrelerinin sınıflandırılması.....	85
Şekil 3.9b. Embriyoda bölünme evrelerinin sınıflandırılması.....	86

4. Bulgular Bölümüne Ait Şekiller:

4a. Endometriyal Ko-kültüre ait immunfloresan resimlere ait şekiller:

Şekil 4.1 Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun kontrolü.....	84
Şekil 4.2. Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 2.gündeki endometriyal kültürler.....	84
Şekil 4.3. Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 2.gündeki endometriyal kültürler.....	84
Şekil 4.4 Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun kontrolü.....	85
Şekil 4.5. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 1.günüdeki endometriyal kültürler.....	85-86
Şekil 4.6. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 1.günüdeki endometriyal kültürler.....	86
Şekil 4.7. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 2.günüdeki endometriyal kültürler.....	86
Şekil 4.8. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 2.ve 3. günlerdeki endometriyal kültürler.....	87
Şekil 4.9. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 3.günüdeki endometriyal kültürler.....	88
Şekil 4.10. Embriyosu gelişip implantasyonu gerçekleşmeyen hasta grubunun embriyo varlığında 4.günüdeki endometriyal kültürler.....	89
Şekil 4.11 Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun kontrolü.....	90
Şekil 4.12. Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun embriyo varlığında 1.günüdeki endometriyal kültürler.....	90
Şekil 4.13. Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun embriyo varlığında 2.günüdeki endometriyal kültürler.....	91
Şekil 4.14. Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun embriyo varlığında 3.günüdeki endometriyal kültürler.....	91
Şekil 4.15. Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun embriyo varlığında 4.günüdeki endometriyal kültürler.....	91

4b. Hasta gruplarının embriyolarına ait şekiller:

Şekil 4.16. Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen hasta grubunun 1. gün embriyoları.....	92
Şekil 4.17. Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen hasta grubunun 2. gün embriyoları.....	93
Şekil 4.18. Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen hasta grubunun 3. gün embriyoları.....	94
Şekil 4.19. Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen hasta grubunun 4. gün embriyoları.....	95
Şekil 4.20. Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen hasta grubunun 5. gün embriyoları.....	96
Şekil 4.21. Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun 1-2- 3 - 4- 5. gün embriyoları.....	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İmplantasyonda rolü olduğu bilinen faktörler.....	47.
Çizelge 3.1. Blastosist gelişim seviyesi.....	72
Çizelge 4.1. Gebe kalan ve gebe kalamayan hastaların yaşlarını, bazal hormon değerlerini ve 1.-2.-3.4. günlerdeki embriyoların varlığında ko-kültürde trophinin ve CD26 (+) hücre sayılarını karşılaştıran veriler görülüyor ($p \leq 0.05$).....	81
Çizelge 4.2. Gebe kalan ve gebe kalamayan hastalara ait tüm datalar ve korelasyonları görülüyor ($p \leq 0.001$).....	82-83

1. GİRİŞ

Günümüzde in-vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET) başarılı bir teknik olmasına rağmen, bazı kadınlarda embriyonunun implantasyon yetersizliği devam eden bir sorundur. İmplantasyon, 1.haftanın sonunda başlar, 2.haftanın sonuna kadar devam eder. Blastosistin implantasyonu; endometriyum epiteline yapışmasını, tutunmasını, epiteli aşındırarak endometriyal stromaya gömülmesini içeren önemli bir süreçtir. İmplantasyon gerçekleşirken blastosistte trofoblast, dışta sinsityotrofoblast ve içte sitotrofoblasta farklılanır. Sinsityotrofoblast; aşındırıcı, yiyici, sindirici ve istilacı işlevleriyle endometriyal stromaya gömülür (Sadler, 2004; Moore, 2009). Endometriyal reseptivite, IVF-ET tedavilerinin başarısında önemli bir role sahiptir. Embriyo gelişimiyle endometriyal olgunlaşma arasında uyum eksikliğinin implantasyon başarısızlığına neden olduğu düşünülmektedir. Blastosist implantasyonunda endometriyum reseptivitesini sağlayan mekanizmaların tam olarak anlaşamadığı da bildirilmiştir (Kumtepe, 2007; Bahar ve Baykal, 2008).

İmplantasyon başarısını etkileyen faktörler arasında, embriyo kalitesi, endometriyal reseptivite ve ET tekniği sayılabilir. Genç yaştaki anne adaylarına yapılan ET sonrası yüksek gebelik oranları, bu faktörlerden embriyoya düşen payın daha az olduğunu düşündürmektedir. Yapay uterus olarak da bilinen endometriyal ko-kültür ortamları, embriyoların transfer dönemi öncesi doğala yakın bir ortamda gelişimlerine izin veren sistemlerdir. Ko- kültür sistemlerinin embriyo gelişimine pozitif etkisi in vivo şartları başarı ile taklit etmesidir.

Ko-kültür ortamları ile konvansiyonel kültür ortamlarının karşılaştırıldığı çalışmalara acilen gereksinim olduğu bildirilmiştir (Seyhan ve ark., 2008). Ko-kültür ortamlarının hazırlanmasında IVF laboratuvarı personelinin özel eğitim, bilgi ve deneyim kazanması ile teknik alt yapının kurulması gereklidir. Ko-kültürün diğer bir dezavantajı ise hücrelerin elde edildiği dokulardan kaynaklanabilecek kontaminasyon riskidir.

Ko-kültürün getirdiği avantajlar, daha önceleri embriyoların rutin kültür medyumlarında inkübe edildiğinde, kötü embriyo gelişimi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı (TİB) görülen hastalarda belirgin olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar ko-kültür ortamındaki hücrelerin, embriyo için toksik maddeleri kültür ortamından uzaklaştırdığına ilişkin teorileri desteklediğini işaret etmektedir (Zeyneloğlu ve Kahraman, 2009). Embriyo gelişimini iyileştirmeye yönelik kültür medyumları bile embriyoların implantasyonu üzerinde pek çok farklı etki gösterirler (Karaöz, 2010). Erken dönemde embriyonun ve blastosistlerin gelişiminin in vitro olarak incelenmesi, blastosistlerin invajinasyonu ve implantasyonuyla

ilgili olayların aydınlatılabilmesi için yeni çalışmaların planlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda, embriyo gelişimi açısından ko-kültür ortamlarının konvansiyonel kültür ortamlarına göre avantajlı olup olmadığı sorusuna yanıt aramak farklı çalışmalarla mümkün olacaktır.

1.1 Amaç ve Kapsam

Başarılı bir implantasyon blastosist ile endometriyum arasında karşılıklı fizyolojik etkileşimlerle gerçekleşir. Bugün implantasyonun yaklaşık 3 aşamada incelendiği bilinmektedir (implantasyon penceresi):

1. Apozisyon: bu aşamada endometriyum epitelinden İnterlökin-8 (IL-8), Monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) salgılanır.

2) Adezyon: bu aşamada ise endometriyum yüzey epiteli ile blastosist beraberce $\alpha 5$ - $\beta 1$ integrin, Heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), Koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1), Lökemi inhibe edici faktör (LIF), İnterlökin-1 (IL-1) salgılar.

3) İnvazyon: bu aşamada trofoblast Stromelizin'ler (fibronektin, laminin, proteoglikanlar, kollajen tip 4,5,7), Kollajenaz (kollajen tip 1-4,10), Jelatinaz (kollajen tip 4), Matriksmetalloproteinazlar (MMP-2, MMP-9) salgılar.

İmplantasyon sürecinde hücre adezyon molekülleri (CAM)'nin ekspresyonuyla ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. CAM, hücre yüzeyinde bulunan, hücrelerin birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlanmasını sağlayan protein molekülleridir. CAM'nin hücre büyümesi, hücre farklılaşması, embriyolojik süreçlerde ve inflamasyonda rol aldıkları belirlenmiştir. Üreme biyolojisinde de farklı süreçlerde ve dönemlerde CAM'nin işlevleri olduğu saptanmıştır. İmplantasyonun endometriyal integrin, kadherin ve selektinleri içeren tüm CAM'lerin yardımıyla başladığı kabul edilmektedir. İmplantasyon, genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasında gelişen başarılı bir kaynaşma olayıdır. Embriyodaki trofoblast hücreleri, anneden fetüse oksijen ve besinlerin taşınmasından başka, implantasyon sürecinde blastosistin endometriyuma tutunmasından başlayarak gebeliğin başından sonuna kadar diğer işlevlerin yerine getirilmesinde de görevli hücrelerdir. Gebeliğin devamını sağlayan bu işlevler; uterus dokusuna sürekli ve düzenli invazyon, çoğalma, farklılaşma ve immuno-endokrin işlevlerdir (Gökçimen ve Temel, 2004).

Adezyon ile ilgili araştırmalar, adezyonun sadece hücreleri birbirine bağlamaktan başka etkileri olduğunu göstermiştir. Son yıllarda önemli gelişmelerden biri, adezyon moleküllerinin

sinyal iletiminde de görevleri olduğunun anlaşılmasıdır. Bu durum sağlıklı bir embriyonun gelişiminde ve implantasyonda gereklidir. Endometriyal tutunma ve implantasyonu izleyen süreçte, trofoblastlar tarafından interstisyel ve intravasküler maternal doku invazyonu maternal-plasental-fetal sirkülasyonun gelişimine ihtiyaç duymaktadır ve bu yeni CAM'ların farklı ekspresyonlarını gerektirmektedir. Gebelikte adezyon moleküllerinin aldığı rol çok önemlidir, çünkü pre-eklampsi, fetal gelişim geriliği, düşük ve infertilite problemlerini içeren bazı gebelikle ilişkili rahatsızlıklar CAM'ların ve/veya onların bağlaçlarının ekspresyonundaki anormalliklerle ilişkilendirilmiştir (Şahin, 2007).

Bizim çalışmamızda anne adaylarının endometriyal hücrelerinin, ko-kültür ortamında, zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar embriyo varlığında verdikleri yanıtın CAM'lerinden trofiinin ve CD26 (dipeptidil peptidaz IV) ekspresyonlarının immünfloresan teknikle araştırılması planlandı. Çalışmamızın bu konuda da önemli bir boşluğu dolduracağını umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kadın Üreme Sistem Anatomisi ve Histolojisi

Kadın üreme sistemi iç genital organlar iki ovaryum, iki tuba uterina (fallop tüpleri-ovidukt), bir uterus ve vajina ile dış genital organlardan oluşur. Bu sistem menarş ile menapoz arasında histofizyolojik döngüsel değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler hormonal mekanizmalar ile kontrol edilir.

2.1.1. İç Genital Organlar

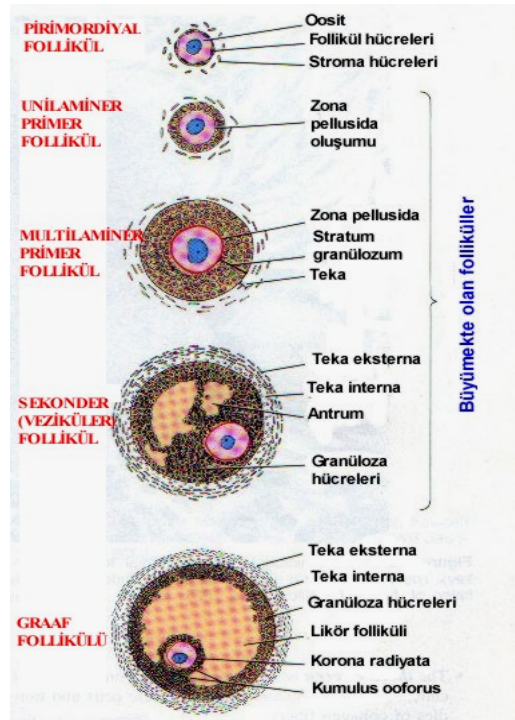
2.1.1.1. Ovaryum

Ovaryumlar küçük pelviste “fossa ovarica” denilen çukurların içine yerleşmiş 3-5 cm uzunluk, 2.5-3 cm genişlik ve 0.5-1.5 cm. kalınlıkta oval biçimli organlardır. Yüzeyleri “germinal epitel” denilen değişime uğramış bir mezotel ile örtülüdür. Tek katlı kübikten tek katlı yassıya kadar değişen bu epitelin altında ovaryuma beyazımsı rengini veren fibröz bağ doku kapsülü “tunika albuginea” bulunur. Tunika albuginea'nın altında ovaryumun folliküllerini içeren korteksin bağ dokusu yer alır. Ovaryumun en iç kısmı medulla gevşek bağ dokusu yapısındadır. Ovaryan stromanın periferal zonu korteks ile merkezi zonu medulla birbirinden kesin bir çizgiyle ayrılmaz. Korteks primer oositlerin bulunduğu primordiyal follikülleri ve stromasında iğ şekilli fibroblastları içerir. Bu fibroblastlar, diğer organlardakinden farklı olarak hormonal uyarılara daha duyarlıdır. Medulla, hilustan ovaryuma giren sinirler, lenf ve kan damarları ile testisteki Leydig hücrelerine benzeyen interstisyel hilus hücrelerini içerir. Ovaryen arter ve uterin arterin dalları mezovaryumda ve broad ligamentte anastomoz yapar. Bu arteryel pleksustan yaklaşık 10 adet kıvrımlı hellsin arter hilumdan girer, daha küçük dalları kortikomedullar bölgede bir pleksus yapar, bunlar kortekse ışınal olarak dağılan düz kortikal arteriyelleri oluşturur; burada dallanırlar, folliküller etrafında zengin bir kapiller ağını oluşturmak üzere vasküler arkusları yaparak anastomozlaşırlar. Venöz drenaj arteryel sistemi izler, meduller venler geniş ve kıvrımlıdır. Ovaryumun innervasyonu sempatik liflerle sağlanır. Bu sinir lifleri kan damarlarını ve düz kas hücrelerini innerve eder ve olasılıkla folliküler maturasyon ve ovulasyonda rolü olabilir. Ovaryum; dişi gametin üretimi, östrojen ve progesteron salgılanması, doğumdan sonra çocuğun üreme organlarının büyümesinin düzenlenmesi ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumludur (Young and Heath, 2000; Ross, 2003; Gartner and Hiatt, 2009; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.1.1.a. Ovaryum Follikülleri

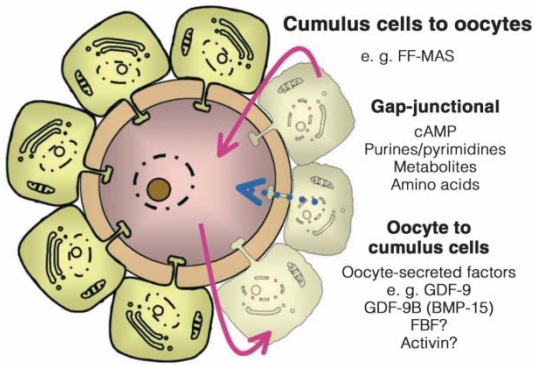
Ovaryum follikülleri korteksin stroması içinde yer alır. Bir follikül, bir veya daha fazla tabakalı granüloza hücresi katmanıyla ile çevrili bir oosit içerir. Folliküler gelişimin birkaç evresi vardır (Şekil 2.1).

Primordiyal folliküller: Fetal yaşam sırasında oluşan folliküllerdir. Her bir primordiyal follikül tek katlı yassı follikül hücreleriyle çevrili bir primer oosit içerir. Primordial follikül içerisindeki oosit yaklaşık 25 µm çapında küre biçimli bir hücredir. Biraz ekzantrik yerleşimli büyük bir nükleusu ve nükleolusu bulunur. Bu hücreler mayoz bölünmenin birinci profaz evresindedir. Kromozomlar çoğunlukla çözülmüş haldedir ve ökromatik boyanırlar. Organeller nükleusa yakın olup kümelenme eğilimi gösterirler; çok sayıda mitokondri, birkaç Golgi kompleksi ve endoplazma retikulumu (ER) sarnıçları bulunur. Yassı follikül hücreleri birbirlerine desmozomlarla bağlanırlar. Follikül hücrelerinin altında bir bazal lamina bulunur ve damardan yoksun follikülleri çevreleyen stromadan ayıran sınırı oluşturur.



Şekil 2.1: Ovaryum Follikülleri (Junqueira and Carneiro, 2009)

Büyümekte olan folliküller: Pubertede folliküllerin büyümesi hipofizden salgılanan follikül uyarıcı hormon (FSH) etkisiyle follikül hücrelerinin, primer oositin ve follikülü çevreleyen stromanın büyümesi ile gerçekleşir. Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem folliküler büyümenin birinci evresidir. Bu sırada oositin çapı maksimum 125-150 µm'ye ulaşır; nükleus büyür ve bu durumuyla “germinal vezikül” adını alır. Mitokondri sayısı artar, ER hipertrofi gösterir ve Golgi kompleksi hücre yüzeyinin hemen altına göç ederler. Follikül hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve tek tabakalı kübik hücre katmanı oluştururlar. Bu evredeki follikül, “unilaminer (tek tabakalı) primer follikül” olarak adlandırılır. Follikül hücreleri mitozla çoğalırlar ve çok katlı folliküler epiteli ya da granüloza tabakasını oluştururlar; buradaki hücreler gap junctionlar aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu aşamadaki folliküle “multilaminer (çok tabakalı) primer follikül” ya da “preantral follikül” olarak adlandırılır. Oositi saran “zona pellusida” en az üç farklı glikoprotein içerir. Zona pellusida sentezine, hem oositlerin hem de follikül hücrelerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Follikül hücrelerinin uzantıları filopodlar ile oosit mikrovillusları, zona pelusida içine uzanırlar ve gap junctionlar (Şekil 2.2) ile birbirleriyle temas kurarlar (Gartner and Hiatt, 2009; Junqueira and Carneiro, 2009; İrez, 2010).



Şekil 2.2: Oosit gelişiminde Gap junction'lar kumulus hücreleri ile oosit arasında moleküler mesajların iki yönlü iletişimini sağlar (<http://humupd.oxfordjournals.org>).

Folliküller, granüloza hücrelerinin boyut ve sayıca artmasıyla büyüdükçe korteksin daha derinlerine doğru göç ederler. Follikül hücreleri arasında sıvı toplanmaya başlar; sıvı içeren küçük boşluklar birleşerek büyük bir boşluk (antrum) oluşturur. Artık sürekli bölünen follikül hücreleri ve kalınlaşan zona pellusida ile karakterize bu folliküle “sekonder (antral) follikül” denir.

Folikül sıvısı; plazma, steroid bağlayıcı proteinler, glikozaminoglikan (GAG)'ları içeren bazı proteinler, yüksek konsantrasyonda progesteron (P₄), androjen ve östrojenler içerir. Granüloza hücrelerinin antrumu oluşturmak üzere yeniden düzenlenmesi sırasında, bazı hücreler follikül duvarında belirli bir yerde yoğunlaşarak küçük bir tepelik oluşturur; antrumun iç kısmına doğru çıkıntı yapan ve oosit içeren bu yapıya "kümüls ooforus" denir. Bir grup granüloza hücresi oositin çevresinde "korona radyata"yı oluşturur ve ovulasyonda sekonder oosite eşlik eder. Oosite ve granüloza tabakasında bu değişiklikler oluşurken, follikülün hemen bitişiğindeki fibroblastlar farklılaşma göstererek "teka folliküli" denen hücresel bir kapsül oluşturacak şekilde düzenlenir. Daha sonra bu tabaka "teka interna" ve "teka eksterna" olarak farklılaşır. Gelişmekte olan follikülün bazal laminasına komşu, iyi damarlanmış teka internanın hücreleri tamamen farklılaştığında steroid üreten hücre özellikleri kazanırlar. Teka interna hücreleri, bir androjen öncülü olan androstenediyonu salgılar. Daha sonra, testesteron aromataz enzimi tarafından östradiyole çevrilir. Östrojen follikülü çevreleyen stromadan kan damarlarıyla kana geçer ve tüm vücuda yayılır. Teka eksterna esasen bağ dokusundan ibarettir, içinden geçen küçük damarlar teka internanın sekretuar hücreleri etrafında zengin kapiller ağlar oluşturur.

Olgun Folliküller: Olgun ya da graaf folükülü ovaryum yüzeyinden dışarı doğru şişkinlik yapan saydam bir vezikül olarak görülebilir ve yaklaşık 2,5 cm. çapındadır. Sıvı toplanması nedeniyle antrum genişler ve oosit, granüloza hücreleri tarafından oluşturulan bir sap ile follikül duvarına bağlanır. Antrum içindeki sıvı toplanmasıyla granüloza tabakası daha ince bir hale gelir. Bu folliküller son derece kalın bir teka katmanına sahiptir. Primordiyal follikülden olgun follikülün oluşumuna kadar büyüme süreci yaklaşık 90 gün sürer (Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.1.1. b. Ovulasyon

Ovulasyon, olgun follikül duvarının yırtılması ve sekonder oosit'in salıverilmesidir. Sekonder oosit oviduktun genişlemiş ucu tarafından yakalanır. Kadında 28 günlük menstrüel döngünün yaklaşık 14. gününde gerçekleşen ovulasyonda her ay, sol ya da sağ ovaryumdan genellikle bir tane sekonder oosit serbest bırakılır, ancak bazen ovulasyon gerçekleşmeyebilir; bazen de aynı anda iki ya da daha fazlası da atılabilir. Ovulasyonu uyaran, büyüyen follikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeylerine yanıt olarak ön hipofiz bezinden salgılanan luteinizan hormondaki (LH) ani bir artıştır.

Kanda LH'daki artıştan sonra, ovaryumun kan akışında bir artış görülür ve plazma proteinleri kapiller ve postkapiller venüllerden sızarak ödeme yol açarlar. Lokal olarak, prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kollajenaz salıverilir. Granüloza hücreleri daha fazla hyaluronik asit (HA) üretirler ve gevşek bir hal alırlar. Tunika albugineadaki kollajen yıkımı, iskemi ve üstteki bazı hücrelerin ölmesiyle zayıflar. Folliküler sıvı basıncındaki artış ve olasılıkla düz kas hücrelerinin kasılması ile bu zayıflama follikül dış duvarının yırtılması ve ovulasyona yol açar. Follikül duvarının yırtılmasıyla birinci kutup cismi ve zona pellusidası, korona radyatası, bir miktar follikül sıvısı ile sekonder oosit ovaryumu terk eder ve ovidukta girer. Oviduktun ovaryum yüzeyine bakan ucu huni biçimindedir ve fimbriya adı verilen çok sayıda parmaklı çıkıntılardan oluşur. Kas kasılması ve silialı hücrelerin hareketiyle sekonder oosit oviduktun infundibulumuna girer. Oosit ovulasyondan sonraki ilk 24 saat içinde döllenmezse dejenerasyona uğrar ve fagosite edilir. Döllenmeden sonra gelişen zigotta hücre bölünmesi başlar ve zigot yaklaşık 5 gün sürecek bir yolculukla uterusu taşınır (Sadler, 2004; Larsen, 1993; İrez, 2010).

2.1.1.1. c. Korpus Luteum (Sarı cisim)

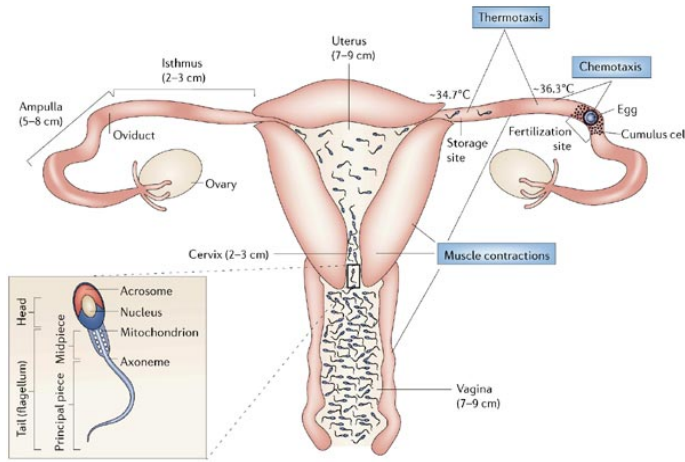
Ovulasyondan sonra, boşalan follikülün içinde kalan granüloza ve teka interna hücreleri kortekste yer alan korpus luteum (CL) denilen geçici bir endokrin bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Ovulasyondan sonra boşalan follikülün yeniden düzenlenmesi ve CL'un oluşumu, ovulasyon öncesinde salgılanan LH'nin uyarısıyla gerçekleşir. LH uyarısı sonucu CL, P₄ ve östrojen salgılamaya başlar. P₄, ovaryumda yeni folliküllerin gelişmesini engelleyerek ovulasyonu önler. Follikül sıvısının boşalması ile follikül duvarı kıvrımlı bir hale gelir. Follikül boşluğunda bir miktar kanama olur, bu kan burada pıhtılaşır ve sonra yerini bağ dokusuna bırakır. Bu bağ dokusu makrofajlarla ortadan kaldırılmakta olan kan pıhtısı artıkları CL'un en iç kısmını oluşturur. Ovulasyondan sonra granüloza hücreleri bölünmemesine rağmen, boyutlarında büyük bir artış görülür (20-35µm çapında). Bunlar CL parenkimasının yaklaşık %80'ini oluşturur ve "granüloza lutein hücreleri" adını alırlar. Bu hücreler steroid sentezleyen hücrelerin özelliklerine sahiptirler. Teka interna hücreleri de "teka lutein hücreleri"ni oluşturarak CL'un oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücreler granüloza lutein hücrelerine benzer yapıdadır, ancak daha küçüktür (yaklaşık 15µm çapında) ve daha koyu boyanırlar. Bu

hücreler CL duvarının kıvrımlarında yerleşirler. Teka internanın kapiller ve lenfatik damarları CL'un iç kısmına doğru gelişir ve bu yapının zengin damar ağını oluşturur. CL'un kaderi gebeliğin oluşup oluşmamasına bağlıdır. Gebelik meydana gelmediği zaman, LH uyarımıyla 10-12 gün süreyle hormon salgılanmasına programlanmış olan CL hücreleri apoptozisle dejenere olur. CL bozulduktan sonra, steroid hormonların kandaki konsantrasyonları azalır ve FSH salgılanır. FSH da başka folliküllerin büyümesini uyarır ve bir sonraki menstrüel döngü başlar. Yalnızca menstrüel döngünün bir kısmı süresince kalan CL, “menstrüasyon korpus luteumu” olarak adlandırılır ve hücre kalıntıları makrofajlarca yok edilir. CL'un olduğu yer fibroblastlar tarafından kaplanır; lüteal hücre kümelerinin yerini korpus albicans denilen stromal bağ dokusu alır. Korpus albicans ovaryumda kalır, küçülür, ama hiçbir zaman kaybolmaz. Gebelik oluşursa, embriyonun trofoblastik hücreleri tarafından sentezlenen insan koriyonik gonadotropin hormonu (hCG), CL'u uyararak sinyaller gönderir. hCG, CL'un daha da büyümesini sağlar ve P₄ salgısını uyarır. P₄, uterus mukozasını korur ve bezlerinin salgısını uyarır; bu bezlerin salgısının plasantanın işlevi başlamadan önce embriyonun beslenmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Buna “gebelik korpus luteumu” denir. Gebelik CL'u aynı zamanda “relaksin” denilen polipeptid hormonu salgılar. Bu hormon simfisiz pubisin bağ dokusunu yumuşatıp gevşeterek doğumun kolaylaşmasına yardımcı olur (Young and Heath, 2000; Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Gartner and Hiatt, 2009; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.1.2. Ovidukt (tuba uterina-fallop tüpleri)

Ovidukt (tuba uterina-fallop tüpleri) 12 cm uzunluğunda, hareketli ve kaslı bir kanaldır. Ovidukt ampulla, istmus ve intramural bölgelere ayrılır. İfundibulum olarak adlandırılan bir ucu ovaryum yakınında periton boşluğuna açılır ve fimbriya denen çok sayıda uzantılardan oluşan bir saçaklanma gösterir; intramural bölümü ise uterus duvarını geçer ve bu organın iç kısmına açılır. Oviduktun duvarı üç tabakadan oluşmuştur: tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza. Mukoza tek katlı prizmatik epitelden ve gevşek bağ dokusu lamina propriyadan oluşur. Mukoza, en çok ampullada olmak üzere lümeneye doğru uzunlamasına kıvrımlar içerir. Epiteli, silli ve salgılayıcı iki tip hücre içerir. Silyalar uterusu doğru hareket ederek oviduktun yüzeyini örten ince visköz bir sıvı tabakasının hareketini sağlar. Bu sıvı esas olarak silyalı hücreler arasına dağılmış

salgılayıcı hücrelerin ürünlerinden oluşur. Ovidukt epitelinin salgısı oosit için besleyici ve koruyucu işlevlere sahiptir. Aynı zamanda, spermatozoonun kapasitasyonunu da sağlar. Ovidukt mukozasını kaplayan ince sıvı tabakanın hareketi ile birlikte kas tabakasının kasılmaları ovum ya da zigotun uterusu doğru taşınmasına yardım eder. Bu sıvı akımı aynı zamanda uterusun periton boşluğuna mikroorganizmaların geçişine engel olur. Ovidukt, sekonder oositin uterusu taşınmasını kolaylaştırır. Lümeni döllenmeye elverişli bir ortam oluşturur ve salgıları gelişmenin erken safhalarında embriyonun beslenmesine yardımcı olur. Döllenme, genellikle oviduktun ampulla bölgesinde olur (Şekil 2,3) ve türe özgü diploid kromozom sayısına ulaşır (Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Junqueira L.C. and Carneiro J., 2009).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Şekil 2.3: Kadın üreme organlarında spermilerin ilerlemesi ve sekonder oositin döllenmesi (Molecular Cell Biology, 2006).

2.1.1.3. Uterus

Uterus; armut biçimli, büyüklüğü değişken kalın duvarlı bir organdır. Dik durmaz, öne doğru mesanenin üzerine eğilmiş durumdadır. Uterus iki bölümden oluşur: 2/3 üst bölüm “korpus uteri” (7cm) ve 1/3 silindirik alt bölüm “serviks uteri” (3 cm), corpus uterinin öne bakan şişkin bölümüne “fundus uteri” denir.

Serviks vajinanın son bölümünün içine giren silindir biçimli bir yapıdır. Servikisin lümeni iç delik ile üstte uterus boşluğuna, dış delik ile altta vajina lümenine açılır.

Korpusun duvarı üç tabakalıdır:

Perimetriyum: En dışta miyometriyuma sıkıca yapışmış ince bir periton tabakasıdır.

Miyometriyum: Ortada yer alan bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşan uterusun en kalın tabakasıdır. Düz kas demetleri sınırları iyi belirlenemeyen dört tabaka oluşturur. Birinci ve dördüncü tabaka esas olarak longitudinal olup organın uzun eksenine paralel yerleşmiş liflerden oluşur. Orta tabakalar ise daha büyük kan damarlarını içerir. Gebelik sırasında, miyometriyum hiperplazi ve hipertrofi ile çok büyür. Gebelikte düz kas hücreleri protein sentezleyen hücre özelliklerini gösterir ve aktif olarak kollajen sentezler. Böylece, uterus kolajen içeriği önemli ölçüde artar. Gebelik sonrasında, bazı düz kas hücrelerinde bozulmalar görülür, bazılarının boyutları azalır ve kollajen enzimi etkisiyle yıkılır. Böylece uterusun boyutları gebelik öncesindeki yakını ölçülere iner (Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Sırmalı, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

Endometriyum: Epitel ile basit tübüler bezleri içeren lamina propriyadan oluşur. Bezler miyometriyuma yakın alt bölümlerinde bazen dallanmalar gösterir. Epiteli tek katlı prizmatiktir, silyalı hücreler ile salgılayıcı hücrelerden oluşur. Uterus bezlerinin epitelinde yüzey epitelinden farklı olarak silyalı hücreler çok azdır. Lamina propriyanın bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve bol miktarda amorf temel madde içerir. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla tip III kollajenden oluşmuştur. Endometriyum iki bölüme ayrılabilir:

Stratum bazalis, miyometriyuma komşu olan en alttaki bölümdür ve lamina propriya ile uterus bezlerinin başlangıç kısmını içerir.

Stratum fonksiyonalis ise lamina propriya ve bezlerin geri kalanını ve yüzey epitelini içerir. Stratum fonksiyonalis aylık döngüler sırasında büyük değişiklikler geçirirken, stratum bazalis hemen hemen hiç değişmeden kalır.

Endometriyumu besleyen kan damarları bu tabakanın büyük bir bölümünün periyodik olarak dökülmesinde özel bir öneme sahiptir. Arkuat arterler miyometriyumun orta tabakalarında dairesel olarak yerleşmiştir. Bu damarlardan endometriyumu besleyen iki grup damar çıkar. Bunlar, bazalisi kanlandıran düz arterler ve fonksiyonalse kan getiren spiral arterlerdir.

2.1.1.3. a. Serviks Uteri

Serviks uterusun alttaki silindirik kısmıdır ve histolojik olarak uterusun geri kalan kısımlarından farklıdır. Yüzeyde mukus salgısı yapan tek katlı prizmatik epitel bulunur.

Serviks az sayıda düz kas lifi içerir, esas olarak sıkı bağ dokusundan (%85) oluşur. Vajina lümenine doğru çıkıntı yapan serviksin dış kısmı ise çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Serviks mukozası oldukça dallanmış, “müköz servikal bezler” içerir. Bu mukoza menstrüel döngü sırasında büyük değişiklikler geçirmez ve menstrüasyon sırasında dökülmez. Gebelikte, servikal müköz bezler çoğalarak daha visköz ve bol mukus salgılar. Servikal salgılar oositin döllenesinde önemli bir rol oynar. Ovulasyon sırasında müköz salgılar sulanır ve spermin uterusu girmesine olanak sağlar. Luteal fazda ya da gebelikte, P₄ düzeyleri müköz salgıları değiştirerek daha visköz bir hal almasına neden olur ve böylece uterus gövdesine sperm ile mikroorganizmaların geçişi engellenir. Doğumdan önce servikte görülen genişleme ise, şiddetli kollajenolizise ve bunun yol açtığı yumuşamaya bağlıdır (Young and Heat, 2000; Michael H. Ross, 2003; Abraham L. Kierszenbaum, 2006; Sırmalı, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.1.1.4. Vajina

Vestibülden yukarı ve arkaya doğru uzanarak servikse ulaşan yaklaşık 7-10 cm uzunluğunda fibromusküler bir kanaldır ve duvarında genişlemeyi sağlayan kıvrımlar vardır. Vajinanın üst ucu genişleyerek içine serviksin oturduğu kadeh şeklindeki ön, arka ve yan forniksleri oluşturur. Vajina ön duvarı üretra ile yakın komşuluk halindedir ve hemen bunun üzerinde mesane tabanı yer alır. Arkada, vajinanın üçte bir alt bölümü perine ile rektumdan ayrılmıştır, vajinanın üst kısmı rektumla yakın komşudur. Arka forniksi de içeren üst dörtte birlik bölümü uterorektal poşun (Douglas boşluğu) peritonu ile sarılmıştır. Her iki yan forniksin hemen üstünde uterus arterleri ve ureterler bulunur. Vajina lümeni, keratinizasyon göstermeyen çok katlı yassı epitle döşelidir. Epitel yapısı menstrüel döngü boyunca östrojen ve P₄ oranlarına bağlı değişiklikler gösterir ve yüzey hücreleri hormonlarının etkisiyle sürekli dökülür. Dökülen bu hücrelerdeki glikojen, vajina florasında yer alan Döderlein basilleri tarafından laktik aside dönüştürülür. Bu nedenle vajina pH'sı asittir (pH 4-4,5). Laktik asitli ortam vajinayı enfeksiyonlara karşı korur. Çocukluk döneminde östrojen yetersizliği ve menopoza sonrası östrojen çekilmesi ile vajina pH'sı alkalene kayar. Bu durum, vajinal enfeksiyon gelişmesine zemin hazırlar. Vajinada bez bulunmaz; ancak komşu dokulardan gelen sıvılar vajina yüzeyini sürekli nemli tutar. Vajinanın arteriyel kan dolaşımını “internal iliak arter”in dalları olan “vajinal ve uterin arterler” sağlar. Venöz dolaşım ise “internal iliak venler” ile sağlanır.

2.1.2. Dış Genital Organlar (Vulva)

2.1.2. 1. *Labia majör:* Vulva, vaginal açıklığın her iki yanındada, yağ ve bağ dokusundan oluşan iki geniş deri kıvrımıdır. Yağ ve ter bezleri içeren labia majör'ün dış kısmında kıllar vardır, iç kısmında yoktur. Bu kıvrımlar önde simfisis pubis üzerinde birleşerek, erişkinde üzeri kıllarla kaplı olan mons pubisi oluşturur.

2.1.2. 2. *Labia minör:* Labia majörün iç kısmında, sınırları belirgin, iki taraflı deri kıvrımından oluşan labia minör bulunur. Üzerini saran deride kıl bulunmaz, ancak yağ bezleri ve az sayıda ter bezi içerir. Labia minör önde iki kısma ayrılır; üst bölümü klitorisi sararken arkada vajinal açıklıkla birleşir.

2.1.2. 3. *Vestibül:* Labia minörün arasındaki açıklığa vestibül adı verilir. Önde üretra ve her iki yanda paraüretral kanallar buraya açılır. Vajinal açıklık ince bir zar olan himen ile çevrelenmiştir. Himenin her iki alt yanında Bartholin bezleri ve kanalları yer alır. Erkekteki penisin karşıtı olan klitoris erektil bir organdır.

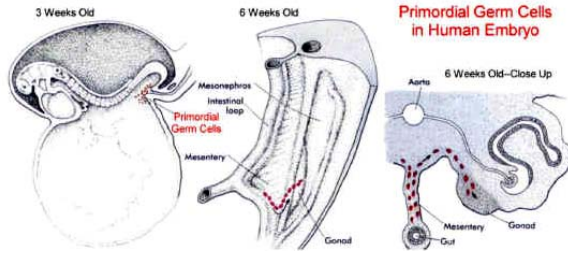
Dolaşım: Dış genital organlar internal pudental arterin dalları, internal iliak arterin dalları ve femoral arterin dalı olan eksternal pudental arter ile kanlanır. Ven sistemi ise cinsel ilişki sırasında ve daha büyük oranda gebelik süresince dilate olan venöz pleksuslardan oluşur. Venlerin büyük çoğunluğu arterlere eşlik eder. Ancak klitoristen kanı toplayan venler vajinal ve vezikal venöz pleksuslarla birleşir.

2.2. Embriyoloji

İnsan gelişimi; bir oositin bir sperm tarafından döllenmesiyle başlayan ve kesintisiz devam eden bir süreçtir. Development (gelişme); mitoz (çoğalma), migrasyon (göç), hipertrofi (büyüme), diferansiasyon (farklılanma) ve apoptoz (hücresinin programlı ölümü) olarak sıralanabilen 5 histofizyolojik olayı içerir. Bu olayların sonucunda, döllenmiş ovumdan çok hücreli insan oluşur (Carlson, 1996; Sadler, 2004; Sırmalı, 2006; Moore and Persaud, 2009).

2.2.1. Gametogenez: Dişi ve erkek gametler; gelişimin 2. haftasında epiblasttan kaynaklanan ve daha sonra vitellus kesesinin duvarına yerleşen primordiyal germ hücreleri (PGH)'nden gelişir (Şekil 2.4). 3 haftalık embriyoda PGH'leri; yolk kesesi duvarında, allantoise yakın, gelecekteki umbilikal kord yakınında endoderm hücreleri

arasında yer almaktadır. PGH, 4.haftada, filopdialarıyla amipsi hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerlerler, embriyonun arka duvarında gelişen gonadlara göç etmeye başlar (Tekelioğlu, 1995; Sadler, 2004; Sırmalı, 2009; Moore and Persaud 2009).



Şekil 2.4: 3.haftalık embriyoda vitellüs kesesinin duvarından PGH'nin son barsağın mezenteri boyunca gonadal çıkıntıya göçü görülüyor (Sadler, 2004; Moore, 2003).

Gonadal köprüler, 4-5 haftada kolayca tanınabilir; kız embriyoda oositi, erkekte spermatogonyumları geliştirecek olan PGH'lerini içerirler. PGH cinsiyet hücrelerine gelişen öncül hücrelerdir. PGH, ekstragonadal olarak doğarlar ve genital çıkıntıları oluşturacak somatik dokular aracılığı ile göç ederler. PGH'lerinin orijini ve migrasyonu üzerine "alkaline phosphatase" bir germ hücre marker enzimi olarak kullanılır. PGH'nin göç yolunu çizmesinde genital çıkıntıdan salgılanan bazı kemotaktik salgıların olduğuna dair kanıtlar vardır. PGH'leri, ECM komponentleri sayesinde genital çıkıntılara doğru yollarını bulabilirler. Bu yollarda fibronektin belirlenmiştir. Mutantlarda integrin eksikliği nedeniyle PGH'nin gonadlara göçündeki başarısızlık olduğuna dair kanıtlar, integrinlerin PGH'nin göçüyle ilgili olduğunu göstermiştir. Integrinler hücre yüzeylerinde yer alır ve bazı moleküller (fibronektin) için reseptör işlevine sahiptir. Bu göçü 5. haftanın sonunda tamamlayan hücreler; göç sırasında ve gonadlarda mitoz bölünmeyle sayılarını artırır; gonadlarda gamet öncülü hücrelere farklılanır, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kıvrımları işgal eder. PGH, genital kıvrımlara gelmezse gonadlar gelişemez.

Gonadlar üç kaynaktan köken alır:

Posterior abdominal duvarın mezoteli (spesifik epitelyal hücrelerden kızlarda follikül epitel hücreleri-granüloza hücreleri / erkeklerde ise Sertoli hücreleri gelişir), bunun altında

“embriyonik mezenşimal bağ dokusu” (kızlarda teka hücreleri/ erkeklerde Leydig hücreleri gelişir) ve PGC’leri, gonadların over veya testislere farklılanmasında belirleyici etkiye sahiptir ve genital çıkıntılarda PGH’leri dişi embriyoda oogonyum veya erkek embriyoda spermatogonyuma farklılanırlar. Gonadal köprülerin formasyonu her iki cinsten birbirine benzer, daha sonra gonadların farklılanması birçok genlerin etkisini gerektirir: SF-1 (Steroidogenic factor 1), DAX-1 (Dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1), SOX-9 (SRY-related high mobility group box), vs. Bu genlerden biri işlevsel olmazsa, o zaman gonadal köprü formasyonu gelişmez ve testisler ile ovaryumlar meydana gelmez.

Spermatogonyum ve oogonyum, vücuttaki somatik hücreler gibi toplam 23 çift kromozoma sahip olup diploittir. Bu hücreler, erkeklerde spermatogenez, dişilerde oogenezi ile gametleri üretirken mayoz bölünmeye uğrar. Bunun sonucunda gametlerin kromozomu 23 adete iner ve bunlara haploid denir. Gelişmekte olan gametler, sitoplazmik modifikasyona da uğrarlar ve erkeklerde sperm, dişilerde ise sekonder oosit oluşur. Sperm ve oosit, oldukça özelleşmiş üreme hücreleridir.

Erkeklerde, spermatogonyum oluşumu ve spermatogenez testisin seminifer tübüllerinde olur. Ancak, spermatogenez puberteden önce başlamaz. Kızlarda ise tüm primer oositler fetal yaşam sırasında üretilir. Bununla beraber, mayozun başlamasından hemen sonra, bu hücreler bir bekleme dönemine girerler ve bu evrede puberte öncesine kadar beklerler. Fetal yaşamın 3. ve 5. ayları sırasında oogonyum birinci mayoz bölünmeye girer; ancak bölünme diploten evresinde durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez. Bu hücreler primer oositlerdir ve folliküler hücreler olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Gebeliğin 7. ayına ulaşıldığında, oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak primer oositlerin çoğu atrezi olayı ile dejenere olur. Puberteden sonra her ay, birkaç oosit ve bunları çevreleyen folliküller gelişir. Bu gelişme, hipofizden salgılanan gonadotropik hormonların etkisi altındadır. Bu folliküllerden yalnızca bir tanesi tümüyle olgunlaşır ve ovulasyonla ovaryumdan dışarıya atılır. Atrezi nedeniyle pubertede yaklaşık 300.000 olan oosit sayısı 40-45 yaş dolaylarında 8000’e düşer. Her menstrüel döngüde genellikle tek bir sekonder oosit serbest bırakıldığından doğurganlık çağında sadece 450 kadar oosit salınmış olur. Tüm diğer oositler atrezi yoluyla ortadan kaldırılır. Ovulasyondan sonra sekonder oosit, sperm tarafından döllenirse 2. mayoz bölünmesini tamamlar ve ovum oluşur. Döllenme olmazsa, mayoz bölünme tamamlanmaz ve sekonder oosit menstrüel kanama ile dışarı atılır (Young, 2000; Gartner, 2001; Sırmalı, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009; İrez, 2010).

2.2.2. Menstrüel Döngü

Hipofizden salgılanan FSH ve LH'nin etkisiyle, ovaryumlarda üretilen östrojen ve P₄, dişi üreme sistemini kontrol ederler. Epitel hücrelerinin ve bağ dokusunun çoğalması ve farklılaşması bu hormonların etkisiyle gerçekleşir. Hipofizin ön lobunun uyarımı altındaki ovaryum hormonları ve endometriyum menstrüel döngü sırasında yapısal değişikliklere uğrar. Menstrüel döngü süresi değişkenlik göstermekle beraber ortalama 28 günde bir tekrarlanır. Bu döngüler genellikle 12-15 yaşlar arasında başlar ve 45-50 yaşına kadar devam eder. Menstrüel döngüler, oosit üretimi ile ilişkili olarak ovaryumda oluşan değişikliklerin bir sonucu olup dişi sadece menstrüasyon gördüğü yıllar boyunca fertil kalır. Bu durum seks yetisinin menopoza sonlanması anlamına gelmez, sadece fertilité sona ermiştir. Pratik nedenlerle menstrüel döngünün başlangıcı menstrüel kanamanın görüldüğü gün olarak alınır. Menstrüel akıntı, dejenerasyona uğramış olan endometriyumun yırtılan kan damarlarından gelen kanla karışımından oluşur. Menstrüel faz ortalama 3-4 gün sürer. Proliferatif faz 5-14. günler arasını kapsar. Sekretuar faz ise ovulasyonla başlar ve yaklaşık 13-14 gün sürer. Her fazın süresi değişebilir. Belirtilen aralıklar sadece ortalama değerlerdir. Menstrüel döngüde bir proliferatif faz, bir sekretuar (luteal) faz ve bir menstrüel faz bulunmaktadır. Döngü süresince görülen yapısal değişiklikler kademeli olarak gerçekleşir. Burada bahsedilen fazlar arasındaki belirgin ayrımlar gerçekte eğitim amaçlıdır.

Proliferatif Faz: Menstrüel fazdan sonra, uterusun mukozası incelmıştır (yaklaşık 0,5 mm). Proliferatif faz aynı zamanda ovaryum folliküllerinin geliştiği ve östrojenlerin üretildiği dönemle çakışması sebebiyle "folliküler faz" olarak da bilinir. Tüm proliferatif faz boyunca hücresel çoğalma devam eder. Böylece hem bezler, hem de endometriyumun yüzey epiteli yenilenir. Ayrıca, bağ dokusu hücreleri çoğalır ve lamina propria içinde temel madde birikir. Bu da endometriyumun bir bütün olarak büyümesine sebep olur. Proliferatif fazın sonunda, endometriyum 2-3 mm kalınlığa ulaşır. Tek katlı prizmatik epitel hücreleri içeren bezler dar lümenli düz tübüller oluştururlar. Bu faz esnasında, epitel hücrelerinde kaba ER sisterna sayısında ve Golgi kompleksi boyutlarında giderek bir artış izlenir ve bu şekilde hücreler salgılama aktivitesi için hazırlık yapar. Spiral arterler yenilenmekte olan stroma içine doğru ilerler.

Sekretuar ya da Luteal Faz: Bu faz ovulasyondan sonra başlar ve yaklaşık 13-14 gün sürer. CL tarafından salgılanan P₄ hormonunun etkisi altındadır. Östrojenin etkisi ile gelişmiş olan

bezler, P₄ etkisiyle glikoproteinleri salgılar. Bu glikoproteinler implantasyondan önce embriyonun en büyük beslenme kaynağı olacaktır. Bezler fazlasıyla genişler ve kıvrıntılı hale gelir ve epitel hücreleri nükleuslarının altında glikojen depolamaya başlar. Daha sonra, glikojen miktarında düşme olur. Glikoprotein salgı ürünleri, bezlerin lümenini genişletir. Bu fazda endometriyum, salgı ürünlerinin birikmesi ve stromadaki ödemin bir sonucu olarak maksimum kalınlığa (5 mm) ulaşır. Mitozlara sekretuvar faz esnasında nadir olarak rastlanır. Spiral arterlerin uzaması ve kıvrılması devam eder ve endometriyumun yüzeysel kısmı içine uzanır. Venöz ağ giderek daha kompleks olur ve venöz boşluklar oluşur. Bu evrenin en belirgin özelliği, direkt arteriovenöz anastomozların oluşmasıdır. P₄, miyometriyumun düz kas hücrelerinin kasılmasını inhibe ederek embriyonun implantasyonunu tehlikeden korur.

Menstrüel Faz: Ovaryum tarafından serbest bırakılan sekonder oositin döllenişi ve implantasyonu gerçekleşemediği zaman, CL'un işlevi yaklaşık 14 gün sonra kendiliğinden durur. Bu durumda kandaki P₄ ve östrojen düzeyleri süratle düşer. Bu hormonların etkisiyle gelişmiş olan endometriyumda gerileme başlar ve endometriyum kısmi olarak dökülür. İmplantasyon gerçekleştiği takdirde gelişmekte olan embriyo tarafından hCG sentezlenmeye başlar. Bu hormonun etkisiyle CL yaşamına devam eder ve menstrüasyon oluşmaz.

Sekretuvar fazın sonunda, spiral arterlerin duvarları kasılır, kan akımı engellenir ve oluşan iskemi damar duvarının ve endometriyumun fonksiyonals tabakasının nekrozuna neden olur. Bu esnada kasılan damarların yukarısında bulunan kan damarları yırtılır ve kanama başlar. Endometriyum kısmen ayrılmış bir hale gelir. Dökülen miktar farklı kadınlarda hatta aynı kadında farklı dönemlerde bile değişkenlik gösterir. Menstrüel fazın sonunda, endometriyum bezlerinin bazal uçlarını içeren bazal tabakadan başka bir şey kalmaz, buradan bez hücrelerinin çoğalması ve bunların yüzeye göç etmeleri ile proliferatif faz ve döngü tekrar başlar (Larsen, 1993; Ross, 2003; Kierszenbaum, 2006; Junqueira and Carneiro, 2009).

2.2.3. a. Fertilizasyon olmuşsa:

Zigot yarıklanır ve blastosist gelişir. Sekresyon evresinin 6.günü (siklusun 20. günü), blastosist endometriyuma implante olmaya başlar. Koryonun sinsityotrofoblast tabakasından salgılanan hCG, CL'un P₄ ve östrojen salgılamaya devam etmesini sağlar. Sekresyon evresi devam eder ve menstrüasyon olmaz.

2.2.3.b. Fertilizasyon olmamışsa:

CL dejenere olur. Sekresyon evresinin son günü östrojen ve P₄ düzeyleri düşer ve endometriyum iskemik hale gelir, menstrüasyon başlar. CL'un dejenere olması sonucu azalan hormon –özellikle P₄ – miktarı spiral arterlerin kasılmasına neden olur. Kasılmalar iskemiye

sebepler olur ve endometriyum soluklaşır. Vasküler değişiklikler ve hormon düzeyinin düşmesi bez salgılamasını da durdurur, interstisyel bağ dokusundaki sıvı azalır; böylece endometriyum önemli ölçüde büzülür. İskemik evrenin sonuna doğru, spiral arterlerdeki kasılmaların süresi uzar. Kasılmaların uzaması, venöz staza ve yüzeysel dokunun iskemik nekrozuna neden olur. Hasarlanmış damar duvarı yırtılır ve kan çevredeki bağ dokusuna sızar; sızan bu kan, bağ dokusunda küçük havuzcuklar oluşturur ve endometriyum yüzeyi parçalanır. Böylece, uterus lümenine bir kanama (20–80 ml) ile endometriyum parçaları (kompakt tabakanın ile spongiyöz tabakanın çoğu), döllenmemiş oosit vajinal yolla dışarıya atılır. Geride kalan bazal tabaka ve spongiyöz tabakanın kalıntıları, proliferasyon evresinde rejenere olur. Gebelik olmuşsa, menstrüel döngü durur ve endometriyum gebelik evresine girer. Doğumdan sonra (6–10 hafta sonra) ovaryan ve menstrüel döngü yeniden başlar.

2.2.3.c. Gametlerin Taşınması

Gametlerin taşınması, oosit ve spermin fertilizasyonun olağan yeri oviduktun ampulla bölümüne taşınmasını ifade eder.

2.2.3.d. Oositin taşınması

Ovulasyondan hemen önce, oviduktlar ritmik olarak kasılmaya ve fimbriyalar da ovaryumun yüzeyine doğru uzanmaya başlar. Oosit ve onu çevreleyen granüloza hücreleriyle birlikte ovidukt içine doğru çekilmesini, fimbriyaların ovaryumların üzerini süpürür tarzındaki hareketleri ve fimbriyaları döşeyen silli epitelin hareketinin sağladığına inanılır. Ovidukt lümenine ulaşan oositin etrafındaki granüloza hücreleri, sitoplazmik uzantılarını zona pellusida'dan çekerek, oositin serbest kalmasını sağlar. Ovidukt içine ulaşan oosit, bu tüplerin duvarındaki kasların kasılmasıyla uterusu doğru itilir. Bu yolculuğun hızı, ovulasyondan önce ve sonraki endokrin etkenlerden etkilenirse de, insanda zigotun uterus lümenine ulaşması, yaklaşık 3–4 gün içinde tamamlanır.

2.2.3.e. Spermin taşınması

İnsanda spermiler, inseminasyonla vajinanın üst bölümüne bırakılır. Spermilerin yolculuğu buradan başlar ve fertilizasyonun olacağı oviduktun üst bölümüne kadar devam eder. Spermilerin büyüklükleri dikkate alınır, katedecekleri yol oldukça uzundur (Şekil 2,3). Ayrıca yol boyunca, asit sekresyonu gibi kimyasal tehlikeler, servikal kanalın kıvrılması ve sıkışması ya da oviduktun daralması ve tıkanması gibi mekanik engellerle de karşılaşabilirler. Ancak, sağlıklı genç bir erkekte bir ejakülasyonla dışarıya atılan semen içinde çok fazla

sayıda (200–300 milyon) sperm bulunduğundan, normal şartlar altında, bir bölümü (yaklaşık 300–500 tane) oosite ulaştığında, ona penetre olma ve dölleme yeteneğini yitirmemişlerdir. Sperm için ilk bariyer, vajinanın üst bölümünün doğal asiditesidir. Bu asiditenin görünen işlevi, bakteriyostatik bir ortam olarak etki etmektir. Bununla beraber, seminal sıvı, asiditeye karşı güçlü bir tampon etkisi yapar. İnseminayondan sonra 8 saniye içinde vajinal pH 4.3'den 7.2'ye yükselir. Sperm bir bölümü, vajinanın üst bölümünden oldukça hızlı olarak dişi üreme kanalına geçer (30 dakikadan daha az bir zamanda ovidukta ulaşır). Bu hız, sperm kendi başlarına yüzme hızı (yaklaşık 2–4 mm/dak.) ile karşılaştırıldığında oldukça yavaştır. Deneysel çalışmalar, sperm iletilmesinin başlangıçtaki hızlı evresinde, hareketsiz olan sperm de hareketli olanlarla aynı zamanda ovidukta ulaştığını göstermiştir. Hızlı sperm hareketini sağlayan neden, seminal sıvının vajinanın üst bölümünün kasılmasını uyarmasıdır. Bu kasılmalar, sperm servikal kanala doğru itilmesini sağlar. Sperm, kendi yüzme hareketleriyle ilerledikleri serviks içinde yavaş iletilme evresine girerler ve servikal kanalı döşeyen çok sayıda düzensiz kriptalara takılır. Normalde, servikal kanalı dolduran mukusun viskozitesi yüksektir. Ovulasyon sırasında hormonların etkisiyle viskozite azalır; böylece, sperm ilerlemesi kolaylaştırılır. Sperm servikal kanaldan yavaşça uterus kavitesine geçer. Sperm uterus içindeki hareketi tümüyle anlaşılmış değildir; ancak, birçok memelide, seksüel orgazmın en yüksek noktasında, uterusun düz kaslarında spazm şeklinde kasılmalar olur. Bu kasılmalar, vajinaya bırakılmış sperm uterusu doğru çekilmesini sağlar (Sırmalı, 2009).

2.2.3.f. Sperm Olgunlaşması

Taze ejakulattaki sperm oositi dölleyebilmesi için bir olgunlaşma evresi geçirmesi gerekir. Yaklaşık 7 saat süren kapasitasyon sırasında, sperm akrozom yüzeyinden glikoprotein kılıf ve seminal proteinler sıyrılır. Membran kolesterol/fosfolipit oranı ve membran potansiyeli değişmeye başlar. Kapasite olmuş spermde morfolojik bir değişiklik görülmemekle beraber çok aktif hale geldikleri görülür. Sperm genellikle uterus ya da ovidukta, dişi genital sistemin bu bölümünün salgıladığı maddeler tarafından kapasitasyonu gerçekleşir. IVF yönteminde kapasitasyon, sperm belli bir medyumda inkübe edilmesiyle sağlanır. Kapasitasyonun tamamlanması, akrozom reaksiyonunun olmasını sağlar.

Sperm akrozomunda bulunan '*angiotensin converting enzyme (ACE)*' olasılıkla, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonu uyarır. Akrozom reaksiyonunun, sperm oosite birleşmeden önce tamamlanması gerekir. Kapasite olmuş sperm sekonder oositi çevreleyen korona radyata

ile temas ettiklerinde akrozomda delinmelerin oluşmasıyla sonuçlanan bir dizi değişimler başlar. Akrozomun dış membranı ile spermin plazma membranı birçok noktadan birleşir. Bu noktalarda plazma membranı da delinir ve akrozom içeriği dışarıya boşaltılır. Akrozomal enzimlerden hyaluronidaz, korona radyata bariyerine penetrasyonu; tripsin benzeri maddeler, zona pellusida'nın sindirimini ve zona lizin, spermin zona pellusidayı geçmesi için yardımcı sağlar (Sırmalı, 2009).

2.2.3.g. Gametlerin Yaşam Süreleri

İnsan oositi, ovulasyondan sonraki 12 saat içinde döllenir. In vitro çalışmalar, oositin 24 saat sonra döllenemediğini, bundan hemen sonra hızla dejenere olduğunu göstermiştir. İnsan spermelerinin çoğu olasılıkla, dişi genital kanalında 48 saatten fazla yaşamaz. Bazı spermeler, serviks mukozasının kıvrımları arasında kalabilir ve yavaş yavaş servikal kanala verilir ve uterus yoluyla tuba uterinaya ulaşır. Spermelerin kısa bir süre için serviksde tutulması ve daha sonra yavaş yavaş salınması, fertilizasyon şansını artırır. Spermeler uygun yöntemlerle düşük sıcaklıkta dondurularak uzun süre saklanabilir. Bu spermeler uygun yöntemlerle çözüldükten sonra, oositi dölleyebilir (Sırmalı, 2006; İrez, 2010).

2.2.3.1. Fertilizasyon (Döllenme)

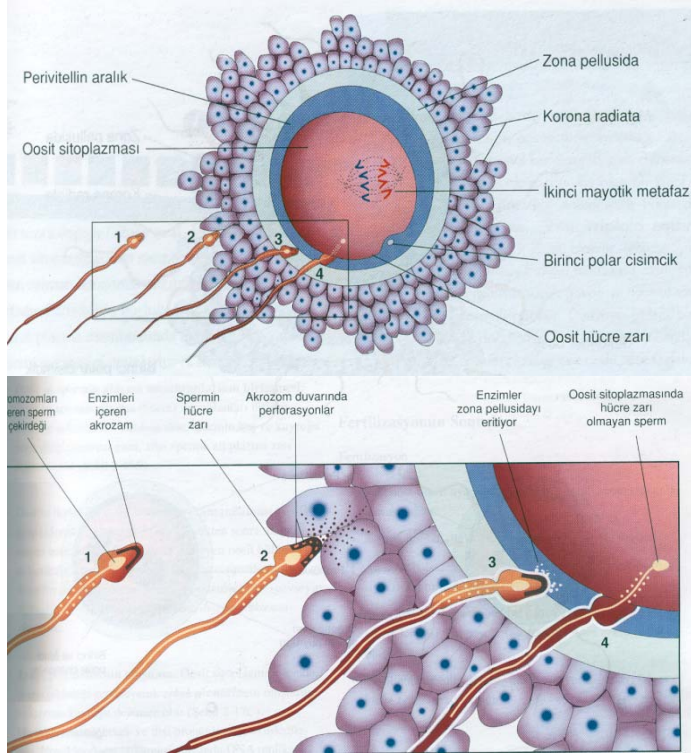
Döllenme, genelde oviduktun en uzun ve geniş segmenti ampullada gerçekleşir. Oosit burada döllenmemişse, tüplerden geçerek uterusu ulaşır ve burada dejenere olur ve rezorbe edilir. Döllenme tüpün diğer segmentlerinde olabilir de, uterusda olmaz. İnsanın gelişimi, oositin döllenmeyle başlar. Döllenme; sperm ve oositin temas etmesiyle başlayan ve zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz evresinde, anneye ve babaya ait kromozomların kaynaşmasıyla sonlanan olaylar dizisidir. Bu olaylar dizisinin herhangi bir evresinde oluşan bir aksama, zigotun ölmesine neden olabilir. Gametlerin yüzeyindeki 'karbonhidrat bağlayan moleküller'; olasılıkla, döllenmenin gametlerin tanınmasından hücrelerin birleşmesine kadar olan bölümünden sorumludur. Döllenme yaklaşık 24 saat sürer.

2.2.3.2. Döllenmenin Evreleri

Spermelerin korona radyata'yı geçmesi: Dişi genital kanalına bırakılan 200–300 milyon spermin ancak 300–500'ü döllenme bölgesine ulaşabilir. Döllenme için bunlardan yalnız bir tanesi gereklidir. Diğerlerinin, döllenmeyi sağlayacak sperme, oositi saran korona radyata'yı

delmesinde yardımcı olduğu düşünülmektedir. Hyalürinidazın korona radyata hücrelerinin birbirinden ayrılmasında önemli bir enzim olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda, korona hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasının, hyalürinidaz ve tubal mukoza enzimlerinin kombine etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Sperm kuyruğunun hareketi de korona radyata'nın penetrasyonunda önemlidir.

Spermlerin zona pellusida'ya penetrasyonu: Zona pellusida, sekonder oositi koruyan ikinci bariyerdir. Spermin akrozomundan salınan enzimler (esterazlar, akrozin ve nöraminidaz), litik etkiyle zona pellusida'da spermin geçeceği bir yol açar (Şekil 2,5). Bu enzimler içinde proteolitik bir enzim olan akrozin, en önemli olanıdır. Sperm zona pellusida'ya bir kere dokunduktan sonra sıkıca tutunur ve hızla penetre olur. Bu aşamada spermin başı oosit yüzeyi ile temas ettiğinde, zona pellusida'nın geçirgenliği değişir (*zona reaksiyonu*). Bundan sonra zona pellusida, diğer spermlere karşı geçirgenliğini kaybeder. Bu ekstrasellüler glikoprotein kılıfın kompozisyonu, döllenmeden sonra değişir. Zona reaksiyonunun, oosit plazma membranının hemen altında bulunan kortikal granüllerden salınan lizozomal enzimlerin etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Perivitellin aralığa salınan bu granüllerin içeriği, oositin plazma membranında da değişikliğe neden olur. Bu değişikliğin sonucunda, plazma membranı da diğer spermlere karşı geçirimsiz olur. Böylece polispermi önlenmiş olur. Nadiren, iki sperm ovuma penetre olabilir. Bu durumda embriyo 69 kromozomlu olur; ancak, böyle bir embriyo yaşamaz.



Şekil 2.5: Spermilerin korona radiata hücrelerini ve zona pellusia'yı geçişi (Moore and Persaud, 2003).

Oosit ve sperm membranlarının birleşmesi. Sperm in oositin hücre membranına temasıyla, iki plazma membranı kaynaşır. Akrozomal kepi örten plazma membranı akrozom reaksiyonu sırasında kaybolduğundan asıl birleşme, oosit membranı ile sperm in baş bölümünün arka tarafını örten membran arasında olur. İnsanda, sperm in hem baş ve hem de kuyruk bölümü oosit sitoplazması içine girer, plazma membranı dışarda kalır (Şekil 2.5).

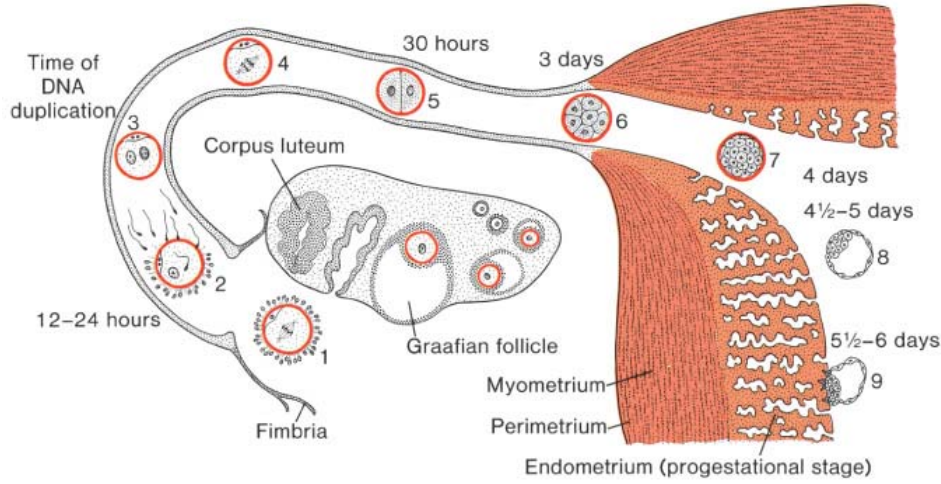
Oositin ikinci mayoz bölünmeyi tamamlaması ve dişi pronükleusun oluşması. İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekleyen oosit, sperm in sitoplazmasına girmesiyle, bu bölünmeyi tamamlar ve ovum ile ikinci kutup cismini oluşturur. Bundan sonra ovumun nükleusuna dişi pronükleusu denir.

Erkek pronükleusunun oluşumu. Ovumun sitoplazması içinde sperm in nükleusu genişleyerek erkek pronükleusunu yapar ve sperm in kuyruğu dejenere olur. Dişi ve erkek pronükleusları morfolojik olarak ayırd edilemez. Pronükleusların büyümesi sırasında, DNA'ları replike olur.

Pronükleusların mitoz bölünmeye hazırlığı. Dişi ve erkek pronükleuslar birbirlerine yaklaşırlar ve membranları kaybolur. DNA sentezinden hemen sonra, kromozomlar mitoz bölünmeye hazırlık olarak iğ iplikleri üzerinde yer alırlar. Anneden gelen 23 ve babadan gelen 23 kromozom sentromerde uzunlamasına ayrılır ve yavru kromatidler, zigotun her hücresi normal diploid sayıda kromozom ve DNA içerecek şekilde, karşı kutuplara doğru göç eder. Yavru kromatidlerin bu hareketi sırasında, hücrenin yüzeyinde derin bir yarıklık belirir ve sitoplazması ikiye bölünür. Anne serumunda, fertilizasyondan 24–48 saat sonra trofoblastik hücrelerden salgılanan ve bir immün baskılayıcı protein olan erken gebelik faktörü (EGF, EPF), görülür. EGF, gelişimin ilk 10 günü için gebelik testinin temelini oluşturur.

2.2.3.3. Döllenmenin sonuçları:

Döllenme; sekonder oosit'in 2. mayoz bölünmesini tamamlayabilmesi için uyarır. Kromozomların diploid sayıya (46) ulaşması sağlanır; anne ve babaya ait kromozomların karışmasıyla türlerin çeşitliliği sağlanır ve embriyonun kromozomal cinsiyeti belirlenir. Döllenme X kromozomuna sahip bir spermle olmuşsa çocuk kız (44+XX), Y kromozomuna sahip bir spermle olmuşsa çocuk erkek (44+XY) olacaktır. Bu nedenle, doğacak çocuğun cinsiyeti anneye değil, babaya bağlıdır. Döllenme, ovumun metabolik aktivasyonuna neden olur ve zigotun hücre bölünmesini başlatır (Şekil 2.6). Kromozomlarının yarısı anneden yarısı da babadan geldiği için, zigotun genetik olarak bir benzeri yoktur. Mayoz bölünme, anneden ve babadan gelen kromozomların germ hücreleri arasında bağımsız olarak dağılmasını sağlar. Anneye ve babaya ait kromozomların segmentlerinin yeniden yerleşimi sonucu oluşan crossing over, genlerin birbirine karışmasına neden olur ve genetik materyalin rekombinasyonu sağlanır.



Şekil 2.6: Döllenme, yarıklanma, implantasyon – gelişimin ilk haftası (Sadler, 2004)

2.2.4.5. Zigotun Yarıklanması

Zigot, ovidukt içinde uterusu doğru ilerlerken, bir seri mitoz bölünme (yarıklanma) ile hücre sayısı giderek artar. Yarıklanma sırasında oldukça kalın olan zona pellusida henüz kaybolmadığından, her bölünmeden sonra oluşan blastomerler giderek küçülür. Bu yüzden bu sırada konseptusun tümü aynı hacimde kalır. Zigotun blastomerlere bölünmesi, döllenmeden yaklaşık 30 saat sonra başlar. Zigot sırasıyla ikiye, dörde, sekize bölünür ve bu bölünmeler böylece devam eder. Dokuz hücreli evreden sonra, blastomerlerin şekli değişmeye başlar ve birbirlerine sıkıca yapışarak, hücrelerden meydana gelmiş kompakt bir top oluşturur. Bu olaya “kompaksiyon” denir ve olasılıkla hücre yüzey adezyon glikoproteinlerinin katkısıyla gelişir. Kompaksiyon, hücreler arası etkileşimi büyük ölçüde artırır ve blastosistin iç taraftaki hücrelerinin, iç hücre kümesini (embriyoblast) oluşturmak üzere ayrılması için gerekli bir olaydır. Konseptusta hücre sayısı 12–15 blastomere ulaştığında, “Morula” adını alır. Morulanın içteki hücreleri (*iç hücre kümesi*), *dış hücre tabakası* denilen bir grup hücreyle çevrelenmiştir. Morula fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra yuvarlak bir biçim alır ve uterusu girer (Şekil 2.6).

2. 2.4. 6. Blastosist Gelişimi (Blastogenez)

Döllenmeden yaklaşık 4 gün sonra, morula uterusu gelir ve ortasında “blastosöl” denilen içi sıvı dolu blastosist boşluğu oluşur. Bu sırada endometriyum sekresyon evresindedir ve uterus kavitesi endometriyal bezlerin salgısıyla doludur. Uterus kavitesindeki sıvı zona pellusidayı geçerek bu boşluğu oluşturur. Blastosöl içindeki sıvı miktarı arttıkça, blastomerler iki gruba ayrılır. İlki ince bir dış hücre tabakası olup “Trofoblast” adını alır ve plasentanın

embriyonik bölümünü yapar. İkincisi iç hücre kümesi olup “Embriyoblast” adını alır ve embriyoyu yapacak olan merkezi yerleşimli blastomerlerdir. Gelişimin bu evresinde, yaklaşık 100 hücreden oluşmuş, ortası boş bir top şeklindeki konseptusa “Blastosist” denir. Embriyoblast, blastosöle doğru bir çıkıntı yapar ve trofoblast blastosistin duvarını oluşturur. Blastosist, uterus salgısı içinde yaklaşık 2 gün yüzer durumda kalır; bundan sonra, zona pellusida yavaş yavaş dejenere olmaya başlar ve giderek tümüyle kaybolur. Zona pellusidanın dökülmesi, in vitro olarak da gösterilmiştir ve bu olay blastosistin hızla büyümesine ve implantasyonuna olanak sağlar. Blastosist uterusda yüzerken, endometriyum bezlerinin salgısıyla beslenir. Döllenmeden yaklaşık 6 gün sonra (menstrüel döngünün 20. günü), blastosist iç hücre kümesinin olduğu taraftan (embriyonik kutup) endometriyum epiteline tutunur. Endometriyal epitele tutunma olur olmaz, trofoblast hızla çoğalmaya ve iki tabakaya farklılanmaya başlar:

Sitotrofoblast. hücresel trofoblast denilen iç hücre tabakası,

Sinsityotrofoblast. sinsityal trofoblast denilen ve hücre sınırları görülmeyen çok nükleuslu sitoplazma kitlesi.

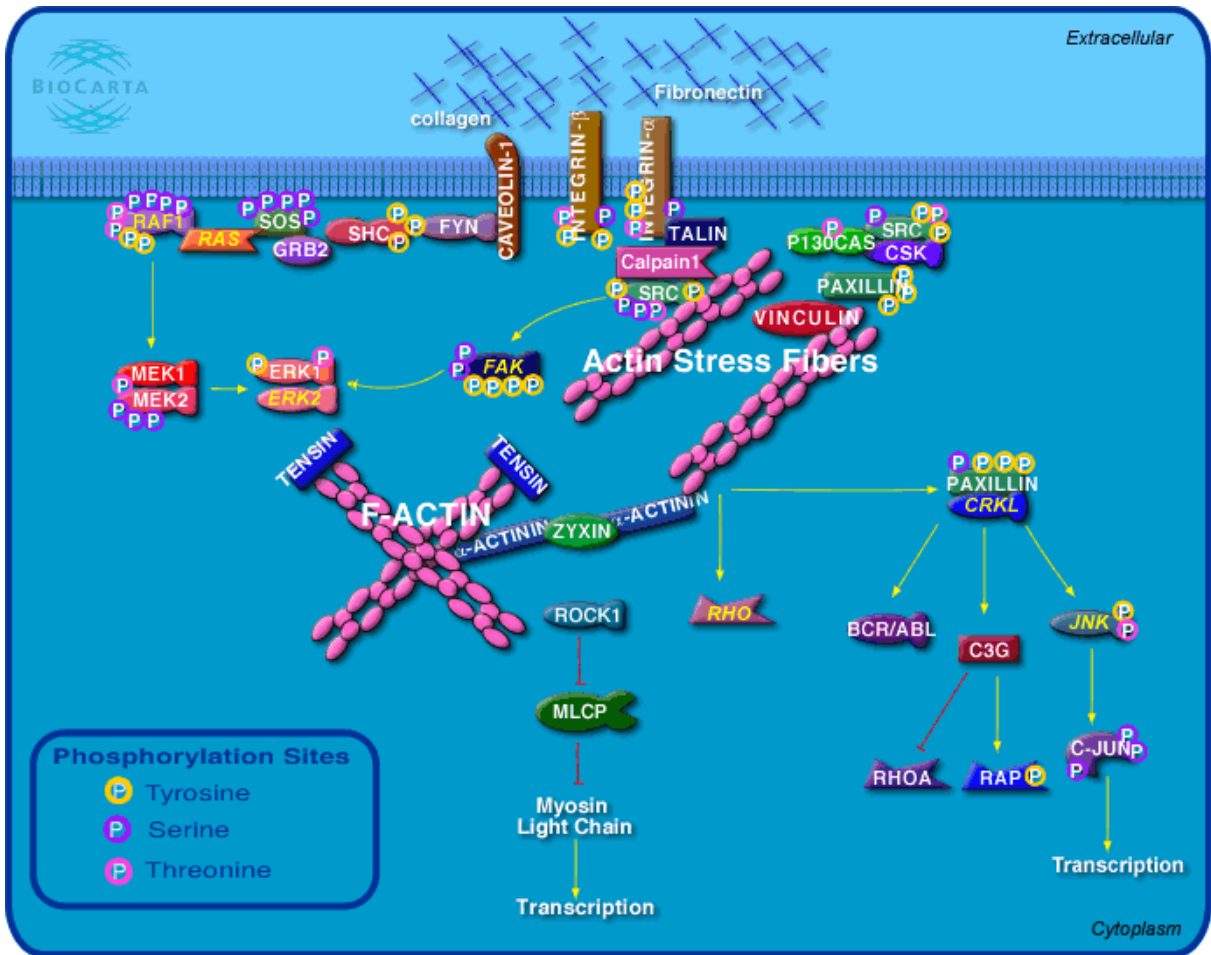
Trofoblastın farklılanması, hem iç ve hem de dış hücresel faktörler tarafından düzenlenir. Yaklaşık 6. günde, sinsityotrofoblast tabakasından uzanan parmak şeklindeki uzantılar, endometriyal epitelden geçer ve bağ dokusuna yayılır. Birinci haftanın sonunda, blastosist endometriyumun kompakt tabakasına yüzeyel olarak gömülmüştür ve aşındırdığı maternal dokudan beslenir. Sinsityotrofoblast maternal dokuyu aşındıran enzimler salgılayarak, blastosistin yerleşeceği bir oyuk açar. Yaklaşık 7. günde, iç hücre kümesinin blastosist boşluğuna bakan yüzünde hipoblast denilen bir hücre tabakası görülür. Bu tabaka, iç hücre kümesinden delaminasyonla oluşur.

2.3. Üreme Fizyolojisi ve Adezyon Molekülleri

Üreme fizyolojisinde CAM'lerinin çeşitli aşamalarda rolü olduğu saptanmıştır. CAM'lerinin biyolojik ve patolojik durumlarda işlevlerinin daha detaylı araştırılması gerektiği bildirilmiştir (Atabekoğlu ve ark., 2002).

2.3.1. İntegrin Ailesi

İnsan hücrelerinde, hücre-hücre ve hücre-ECM ilişkilerine katılan bir adezyon molekül sınıfıdır. Son yıllarda hücreler ile onu çevreleyen ECM protein komponentleri arası ilişki, integrin adı verilen ECM reseptörlerinin izole edilmesi ve nitelenmesinden sonra daha açık hale gelmiştir. (Ruoslahti et al., 1987; Hemler et al., 1990; Atabekoğlu ve ark., 2002). İntegrin ekstrasellüler adezyon proteinlerinin hücre iskeletine sıkıca tutunmasını sağlayan integral membran glikoproteinleridir; yani hücre içindeki aktin iskeletini hücrelerarası matrikse bağlarlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: İntegrin molekülü http://kugi.kribb.re.kr/.../BioCarta/h_integrinPathway/

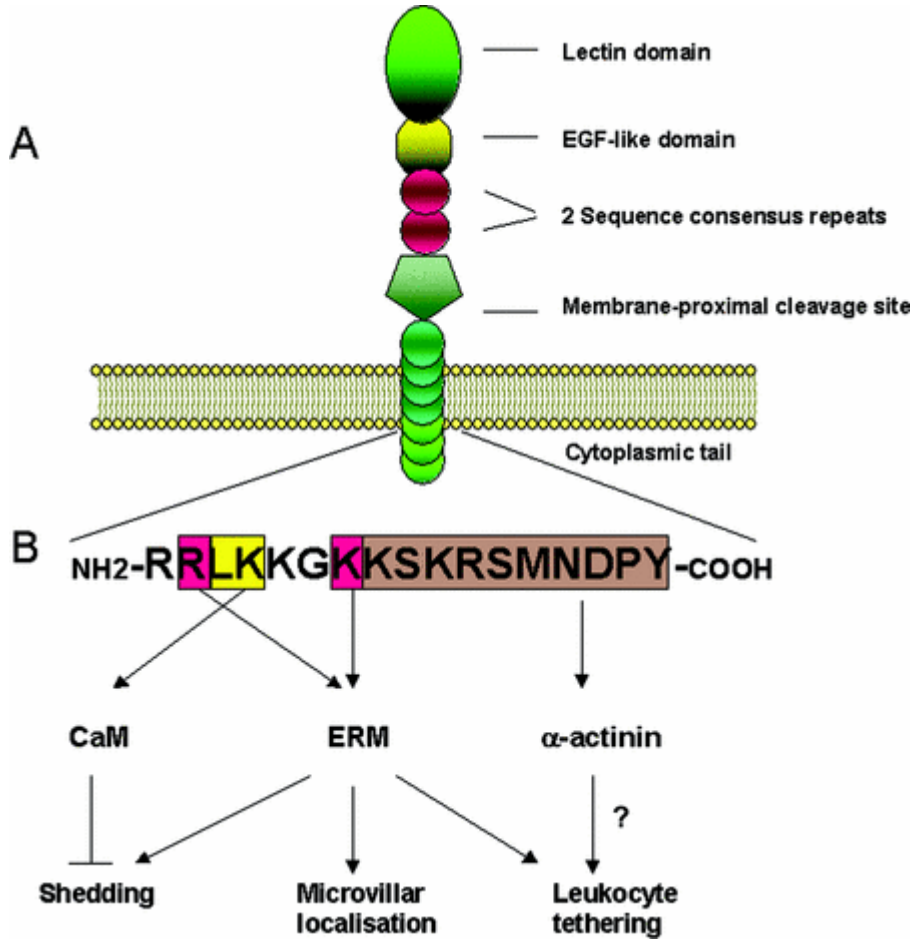
Embriyogenez’de hücrelerin hedeflerine ulaşmasında önemlidir. Ca^{2+} bağımlı olmayan yapışma molekülleri ve transmembran matriks reseptörleridir. İki alt üiteden oluşurlar. α ve β alt ünitelerinin farkı sonucunda 22 çeşit integrin molekülü vardır. İntegrinler kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlanmış hetero-dimerlerdir ve fibronektin, kollajen, laminin, ICAM (intersellüler hücre adezyon molekülü), VCAM (vasküler hücre adezyon molekülü)’ler için hücre yüzey reseptörleri içerirler. Hücre dışındaki ligandları fibronektin ve laminin’dir. (Hemler et al., 1990; Hynes Ro 1992; Hogervorst, 1991; Can, 2000). Hücreler sıklıkla özel ECM protein ligandlarıyla ilişkili çok sayıda integrin sergilerken, bazı durumlarda, iki integrin bir ligandı, ligand molekülünün farklı noktalarından tanıyabilir veya iki farklı integrin aynı ECM protein bölgesinden bağlanabilir. Yani çoğu integrin, adeziv ligandlar için çok spesifik değildir. Aynı zamanda iki integrinin bir ligandın aynı bölgesine bağlanması, mutlaka aynı fonksiyonda oldukları demek değildir (Hemler et al., 1990; Guan et al.,1990; Hall et al.,1990).

İntegrinler; endometriyal, desidual ve ekstravillöz sitotrofoblast (EVCT) hücrelerinde bulunurlar. Bunlar, hücre-hücre dışı matriks (bazal lamina) bileşenleri arasındaki adezyonda olduğu kadar, hücre-hücre arası adezyonda da yer alırlar (Merviel et al., 2001). Epitelyal integrinlerin luteal safhanın ortasında implantasyon penceresini çevreledikleri ve desidual integrinler oluşur oluşmaz bir üst regülasyondan geçtikleri görülmüştür (Grosskinsky et al., 1995) ve integrin alt üniteleri siklusun luteal safhası esnasında endometriyal epitelde eksprese edilmektedir. Farklı alt üniteleri menstrüel döngünün farklı günlerinde ortaya çıkmakta ve embriyo implante olduğunda (20-24. günler) bu alt üniteleri ile bir arada var olmaktadır. Bu açıdan implantasyon penceresi için iyi bir belirteçdir. Dönüştürücü Büyüme Faktörü- (Transforming Growth Factor- TGF)’ü azaltır, Interlökin-1 ve 6 (IL-1 ve 6) ve Tümör Nekroz Faktör- (TNF) v ’ü yükseltir. Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor-EGF), TGF- ve TGF- ekspresyonunu artırmaktadır (Duc- Goiran, 1999). Desidual stromal hücreler (DCM) tarafından salgılanan TGF- , metalloproteinaz doku inhibitörünü (TIMP-1) arttırarak trofoblastın total jelatinolitik aktivitesini inhibe etmektedir. Bu nedenle trofoblast invazyonunda düzenleyici bir rol oynadığı tahmin edilmektedir arttırmaktadır (Duc-Goiran et al., 1999; Bischof et al., 1998). IL-1 ve IL-2 ekspresyonunda, östrojen, P_4 ve hCG gibi hormonlar genel bir negatif modülasyon sergiler. Bu faktörler, trofoblast hücrelerinin çoğalma, invazyon ve farklılaşmasında rol aldıklarından trofoblast işlevlerine katılan kilit faktörlerden olabilirler (Duc- Goiran et al., 1999; Sunder and Lenton, 2000; Das et al., 2002).

2.3.2. Selektin Ailesi

Selektin ailesinde L-selektin, P-selektin ve E-selektin bulunur (Şekil 2.8). Ayrıca işlevsel olarak CAM olarak klasifiye edilen bir tip adezyon molekülü de CD44'tür. CD44 bir integral membran glikoproteinidir, HA reseptör işlevine sahiptir. CD44 epitelyal, mezenşimal, lenfoid ve gliyal hücrelerde eksprese olur. HA, ECM'in önemli kompartmanını oluşturur, CD44'ün başlıca ligandıdır, ama tek ligandı değildir. Diğer CD44 ligandları; ECM komponentlerinden kollajen, fibronektin, laminin, ve kondroitin sülfattır (Naot et al., 1997).

Kadherin de kalsiyum bağımlı hücre-hücre aracılı transmembran adezyon molekülüdür. E-kadherin ektoderm veya endoderm kaynaklı proliferen olan tüm epitelyal hücrelerde eksprese edilir (Takeichi et al, 1991). Kadherinin onun üzerinde subgrubu mevcuttur. E-(epitelyal), N-(nöral), P-(plasental) kadherin başlıca tipleridir. E-kadherin epitelyal hücreler arasında adezyon oluşmasında ve onları bir arada tutmada anahtar role sahiptir (Shiozaki et al., 1996). E-kadherin homojenik tipte bağlanma göstermektedir (Shapiro et al., 1995). Kadherin ile sitoplazmik moleküller arası iletişim hücre zarı altında bulunan katenin molekülü ile gerçekleştirilmektedir. Kadherinin hücre içi bağlandığı kateninde delesyon veya işlevsel değişme olması E-kadherinin hücre-hücre adezyon gerçekleştirme yeteneğini kaybettirmektedir. Üç tip katenin molekülü bilinmektedir; bunlardan γ ve β katenin E-kadherinin sitoplazmik uzantılarına direk olarak bağlanır, α katenin ise bu moleküllerle hücre iskeletindeki aktin mikroflamentleri arasında bağlantı sağlar (Wijnhoven et al., 2000).



Şekil 2.8: Selektin molekülü www.biochemsoctrans.org/.../bst0321118f01.gif

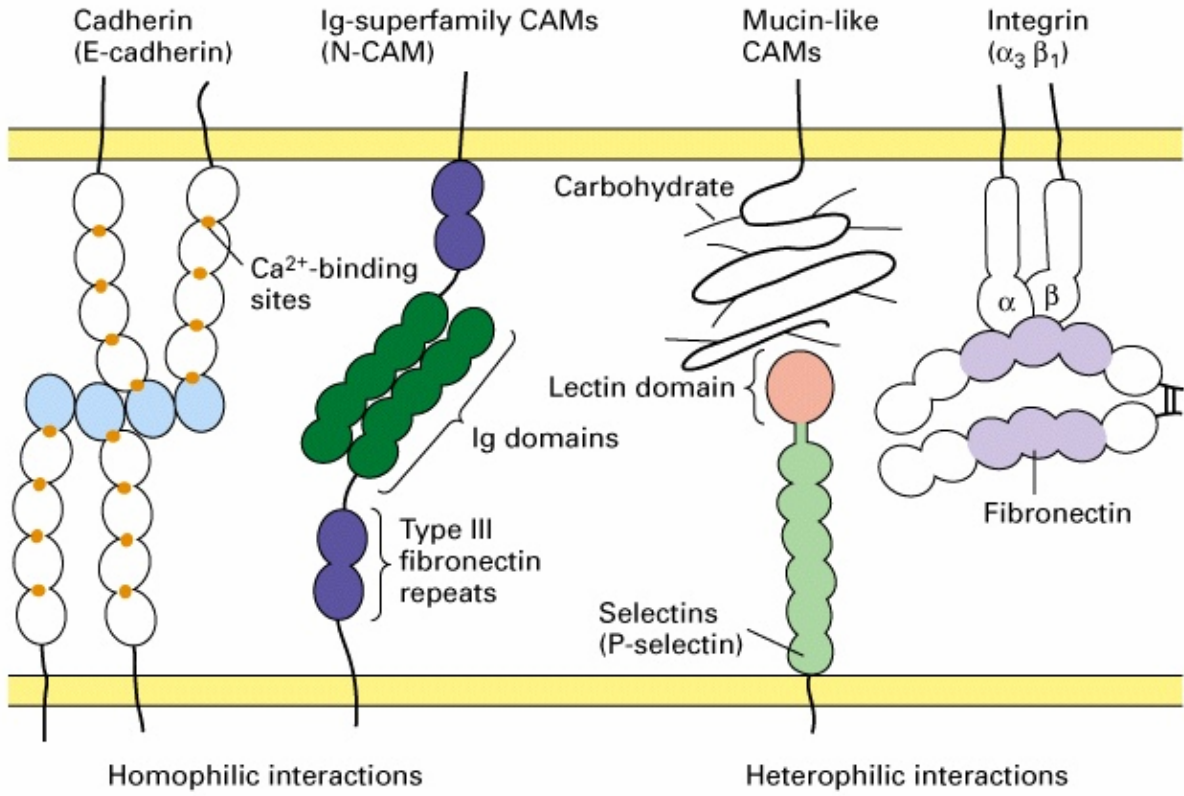
2.3.3. Folliküler Atrezi, Luteoliz ve Adezyon Molekülleri

Doğum sırasında milyonlarca follikül ovaryumlarda bulunurken, üreme döneminde bunlardan çok az miktarı dominant follikül haline gelmekte, geri kalan çoğu apoptozis sonucu atreziye uğramakta ve sonuçta dejenere olmaktadır (Yardımoğlu, 1995; Junqueira and Carneiro, 2009). Follikülü oluşturan yapılar arasında ilk olarak apoptozise katılan kısım granüloza hücreleridir (Breckwold et al., 1996). Folliküler dejenerasyon ya da CL regresyonu hücre-hücre arası adezyon bölgelerinde kayıplara eşlik ettiğinden, CAM'lerinin granüloza hücre yaşam ve ölümüne katıldığı hipotezi ileri sürülmüştür. Hücre-hücre arası temasın granüloza hücrelerinde yaşamın devamını arttırdığı, tek hücreli durumda, apoptozisin iki kat fazla olduğu in vitro olarak izlenmiştir. Primordiyal, primer, sekonder ve antral folliküllerdeki granüloza hücrelerinin birbirlerine N-kadherin aracılı şekilde tutundukları ifade edilmiştir.

Yine luteal hücrelerin, erken luteal fazda N-kadherin için kuvvetli bir şekilde pozitif boyanırken, geç luteal fazda N-kadherin ile zayıf şekilde boyandıkları izlenmiştir. Folliküllerin dejenerasyon sürecinde N-kadherin ekspresyonu azalmakta ve granüloza hücreleri sonuçta birbirlerinden ayrılmaktadır. Araştırmacılar, N-kadherin antikoru kullandıkları çalışmalarında bu ajanın yalnızca granüloza hücrelerinin agregasyonunu bozmadığını, aynı zamanda bu hücrelerde apoptozis olayını da arttırdığını göstermişlerdir (Makrigiannakis et al., 2000).

2.3.4. Adezyon Molekülleri ve Ovulasyon

E-kadherin, L-selektin, ICAM-1, NCAM, VCAM-1 gibi CAM'leri (Şekil 2.9)'nin oositlerde bulunduğu ve oositlerin integrinleri de içerdikleri araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Campbell et al., 1995). İmmünohistokimyasal ve immüno blotting yöntemleri, immatür ovaryumlarda E-kadherinin teka ve interstisiyal hücrelerde eksprese olduğunu göstermiştir. E-kadherin granüloza hücrelerinde ovaryumun iç bölgelerine yerleşmiş preantral folliküller hariç tespit edilememiştir. Alfa ve beta-katenin, tüm ovaryan komponentlerde eksprese olur. hCG verilmesi sonrası alfa-katenin ve E-kadherin ekspresyonunda azalma izlenmiştir. Alfa-kateninin granüloza hücrelerinde ve alfa-katenin ile E-kadherinin her ikisinin ovuluar folliküllerin teka hücrelerinde azalmasının, ovulasyon ve luteinizasyon olayları ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Sunfeldt et al., 1997). Çözülebilir ICAM-1 düzeyi follikül çapı ve aspire edilen oosit sayısı ile bağlantılı bulunmuştur. Çözülebilir ICAM-1'in granüloza hücrelerinden salgılanabileceği ve bazı ovaryan işlevleri olabileceği ileri sürülmüştür (Vigano et al., 1998).



Şekil 2.9: Adezyon molekülleri <http://bioweb.wku.edu/.../Images/Adherontypes.JPG>

2.3.5. Döllenme ve Adezyon Molekülleri

Döllenme, hücre-hücre ve hücre-matriks arası ilişkiler yumağını içeren bir süreçtir; sperm zona pellüsidağa bağlanır, oosit büyük miktarda ECM'ini çevresinde bulundurur (De Felici et al., 1990). Bu ilişki akrozom reaksiyonunu tetikler, böylece sperm oosit içine penetre olur. İnsan spermlerinin baş kısmında immunsitokimyasal yöntem ile fibronektin saptanmıştır (Glander et al., 1987). Bu bölge döllenme sırasında spermin oosit plazma membranı ile ilk ilişki kurduğu bölgedir. Araştırmacılar, aynı sperm sayısı ve spermiyogram parametrelerine sahip kişilerden adezyon molekül ekspresyonu az olanlarda (fibronektin, very late antigen integrin) spermin oosit penetrasyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir (Henkel et al., 1996). Yeni çalışmalar, integrin ligandlarının sperm yüzeyinde bulunabileceğine işaret etmektedir. Aslında sperm yüzey antijeni olan fertilin, integrine bağlanan bölgeler içerdiği ve sperm-oosit arası bağlanma ve füzyon olayına katıldığı kabul edilmektedir. Alfa-6 integrine karşı geliştirilen blokan antikolar kullanıldığında sperm-oosit bağlanması

gerçekleşmemektedir. $\alpha\beta 1$ integrinin oosit-sperm bağlanmasında hücre-hücre adezyon reseptörü olarak aracılık ettiği ifade edilmiştir (Almolda et al., 1995).

Kadherinler ve kadherine eşlik eden moleküller testiste, germinal hücrelerde, ejaküle olmuş spermatozoada, dahası ötesi oosit üzerinde saptanmıştır ve sperm oosit ilişkisinin kadherin aracılı olabileceği ileri sürülmüştür. N-kadherin monoklonal antikolarınca tanımlanan sperm baş bölgesinde, yaygın olarak dağılmış antijenik epizotlar belirlemiştir (Rufas et al., 2000).

Oositin üç kadherin türü içerdiği bilinmektedir: E- (epithelial), P- (placental) and N- (neural) kadherinler. Bu moleküller baskın olarak plazma membranında bulunurken sitoplazmada çok az miktarda saptanmışlardır. Sperm ise E-kadherin içerir, ancak N-kadherin içermez. Spermatozoa P-kadherin, N-kadherin ve E-kadherin antikoları için birkaç farklı boyanma gösterir ve çoğu sperm baş bölgesinde sınırlanmıştır. Kadherin molekülünün hem insan spermatozoa hem de oosit plazma membranında bulunduğu ve bunun da gamet füzyonu öncesi karmaşık olan tanıma sürecinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Rufas et al., 2000).

İnsan sperminde selektin ligandlarına bağlanabilen farklı bir zona-binding proteinin varlığı gösterilmiştir (Oehninger et al., 2001). Domuz zona pellusidasında P-selektin ligandlarının eksprese oldukları; domuz sperm akrozomal membranında P-selektin varlığı gösterilmiştir (Geng et al., 1997). P-selektinin oolemmada ve sperm akrozomunun ekvatorial bölgesinde sperm adezyonu sonrası eksprese olduklarını da gösterilmiştir (Fusi et al., 1996).

2.3.6. Endometriyum, Adezyon Molekülleri ve İmplantasyon

İnsan endometriyumu; endometriyal hücreler-bezler, stromal hücreler, fibroblastlar, lenfoid hücreler, endometriyum duvarını çevreleyen düz kas hücrelerini içermektedir. Endometriyumun bu kompleks yapısı kuşkusuz hücre dağılımına, hücre trafiğine ve hücreler arası iletişime katkıda bulunan farklı hücrelerin düzenlenişini sağlayan fibronektin, laminin vb. başka molekülleri gerektirir (Wewer et al., 1986; Tabibzadeh et al., 1991). Endometriyal döngüde yenilenme, implantasyon, gebelik ve doğum, spesifik hücre-hücre veya hücre-ECM arası etkileşime gerek duyabilir. E-kadherin ve onun mRNA'sı periimplantasyon fazında endometriyumda eksprese olur. Kadherin-6 ve kadherin-11'in menstrüel döngü boyunca endometriyal stromada değişken şekilde eksprese olduğu ve maksimum kadherin-11 mRNA düzeyinin erken gebelik desiduasında gözlendiği, fakat termde azaldığı ileri sürülmüştür

MacCalman et al.,1998). Alfa ve β integrin subünitleri menstrüel döngünün farklı evrelerinde farklı dağılım gösterirler, işte bu dağılım paternindeki değişiklikler, infertilitenin bazı tiplerinden sorumlu olabilir (Lessey et al., 1992; Yoshimura et al., 1995). Beta-1 integrinlerin insan endometriyumunda bulunduğu ve menstrüel döngüyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lessey et al., 1992; Shiokawa et al., 1996). Beta-1 integrinlerin ekspresyonu sekretuar fazda belirgindir. Beta-1 integrinler erken proliferatif fazda sadece bez epitelinde sınırlıyken, sekresyon fazının ortasında, stromal hücrelerde β -1 integrin eksprese etmektedir. Yeni çalışmalarda β -1 integrin ekspresyonunun insan endometriyumunda implantasyona uyan zamanda arttığı gösterilmiştir (Lessey et al., 1992; Klentzeris et al., 1993; Lessey et al., 1994). İmplantasyon sırasında, trofoblastlar uterin luminal epitel (LE) hücre apikal yüzeylerine temas eder. Moleküler anatomik çalışmalarda, insanlardan, farelerden ve diğer deneysel modellerden elde edilen verilerde birkaç adezyon molekülünün bu olayda rol alabileceği ileri sürülmüştür. Beta-1 integrinlerin implantasyonun geç fazında ve plasentasyon sırasında önemli rolü vardır (Aplin, 1997).

CEACAM1, karsinoembriyonik antijen ailesinden bir adezyon molekülüdür ve endometriyal ve glandüler hücreleri de içeren epitelyal hücrelerin apikal yüzeylerinde normal olarak eksprese olduğu gösterilmiştir. Gebe endometriyumu epitelyal hücrelerinde maternal-fetal birleşim yerinde, küçük endometriyal damarlarda olduğu gibi maternal tarafta CEACAM1 eksprese olur. Fetal tarafta implantasyon bölgesinde CEACAM1 kuvvetli olarak intermediate trofoblastlarda eksprese olur ve trofoblastların endometriyumu invazyonu olayına katıldıkları ifade edilmiştir (Bamberger et al., 2000).

2.4. Açıklanamayan İnfertilite ve İntegrinler

α 4 β 1 integrinlerin fertil kadınlarda pozitif iken, açıklanamayan infertil kadınlarda tespit edilemediği saptanmıştır. Endometriyal α 4 β 1 integrinlerin trofoblastik dokuyu tanıma sürecine katılabileceği ve onkofetal fibronektin için reseptör rolü gösterebileceği gösterilmiştir (Feinberg et al., 1991) integrinlerin α 4 ve β 3 subünitlerinin uterin reseptivitenin maksimum olduğu dönemde birlikte eksprese oldukları görülmüştür (Tabibzadeh et al., 1991; Klentzeris et al., 1993; Lessey et al., 1994; Feinberg et al., 1991). Özellikle α 4 β 3 integrinler implantasyon zamanı açık pencere dönemi için çok daha güvenilir bir belirleyicidirler ve bunların ekspresyonları erken gebelik dönemine uzanır. Sonuç olarak, üreme fizyolojisinde CAM'lerinin çeşitli aşamalarda rolü olduğu saptanmıştır. Bu kadar geniş kapsamlı rolleri olan

CAM'lerinin işlevlerinin daha ayrıntılı araştırılması beklenmektedir (Atabekoğlu ve arkadaşları, 2002).

İmplantasyon genetik olarak farklı olan embriyonik ve maternal dokular arasında gelişen başarılı bir kaynaşmadır. İmplantasyon döneminde uterus endometriyum hücrelerinde apoptozis tespit edilmiştir. İmplantasyon penceresi döneminde gerçekleşen apoptozisin hem embriyonun endometriyum içine invazyonunda, hem de embriyoya maternal kan akımının sağlanmasında gerekli olduğu tespit edilmiştir. Hem implantasyonu, hem de apoptozisi düzenleyen faktörlere baktığımızda, bu faktörlerin her iki olayda da ortak olması nedeniyle, her iki olayda etkili oldukları ve iyi bir embriyo gelişimini kontrollü bir şekilde sağladıkları görülmektedir (Gökçimen ve Temel, 2004).

2.4.1. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler

İmplantasyon, blastosist dış tabakası TE'inin, uterusun LE ile etkileşime girdiği genel bir birliktelik safhasını gerektirmektedir (Susan, 2000; Paria et al., 1993; Sarani et al., 1999). Çeşitli deneysel çalışmalarda, endometriyumun implantasyon için hazırlandığı gösterilmiş ve bu dönem implantasyonun pencere dönemi olarak isimlendirilmiştir. Endometriyumda çeşitli yapısal, hücrel ve moleküler olaylar implantasyon penceresi ile kontrol edilir ve böylece endometriyal kabul edişi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilir. Bunlar, adezyon molekülleri, sitokinler, pinopodların oluşumu ve diğer endometriyal proteinlerin miktarlarında değişikliklerdir (Paria et al., 1993; Sarani et al., 1999; Parr and Parr, 1989; Duc-Goiran et al., 1999). İmplantasyonu takiben, plasentasyon olarak da isimlendirilen evrede, plaseenta oluşumu ile implantasyon olayı tamamlanır ve gebelik döneminin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek olan yapı kurulmuş olur (Parr and Parr, 1989). İmplantasyonun düzenli hücrel ve moleküler olaylarını açıklayabilmek için çeşitli dönemler tanımlanmıştır:

Dönem 1: Metafaz II oosit'in döllenmesi ile başlar.

Dönem 2: Zigotun bölünme evresinin başlangıcını gösterir.

Dönem 3: Morula, uterus boşluğuna girer ve kısa zaman sonra blastosist oluşur. Bu nedenle bu dönem blastosist implantasyonunda Faz I olarak isimlendirilir. Blastosist endometriyal kavite içinde serbesttir ve henüz yüzey epiteli ile temas etmemiştir. İnsanlarda morulanın uterusu ulaşması ovulasyon/döllenmeden yaklaşık 72-96 saat (3-4. gün) sonra olmaktadır. Zona pellisuda 5. günde (yaklaşık ovulasyon/ döllenmeden 110-120 saat sonra) erimeye başlar.

Dönem 4: Blastosist yüzey epiteline yapışır ve daha sonra epitele ve hemen ardından stromaya penetre olur. Bu dönem blastosist implantasyonunda Faz II olarak isimlendirilir.

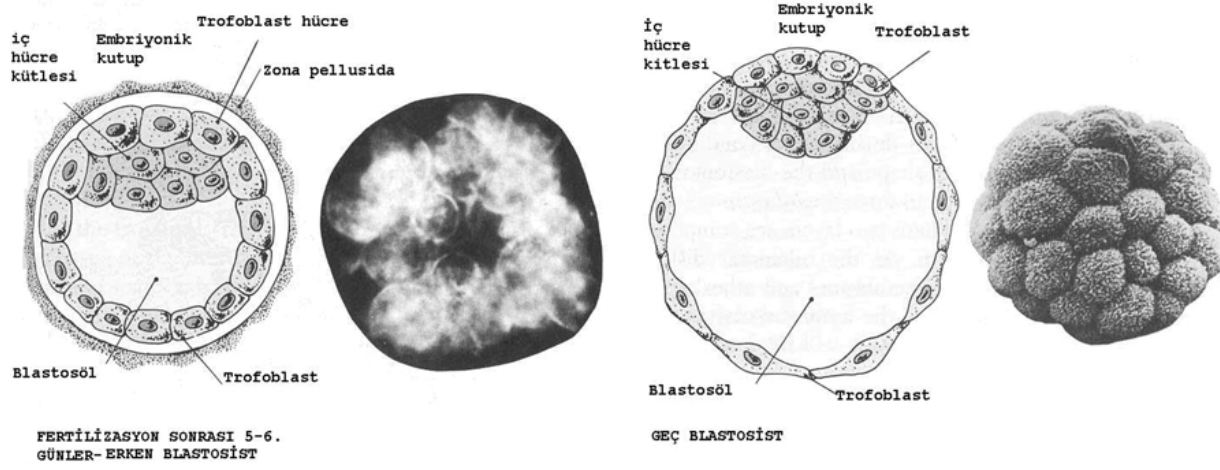
Dönem 5-9: İmplantasyonun en belirgin özelliği olan plasentasyon olur. Bu dönem Faz III olarak isimlendirilir (Parr and Parr, 1989).

2.4.1a. Faz 1 (Blastosistin kavite içinde serbest dönemi)

İmplantasyon, blastosist ile endometriyumun birbirini etkilemesi sonucunda olduğundan, bu olay embriyo ile endometriyum arasında olan ilişkinin hemen arkasından başlamaktadır. Blastosist olgunlaşır ve zona pellisuda'sını kaybeder. Bu dönem, ovulasyondan sonraki 5. günde, penetrasyondan 1-2 gün önce olaylanır (Şekil 2.10). Zona pellisudanın kaybindan sonra, iç hücre kütesinin dışındaki trofoblast hücreleri yüzey çıkıntıları oluşturur, bunlar da birleşerek sinsityal trofoblastları oluşturur. Endometriyum boşluğunda sıvı yokluğu nedeniyle serbest blastosist olasılıkla endometriyum yüzey epiteli ile temas etmektedir (Parr and Parr, 1989).

İlk implantasyon için gerekenler: Başarılı bir implantasyon, hem uterusun ovaryum steroidlerince kontrol edilen bir dizi özgün farklılaşması, hem de blastosistin kesin bir aktivasyon evresine erişmiş olmasını gerektirir (Susan, 2000). Kemirici blastosistin TE'i aktif hale gelerek bir değişim sürecinden geçer. Metabolik oranı artar, LE ile etkileşme kapasitesini geliştirir, epitelyal-mezenşimal geçişimini gerçekleştirir (Susan, 2000; Duc-Goiran et al., 1999). TE ve LE'nin adeziv etkileşim ve blastosistin stroma içine penetrasyonu için gerekli olan moleküler olayları aynı anda ortaya çıkarması gerekmektedir. Blastosistler, sadece implantasyonun pencere döneminde LE ile implantasyon etkileşimine girebilirler (Susan, 2000). Bunu belirleyen CL'dan salgılanan P₄'un endometriyumdaki etkileri ve bunları izleyen gebeliğin 4'üncü günündeki hafif bir östrojen pikidir (Paria et al., 1998; Sunder and Lenton, 2000). İnsanlarda uterusun implantasyona elverişli olduğu dönem, büyük olasılıkla menstrüel devrenin 19- 24. günleri arasındadır (Paria et al., 1998). Fare blastosistinin aktif hale gelmesi için bir metabolit estradiol 4-hidroksiestradiol -17 (katekolestrogen) gerekirken, uterusun implantasyona hazırlanması için nükleer reseptörlü estradiol-17 (E2)'nin etkileşimi gerekmektedir. Anne adayları sıçanlara günlük olarak P₄ enjekte edildiği takdirde, blastosistler uterus içerisinde uyku halinde korunmuşlardır ve uykudaki embriyonlar 16 saate kadar implante olabilmişlerdir. Bu noktadan hareketle E2 için "blastosisti aktif hale getiren unsur" teorisi ileri sürülmüştür (Susan 2000; Paria et al., 1998).

İmplantasyonun Başlangıcındaki Sinyalleşme Olayları: Blastosist ve LE arasındaki sinyalleşme, hücrelerden salınan eriyebilir moleküller yoluyla ortaya çıkabileceği gibi, zara bağlı sinyal molekülleri yoluyla da ortaya çıkabilir. HB-EGF'nün blastosistin yüzey epiteline bağlanmasından önce salgılandığı fare endometriyumunun yüzey epitelinde gösterilmiştir. HB-EGF, östrojen kontrolü altındaki fare endometriyal epiteli ve P₄'ün kontrol ettiği stroma tarafından eksprese edilir. HB-EGF, östrojenin hücre çoğalmasındaki etkilerine aracılık eder. Gebeliğin 2. ve 3. günlerinde LE'de HB-EGF mRNA bulunmaz. Fakat, olasılıkla blastosist bağlanma zamanından 6 ila 7 saat önce, LE'in apikal yüzeyinde blastosiste komşu bölgede eksprese edilir (Susan, 2000; Paria et al., 2000; Raab and Klagsbrun, 1997).



Şekil 2.10: İmplantasyonun erken ve geç dönemlerinde blastosist ve zona pellisuda (Moore and Persaud, 2009).

İnsanda, çözünebilir HB-EGF embriyolarının blastosist aşamasına ulaşma ve yerleşme oranını artırmaktadır. İnsan endometriyumunda HB-EGF mRNA'sında menstrüel devreden bağımsız değişiklikler gözlenir. Bu madde, sekretuar evrede artmakta, implantasyon aralığının açılmasından hemen önce en yüksek olmakta ve sonra düşmektedir. Protein ise stromanın çoğalma safhasında görülmekte, fakat sekretuar fazın ortasında (beklenen alıcılık safhası) LE'nin apikal yüzeyinde açığa çıkmaktadır. İnsan HB-EGF'sinin implantasyondaki rolünün, farelerdekine benzemesi olasıdır (Susan, 2000; Paria et al., 2000; Raab and Klagsbrun, 1997). Prostaglandin ve prostasiklin (PGI-2) sentezinde kilit bir enzim olan siklooksijenaz 2 (Cox-2) erken implantasyon mekanizmaları için gereken bir dizi sinyalleşme yolunun merkezi olarak görünmektedir. Cox-2 olmayan dişilerde, ovulasyon ve döllenmede hataları ve implantasyonu

destekleme yetersizliklerini de içine alan çoklu üreme başarısızlıklarına rastlanmaktadır (Chakraborty et al., 1996). Cox-2 den yoksun dişilere, PGI-2 eklenmesi, desidual tepkinin ve implantasyonun meydana gelmesinde çok etkili olmuştur. Bu durumda PGI-2'nin; önemli bir Cox-2 ürünü olup implantasyon için gerekli uterin stromal değişikliklerin meydana gelmesinden sorumlu olduğu ileri sürülebilir. PGI-2, desidual tepkimenin bir özelliği olarak artmış vasküler geçirgenliği sağladığı için, bu onun implantasyondaki esas rolü olabilir (Paria et al., 2000). Prostaglandin düzeyleri menstrüel döngünün luteal safhasında yükselir (Duc-Goiran et al., 1999; Novaro et al., 1996). Luteal safhanın ortasında Cox-2 proteinin daha çok perivasküler hücrelerde ve LE'de bulunduğu saptanırken, luteal safhanın sonlarında glandlarda Cox-2 proteini artar. Kısacası, LE Cox-2'si, insan uterusunun implantasyona hazırlanmasında da bir rol oynayabilir (Paria et al 2000; Chakraborty et al., 1996).

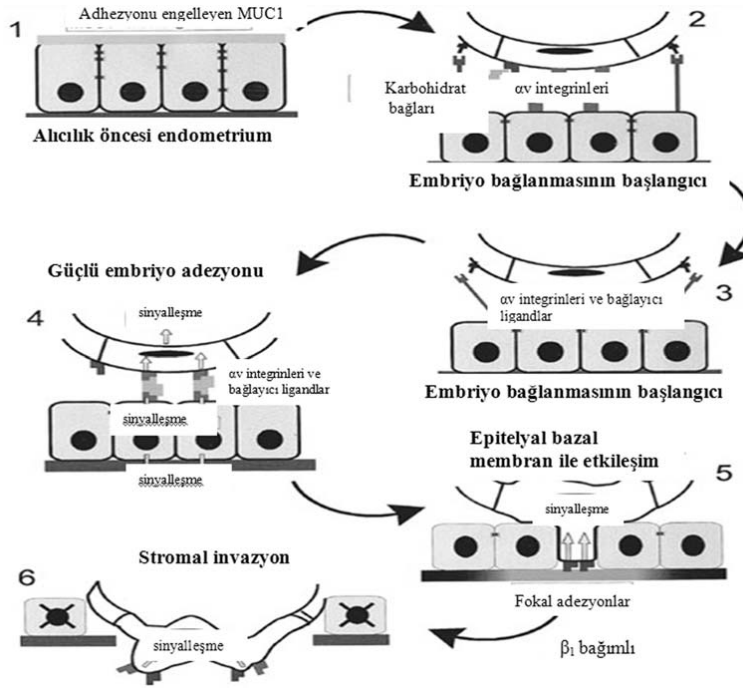
İmplantasyon Hazırlığında Endometriyumun Bağlayıcı Epiteli (LE)'de Oluşan Değişiklikler:

İmplantasyon öncesinde LE'de bir takım değişiklikler meydana gelir. İmplantasyon anında LE hücrelerinin apikal bazal polaritesi, apikal membrandaki laterobazal belirteçlerin ortaya çıkması ile belirginliğini kaybeder, daha siklik hale gelir. Hücreler artık daha yassılaştır ve mikrovili sayısı azalır. Birçok türde mikrovililerin yerini pinopodlar alır. Bazal membran kalınlığı dikkat çekecek derecede azalır (Bentin-Ley et al., 1999). Hücre yüzeyi moleküllerinin apikolateral dağılımında değişiklikler ortaya çıkar. Örneğin, sekretuar evresinde 6 integrinin'in dağılımı, bazalden hem bazal hem de laterale doğru değişir. Bu durum, implantasyon anında LE'nin hücrelerarası etkileşimdeki değişimine işaret eder. Desmozomal proteinler, fare LE'sindeki lateral hücre yüzeyleri boyunca tekrar dağıtılır ve düzenlenirler. İnsan ve fare LE'sinde implantasyon zamanı desmozom yoğunluğu azalır (Illingworth et al., 2000). Bu zaman içerisinde insan da dahil bazı türlerde lateral membrandaki sıkı bağlantı (tight junction) dağılımı ve kompleksitesi de değişir (Murphy et al., 1992). Buna ek olarak, özgün gap junctionlar, implantasyonun olduğu epitelde açığa çıkar ve ovaryum steroidlerince sıkı bir şekilde düzenlenirler (Susan, 2000). İnsanlarda endometriyal epitelin yeniden organizasyonu diğer memelilerdekine paralel ilave elemanları içerir. LE hücrelerindeki düzenli mikrovililer ovulasyondan yaklaşık 6 gün sonra yerlerini pinopodlar'a bırakırlar. Tekrarlayan biyopsileri içeren çalışmalar, bu pinopodların kadınlarda 48 saatten daha az bir ömre sahip olduklarını ortaya koymuştur. Pinopodlar menstrüel döngünün 20 ve 22. günleri arası değişmekte ve her bireyin kendine özgü olmaktadır. Bu durum, insanın beklenen alıcılık penceresi ile uyum göstermektedir. Bunun yanında,

pinopodları taşıyan hücre kümelerinin hücre katmanında buldukları yere tutunarak yerleştikleri kaydedilmiştir. Bu yüzden bu tür pinopodlar insan embriyoları için önemli tutunma alanları olabilir (Susan, 2000; Bentin-Ley et al., 1999). İnsan uterus epitel hücre serilerinin embriyonun tutunmasını destekleyebilmesi için, E-kadherin, 6, 1 ve 4 integrin gibi bazı bazolateral CAM'lerinin apikal ekspresyonları gerekmektedir (Duc-Goiran et al., 1999). Mucin-1 (Muc-1) gibi bazı anti-adeziv faktörlerin azaltılması, bu hücre serilerinin yapışkanlıklarına katkıda bulunabilir (Susan, 2000).

2.4.1b. Faz 2: Yapışma ve Zorla İçeri Girme Dönemi

Bu dönem blastosistin yüzey epiteline tutunması (apozisyon fazı) ve bunu izleyen penetrasyonunu (penetrasyon fazı) içermektedir (Şekil 2.11). Endometriyum yüzey epiteli ve trofoblastlar arasındaki başlangıç teması, yüzey epitel hücrelerinin apikal plazma membranları ile trofoblastların plazma membranlarının yakınlaşması ile olur. Bu hücreler birbirlerine paralel olurlar ve aralarında 20 nm'lik bir mesafe kalır. Membran altındaki özgün filamentöz ağ, bu hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantıları ile durağan halde desteklenir. Apozisyon fazı olarak da bilinen trofoblast-endometriyal etkileşimi yüzey epiteline penetrasyon takip eder (Parr and Parr, 1989). İnsan blastosistleri zorlayıcı bir epitelyal penetrasyon sergilerler Bu tip invazyon yüzey epitel hücreleri ile sinsityotrofoblastların uzantıları arasındaki penetrasyonu içerir. Bu durum, komşu epitel hücreleri arasındaki bağlantıların kaybına ve trofoblastlar ile epitel hücreleri arasında bağlantıların oluşmasına yol açar. Böylece, trofoblastlar kendilerini epitel hücreleri arasına sokmuş olur ve daha sonra yüzey epiteli altında yer alan bazal membrana doğru penetre olurlar (Parr and Parr, 1989).



Şekil 2.11: Embriyonun tutunma ve invazyonu (Susan, 2000).

Endometriyal Epitel ve Trofoektoderm(TE)'in Karbohidrat Epitopları: LE yüzeyine yaklaşan bir embriyo, olasılıkla ilk olarak yüzey moleküllerinin karbohidrat zincirleri ile temas edecektir. Bunlardan özellikle bazıları, üreme siklusu esnasında veya gebeliğin preimplantasyon periyodunda düzenlenir (Susan, 2000; Poirier and Kimber, 1997; Kimber et al., 1993). Endometriyal epitelde düzenlenen bir terminal yapı da H-tip-1 antijenidir. İn vitro olarak fare blastosistinin LE'ye bağlanması, tip-1 antijeni tarafından gerçekleştirilmektedir. Çünkü H-tip-1 antijeni LE'nin apikal görüntüsünde, gebeliğin 4. gününe kadar aynı tarzda ekspres edilmekte ve TE ile etkileşime girebilmektedir H-tip-1 antijeninin ekspresyonu luteal safhada, folliküler safhadakinden daha yüksektir. Htip-1 antijeni, P₄ ekspresyonunu harekete geçirici, uyarıcı bir etkiye sahiptir. Farelerde LE ile ilk temasa geçen kısım TE'nin anembriyonik bölgesidir. Farelerde, Le-y karbohidrat antijeni, blastosist yüzeyinde ve LE üzerinde bulunmaktadır. Endometriyal Le-y glikolipidi, H-tip-1 ve -2 zinciri glikolipidlerine bağlanırken, blastosistteki Le-y, LE apikal yüzeyindeki H-tip-1 ile etkileşebilmektedir (Gökçimen ve Temel, 2004).

Endometriyal Yanıt ve Trofoblastik Hücre İnvazyonunda İntegrinlerin Rolü: Trofoblast hücreleri invaziv fenotip sergilemeye başladıkları zaman kollajenler aktif hale gelirler ve ECM'yi bozarlar. HLA-G antijeni ortaya çıkar ve yeni hormonlar sentezlenir (Merviel et al., 2001). Aplin; 'ün villöz sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast arasındaki ortak yüzeyde

yapıldığını tespit etmiştir ve bu tespit 'ün hücre-hücre adezyonunda işleve sahip olduğunu ortaya koymaktadır. subuniti en geniş etki alanına sahip olan subunittir ve bu yüzden sitoskeletal proteinlerle doğrudan etkileşimleri sebebiyle hücrelerin sabitlenmesine en iyi olanak sağlayan integrindir (Merviel et al., 2001; Poirier and Kimber, 1997). İnterstisyel ekstrasitotroblast, distal uçtaki hücreler bazal membran ile teması kaybedip, desidua tarafından salgılanan olası hücre dışı matriks bileşenleri ile temasa geçtikçe, integrini kaybolmakta, V integrini (fibronektin reseptörü) halen korunmakta ve 1 (laminin ve tip1/tipII kollajenleri için reseptörler) ve V (vitronektin reseptörleri) ekspresyonu başlatılmaktadır.

Bu olay, 'integrin switch (integrin kilitlemesi)' olarak nitelendirilmektedir (Merviel et al., 2001; Damsky et al., 1994). İnterstisyel trofoblastta; (fibronektin ligandı), ve 1(laminine bağlanan bazal membran için gerekli bir bileşen) subunitlerine rastlanmıştır. Benzer şekilde, invaziv hücreler de ve V (fibronektin), V (vitronektin), V (trombospondin), V (tenaskin reseptörü) gibi integrin etkileşimli hücre dışı matriks bileşenleri eksprese etmektedirler (Merviel et al., 2001).

Heparan sülfat proteoglikan: Heparan sülfat proteoglikan (HSPG), blastosistin LE'ye tutunmasına karışan bir diğer olgudur. HSPG'nin bir bazal membran formu olan perlecan, inkübasyondan sonra blastosistin etrafını çevrelemekte ve mRNA ve proteininin ekspresyonu blastosistin bağlanma yeterliliğini kazanması ile uyum göstermektedir. Böylece HSPG, TE'yi LE'ye bağlayan bir destekleme ligandı olarak işlevini yerine getirmektedir. Fare embriyoları HSPG bağlı proteinlere tutunabilmektedirler (Susan, 2000, Carson et al., 1993). Bir HSPG bağlı protein olan heparin bağımlı sülfat proteoglikan (HIP) proteini, üreme devresinin başından sonuna kadar insan ve fare endometriyal epiteli de dahil olmak üzere olası insan hücre seri ve dokularında açığa çıkmaktadır. HIP'in dış membran ile yaptığı kovalent olmayan birleşim, onu trofoblastı HSPG'ye bağlayabilecek duruma getirmektedir. Ayrıca HIP perlecan'a da bağlandığından dolayı insan TE bağlanması için HIP-perlecan-HS etkileşimi öne sürülebilir. HIP, aynı zamanda insan koriyonik villuslarının ilk üç aylık sitotroblast invazyonunun başladığı yer olan villüs bağlanma noktalarında yoğunlaşmakta olup burada yüksek düzeyde perlecan da mevcuttur. HIP ayrıca maternal kan damarlarının duvarlarına nüfuz eden sitotroblast ile desteklenmektedir. Bütün bunlar HIP'in trofoblast invazyonunda rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Antikorların HIP'e olan etkisi de bunu desteklemektedir (Susan, 2000, Rohde et al., 1996).

Trofinin

Trofinin, 749 amino asit içeren iç plazma membran proteinidir. N – terminal bölgesi 66 amino asit kalıntısı sitoplazma içinde lokalize olduğu tahmin edilmektedir. Trophinin peptidinin geri kalan kısmı membranlara uzanmak için sekiz hidrofobik uzantı içerir (Suzuki et.al., 1998). İnsan trofinin proteinlerinin %90'ından daha fazlası bu proteine özel dekapeptid tekrarlarından meydana gelmektedir. Bu dekapeptid tekrarları bu proteininin plazma membranıyla büyümesine izin vermek için hidrofobik bölgeler içerir. Bu dekapeptid tekrarları hücre yüzeyinde trofinin bağımlı hücre adezyonunun yapısal özelliği için anahtar olarak nitelendirilir. Tastin ve bystin sitoplazmik moleküllerdir, plazma membranlarındaki trofinini düzenleyerek onun etkili hücre adezyon molekülü olarak görev almasında gereklidirler. İnsan trofinin geni X kromozomunun kısa kolunda yer alır. (Pack et al., 1997)

Trofinin homofilik kendi kendine bağlanma olayına aracılık eder. Tastin ise sitoplazmik bir proteindir ve trofininin CAM olarak işlev görmesi için gereklidir. Trofinin ve tastin normal olarak her tip insan hücresinde bulunmaz, maymun blastosistlerinin trofoektodermal (TE) yüzeylerinde güçlü ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca insan endometriyumunda implantasyon penceresine uyan erken sekretuar fazda bu moleküllerin ekspresyonu izlenmiştir (Fukuda et al., 1995). ICAM-1'in vivo olarak bez epitelinin apikal yüzeyinde, vasküler endotelde ve endometriyal stromal hücrelerde menstrüel döngü boyunca bulunmaktadır.

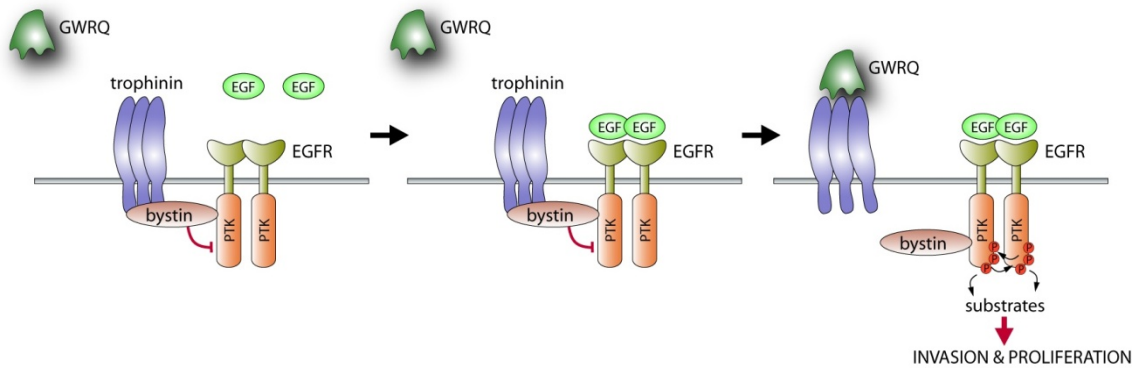
Trofinin insanda trofoblastik HT-H hücreleri ve endometriyal epitelyal SNG-M hücre hatları arasında apikal hücre adezyonuna aracılık eden membran proteini olarak tanımlanmaktadır. Trofininin insanlardaki ekspresyon paterni embriyo implantasyonu ve erken plasental gelişimdeki tutulumu göstermektedir. Trofinin için pozitif sinyaller preimplantasyon fare embriyolarında morula ve blastosist aşamalarında belirlenmiştir.

İmplantasyonun başlangıç aşamasında, daha önce non adeziv olan blastosist trofoektoderminin apikal yüzeyi ve epitelin endometriyal yüzeyi birbirlerine karşı adeziv hale gelirler. Embriyo-uterus adezyonu sadece fiziksel bağlantıyı desteklemez; ayrıca embriyonik ve maternal hücreler için gerekli olan fonksiyonel değişiklikler için hücre içi sinyal basamaklarını oluşturur. Bilgilerimize göre; bu mekanizma özellikle kemirgenlerde analiz edilen bu başlangıç bağlantısı ve sonrasında trofoblastların maternal dokuların içine olan istilasını oluşturmaktadır (Carson et al., 2000; Dey et al., 1995). Bu çalışmalar blastosist ve luminal endometriyum arasında karşılıklı etkileşim olduğunu göstermiştir (Paria et al., 2005).

Ayrıca çalışmalarda; fare blastosist implantasyonunun başlangıç aşamasına tanımlanan moleküllerin aracılık ettiğini belirtilmiştir (Paria et al., 2005; Das et al., 1994).

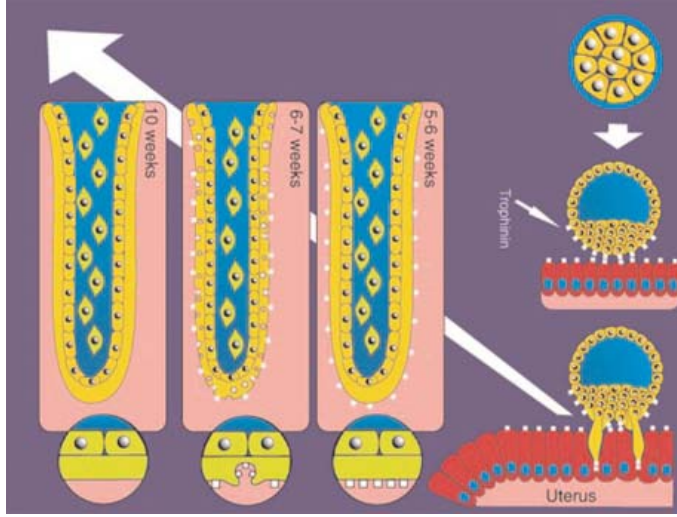
İnsanlarda ve primatlarda implantasyonla ilişkili hücrelerde trofininin sentezlenmektedir (Fukuda et al., 1995; Fukuda et al., 1999; Suzuki et al., 1999). Maymun blastosistinde trofinin güçlü olarak, blastosistin uterin duvara yapıştığı embriyonik kutupta eksprese edilir. İnsan endometriyumunda trofinin güçlü olarak erken sekretuar fazdaki luminal epitelin kısıtlı alanında eksprese edilir. İmplantasyon penceresindeki bu kısıtlı fakat güçlü trofinin ekspresyonu, insanlarda implantasyon boyunca trofininin spesifik rolünü göstermektedir. Farelerde ovaryen hormonlar uterusun trofinin ekspresyonunu düzenler ve trofinin ekspresyonu implantasyon zamanına rast gelmektedir (Suzuki et al., 2000). Buna rağmen trofinin farelerde özellikle implantasyonla ilişkili hücrelerde kısıtlı değildir. Trofinin, implante olan blastosist olsa da olmasa da uterin luminal ve glandular epitelin tümünde bulunmuştur (Nadano et al., 2002).

Trofinin-Tastin-Bystin Kompleksi: Trofinin; esas olarak membran proteindir. İnsan trofoblast hücre hattı ile endometriyal hücre hattı arasındaki hemofilik hücre adezyonuna aracılık eder. Trofinin, adezyonda işlev görebilmek için, orta seviyedeki bir protein olan bystin vasıtasıyla sitoplazmik bir protein olan tastine bağlanarak bir kompleks oluşturur (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Trofinin aracılı hücre adezyonu ile TE hücrelerinin aktivasyon mekanizması (insan embriyosunda blastosist döneminde dış tabaka). Trofinin ve bystin sitoplazmik komplekse beraberce bağlanır, ErbB4 ile interaksiyona girer ve tirozin kinaz aktivitesini baskılar (solda). HB-EGF, ErbB4'ye bağlanır fakat protein kinaz aktivitesi trophinin/bystin ile baskılanır (ortada). Trophinin-aracılı hücre adezyonu, bystin ve ErbB4'ün aktivasyonundan trofininin ayrılmasıyla sonuçlanan hücre yüzeyinde GWRQ peptidin bağlanmasına benzer (sağda).

Trofinin ve tastin, insan endometriyal epitelinin erken sekretuar safhasında, apikal yüzeyde açığa çıkmaktadırlar (Şekil 2.13). Sekretuar periyodunun ortasında da hızla gözden kaybolurlar. İmplantasyon bölgesinde, trofininin, TE ve LE'nin karşıt apikal yüzeylerinde açığa çıktığı gözlenmektedir (Susan, 2000).



Şekil 2.13: Trophinin implantasyonda endometriyal epitel ve TE'in yüzeyinde eksprese olur. İnsan plasentalarında, trofinin gebeliğin 6.haftası civarında yüzeyden lizozomlar içerisine internalize olur ve 10.haftadan sonra plasentada ekspresyonu kaybolur (Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:5027-5032, 1999.)

CD 26 /dipeptidil peptidaz IV

CD26 /dipeptidil peptidaz IV kadınlarda implantasyon periyodu boyunca yüksek olarak eksprese edilen 110-kDa membran bağımlı ekstraselüler glikoproteindir (Imai et al., 1994). CD 26, hücre yüzeyinde fibronektinle ilişkili adezyon molekülü olarak rapor edilmiştir (Cheng et al., 1998). CD26 /dipeptidil peptidaz IV endometriyumun implantasyon fazı için belirteç molekülü olarak bilinmektedir (Shimomura et al., 2006). CD26 /dipeptidil peptidaz IV membran bağımlı peptidaz olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir ve hücre dışı bölgelerde çeşitli biyolojik olarak aktif peptidlere indirgenebilir (Imai et al., 1994). Kenny ve arkadaşları 1989 yılında, hücre yüzey peptidazlarının birçok hücre sisteminde büyüme farklılanmayı peptid faktörlerin aktivasyonunu ve onların hedef hücreye girişini ayarlayarak düzenlediğini belirtmiştir. CD26 /dipeptidil peptidaz IV gebeliğin başında desiduada ekstravillöz

trofoblastta eksprese edilir ve onun enzim aktivitesi ektravillöz trofoblast invazyonuna yol açar (Sato et al., 2002). Shimomura ve arkadaşları 2006 yılında, CD 26 overekspresyonunun önemli bir şekilde yüksek blastosist adezyon oranına (% 25' e karşı %53.3 p<0.05) ve trofoektoderimde önemli bir şekilde yüksek outgrowth bölgesine (1.7 kat p<0.05) neden olduğunu belirtmiştir.

İnvazyon Sırasında Diğer Adezyon Moleküllerinin Rolü: Fare ve insanda endometriyumu istila etmeye başlayan trofoblast, LE ile de sıkı bir etkileşim sergiler. Trofoblastın yayılma derecesinin türler arasında çok farklı olmasına rağmen, bunun düzenlenme tarzında benzerlikler vardır (Susan, 2000). Desidualizasyon, endometriyal stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşmesi, hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi ve integrin ekspresyonunu kapsamaktadır. Gebelik söz konusu değilken, endometriyal stroma ECM'i; I, III, V ve VI kollajenleri, fibronektin ve periglandular tenaskin birikintilerini içermektedir (Merviel et al., 2001; Guillomot, 1999). Desidualizasyon sırasında hücre, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikan ve laminin 2 ve 4 içeren bir ECM üretir. Laminin ve kollajen IV, trofoblast LE bazal membranından bazal LE hücre yüzeyine ulaşmadan önce gözden kaybolduğundan, bunlar olasılıkla trofoblastların substratlarıdır. Stromal farklılaşma veya desidualizasyon ECM'deki değişiklikler ile karakterizedir (Susan 2000; Merviel et al, 2001; Guillomot, 1999). Farede bu değişiklikler implante olan blastosist ile tetiklenmektedir. Kadında desidual farklılaşma, siklusun P₄ hakim olan luteal fazında ortaya çıkmaktadır. ECM, insanlar ve farelerdeki perisellüler matriks katmanı içine tekrar organize olmuştur. Burada bulunan ECM bileşenleri trofoblastların adezyon ve migrasyonu için uygun olanlarıdır. Trofoblast invazyonunda ECM'in rolü olduğu kesinlik kazanmıştır. Bu, LE ile adeziv etkileşim ve stroma içine invazyon sırasında blastosist aktivasyonunun en erken görülen olaylarından kolayca anlaşılabilir (Susan, 2000; Guillomot, 1999).

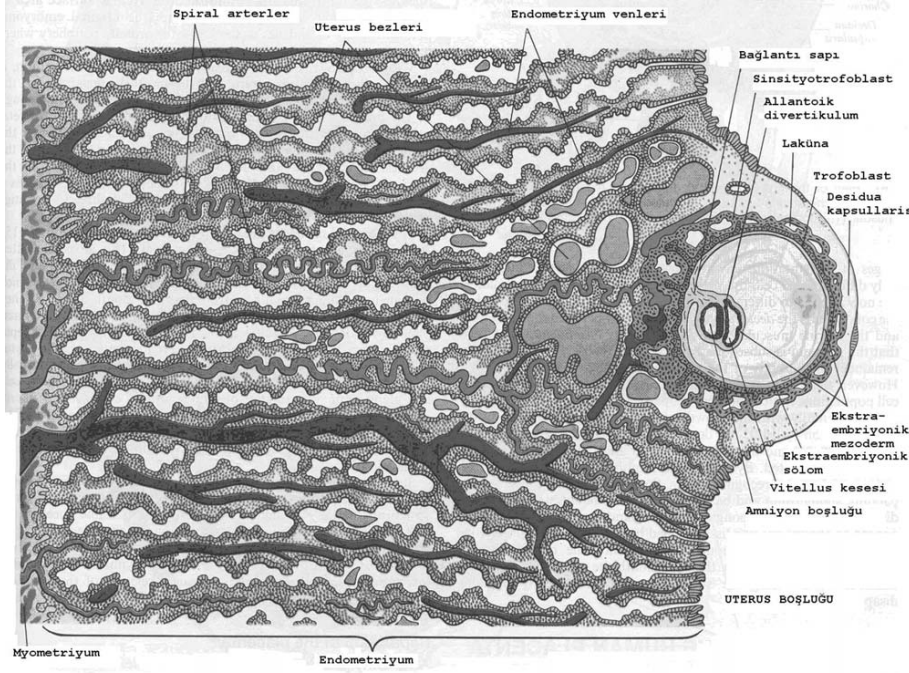
Blastosist İçin Adeziv Ligandların Maskelenmesi: LE, normal doku homeostazisini sürdürmenin yanısıra, mikrobiyal enfeksiyonun önünde bir engel olarak da görev yapmaktadır (Susan, 2000; Duc-Goiran et al, 1999). Muc-1 gibi bol glikozilatlı musinler LE'de maskeleyen işlevini yerine getirirler. LE'deki Muc-1'in standartların altındaki blastosistlerin yapışmasını önleyen seçici bir engel olduğu ileri sürülmüştür (Chervenak and Illsley,2000; Meseguer, 1998). Sıçanlarda diğer bir musin olan Muc-4, implantasyon zamanında gözden kaybolmaktadır. Muc-4 prereceptiv LE'deki bağlanmayı önlemeye yönelik bariyer işlevine

benzer bir işleve sahiptir. Muc-1 ve Muc-4'ün her ikisi de ovarian steroidlerin kontrolü altında açığa çıkmaktadırlar (Susan, 2000, Chervenak and Illsley, 2000; Meseguer, 1998). Kadınlarda, keratan sülfat gibi karbohidrat yapıları, implantasyonun başarısı ile ilişkilidir ve Muc-1 bağlantılıdır. İnsan embriyolarının perimplantasyonunda implantasyonun başarısı ile ilişkilidir ve Muc-1 CD 44 izoformları mevcuttur. Bu izoformlar, Muc-1'dekiler de dahil olmak üzere insan Le'si apikal yüzeyinde bol miktarda bulunan sialilatlı ve sülfatlı karbohidratlar ile etkileşerek bağlayıcı molekülleri oluşturmaktadır (Kamijo et al., 1998). Blastosistlerin incelenmesiyle, ICAM-1'in, insan embriyolarında bulunduğu ve Muc-1'e yapıştığı kaydedilmiştir. İnsan Muc-1'i, karbohidrat epitoplari vasıtasıyla bir adezyon molekülüne dönüşme özelliğine sahiptir. Bunlar TE şeker bağlı moleküller ile etkileşerek embriyoları bağlayabilir ve onları apikal LE'deki CAM'lar ile temas ettirebilir. Aynı zamanda bu standardın altındaki blastosistlerin, diğer CAM'lar ile etkileşmelerine de engel olabilir. Sözü edilen engelleme işlevine ek olarak, Muc-1'in hücre yüzeyinden kalkması ile adezyon artar. İnsan blastosistinin endometriyal epitel ile kokültürü; hücre yüzeyine bağlanan blastosistin bitişiğinde Muc-1'in lokal olarak kaybolduğunu gösterir (Susan, 2000).

2.4.1c. Faz 3: Plasentasyon Dönemi

İmplantasyonun bu fazında plasenta oluşur ve tersiyer villusların oluşmasıyla sona erer (Parr and Parr, 1989).

Dönem 5. Ovulasyondan sonraki 7-13. günler arasında görülür. Primer villusların gelişmesi ile sona erer. Dönem 5a'da insanda implantasyon alanındaki trofoblastlar, hem sitotroblast hem de sinsityotroblast kütlesi halinde genişler (Şekil 2.14). Dönem 5b ve 5c'de trofoblastlar damar duvarlarına uzanır ve onların duvarlarının bir parçasını oluştururlar. Bu maternal damarlardan, trofoblastlar arasında oluşturulan ve lakuna olarak adlandırılan boşluğa kan akar (Parr and Parr, 1989).



Şekil 2.14: Plasentasyon dönemi. Sinsityotrofoblastlar, spiral arterler ile temas halindedir (Moore and Persaud, 2009).

Dönem 6. Bu dönemde sekonder plasental villuslar ve vitellus kesesi gelişir (Parr and Parr, 1989).

Dönem 7. Villusların dallanması ve endometriuma sıkıca tutunması, implantasyonun bu döneminde görülmektedir (Parr and Parr, 1989).

Dönem 8-9. Bu dönemde tersiyer villuslar gelişir (Parr and Parr, 1989).

2.4.2. İmplantasyon ve Apoptozis

Omurgalılarda dokuların şekillenmesinde, gastrulasyon ve nörolasyon fazlarında, interdijital perdelerin regresyonu sonucu parmakların şekillenmesinde, tümör gelişiminin patogenezinde ve ayrıca preimplantasyon dönemindeki embriyonda ilk boşlukların oluşmasında apoptozisin yeri olduğu ispatlanmıştır (Parr and Parr, 1989; Kamijo et al., 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalar, sitokinler ve bazı büyüme hormonlarının hücreye ölme veya yaşama sinyalini göndererek apoptozisi kontrol ettiklerini ortaya çıkarmıştır. Lökemia inhibitör faktör (LIF) (Parr and Parr, 1989; Duc-Goiran et al., 1999, Bischof and Campana, 1995), beyinde gelişen nörotropik faktör (brain derived neurotrophic factor-BDNF), siliar nörotropik faktör (ciliary neurotrophic factor-CNTF), (fibroblast büyüme faktörü (FGF) somatostatin (Parr and Parr, 1989), tümör nekrozis faktör-(TNF-) (Parr and Parr., 1989;

Grosskinsky et al., 1995), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) (Parr and Parr, 1989; Grosskinsky, 1995; Bischof and Campana, 1998) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (Parr and Parr, 1989; Giudice et al., 1998) gibi faktörlerin fizyolojik etmenler olduğu tartışılmakla birlikte apoptozisin devreye girdiği olaylar üzerine etkileri kesinlik kazanmıştır. Örneğin; IGF-1, IGF-2 ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayan Protein (IGFBP), menstrüel döngüde endometriyal gelişme ve implantasyon sürecinde önemli rol oynamaktadır (Duc-Goiran et al., 1999; Giudice et al., 1998). LIF, fare endometriyumunda implantasyon anında üretilmektedir. LIF'in salgılanması bu türlerde implantasyon için bir ön koşuldur (Duc-Goiran et al., 1999; Sunder and Lenton, 2000; Bischof and Campana, 1995). Blastosist dönemindeki embriyo, gelişimi sırasında birçok dejenerasyon gösterir. İlk etapta iç hücre kütesinde görülür ve bu hücrelerin %10'u komşu hücreler veya trofoblast hücreleri tarafından fagosite edilir. Embriyonik yaşamda apoptozisin görüldüğü diğer bir alan ise uterus epitelidir. Uterus hücrelerinde menstrüel döngü (özellikle luteal fazda), blastosist implantasyonu ve desidualizasyon sırasında apoptozis östrojen ve P₄, luminal ve bez epiteli implantasyon hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasının yanısıra apoptozise de neden olur (Parr and Parr, 1989; Galan et al., 2000). Apoptozis, implantasyon penceresi döneminde uterus glandular hücrelerinde gözlenmekte ve böylece endometriyal desidualizasyonun oluşumuna katkı yapmaktadır. Bu dönemdeki apoptozisin, bax geninin artışı ve bcl-2 geninin azalması ile gerçekleştiği ve bu iki genin salınımı ile kontrol edildiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada bax geninin apoptozis oluşumundan çok önce salgılandığı ve böylece bcl-2 yani hücre için hayatta kalma sinyali verecek olan genin salınımının inhibe edilerek endometriyal hücrelerde apoptozisin gerçekleştiği gösterilmiştir (Parr and Parr, 1989; Kamijo et al., 1998). Hem implantasyon hem de apoptozisi düzenleyen faktörlerin ortak olması, aynı faktörlerin her iki olayda da etkili olduklarını ve iyi bir embriyo gelişimini kontrollü bir şekilde sağladıklarını göstermektedir (Parr and Parr, 1989; Galan et al., 2000).

Çizelge 1: İmplantasyonda rolü olduğu bilinen faktörlerin kaynakları ve etkili oldukları implantasyon dönemleri (Gökçimen ve Temel, 2004).

İmplantasyonda rol oynayan faktörlerin primer kaynakları ve en etkili oldukları (+) implantasyon dönemleri.				
Faktör	Kaynak	Dönem I	Dönem II	Dönem III
Progesteron	Korpus luteum	+		
Östrojen	Korpus luteum	+		
HB-EGF	Endometriyum	+		
PGI-2	Endometriyum	+		
İntegrinler	Endometriyum	+		
Dezmozomal proteinler	Endometriyum	+	+	
Muc-1	Endometriyum	+		
Muc-4	Endometriyum		+	
H tip 1 antijeni	Endometriyum		+	
Le-y karbohidrat antijeni	Endometriyum		+	
	Blastokist		+	
HSPG	Endometriyum		+	
Trofinin				
Tastin	Endometriyum		+	
Bystin				
Kollajen IV	Endometriyum		+	
Laminin 2	Endometriyum		+	
Laminin 4				
CD44 izoformları	Endometriyum		+	
TGF- ?1	Endometriyum	+		
IL-1	Endometriyum	+		
IL-6				
IGF-1				
IGF-2	Endometriyum	+	+	
IGFBP				
LIF	Endometriyum		+	

S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2004;11(4):25-33

2.5. İnfertilite Nedenleri

Fertilite üreme kapasitesine sahip olmaktır ve fekundabilite (aylık dönem içerisinde gebe kalabilme potansiyeli) ile fekundite (bir menstrüel siklusta gebe kalabilme potansiyeli) teriminden köken almıştır. Fekundabilite oranları genel popülasyonda 0.22/ay gibi bir sabit değer olarak rapor edilmiştir. Fekundite ise 0.15-0.18/ay olarak tanımlanmış ve yıllık %90 toplam gebelik oranlarını oluşturmaktadır. İnfertilite ise genellikle kabul edilen tanımına göre bir yıllık korunmasız ilişki ile gebe kalamama olarak tanımlanmaktadır.

Çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite tanısı almaktadır. Son 50 yıldır infertilite prevalansı değişmeden sabit kalmıştır (Pabuçcu, 2005).

İnfertilite sebepleri genel olarak erkek partnere ait sebepler (19), dişi partnere ait sebepler (% 46.7), ya da her iki partnerin de sebep olduğu infertilite (%18.2) olarak tanımlanabilir. Açıklanamayan sebeplere bağlı infertilite ise %11.2 vakadan sorumluyken %5.2 vakada diğer nedenler sebep olmaktadır. Bu açıklanamayan sebeplerde normal standart testlerin bulunduğu çiftlerde patoloji oosit/sperm, embriyo kalitesi yada implantasyon düzeyinde olabilmektedir. Bazı diğer etyolojik faktörler; pelvik inflamatuvar hastalığı (PİH), endometriozisi, çevresel ve mesleki faktörleri (toksik ajanlar, madde bağımlılığı, ciddi diyet ve ileri yaş) ise infertilite riskini artırmaktadır (Pabuçcu, 2005).

2.5.1. Kadına Ait Sebepler

Tuboperitoneal Sebepler: Fallop tüplerinde gerçekleşen hasar ve anormallikler fertilitiyi etkileyecek, anormal implantasyondan (ektopik gebelik) sorumlu olacaktır. Distal tübal obstrüksiyon tübal sekresyonun birikimine, tübanın distansiyonuna ve epitelyal silyaların hasarına yol açacaktır. (Hidrosalpinks). Fallop tüplerindeki anormallikler ya da hasarlar kalıtsal ya da sonradan olabilmektedir. Proksimal tübal obstrüksiyonlar (10-30) ise tübanın dar kısmının (kornual) hasarlarını veya tıkaçlar ile tıkanmasını içermektedir (Pabuçcu, 2005). Dişi genital organlar aynı zamanda karın içerisini döşeyen periton ile örtülüdür ve periton boşluğunu paylaşmaktadır. Uterus arkasında cul de sac (douglas) oosit atılmasından sonra follüküler sıvıyı içermekte ve oosit fimbriyalar tarafınan dakikalar içerisinde tutulmakta ve ampullaya iletilmektedir. Herhangi bir anatomik defekt, pelvik kitleler ve adezyonlar, fizyolojik bozukluklar, geçirilmiş cerrahi, PİH yada endometriotik implantlar, ovaryen kist rüptürü gibi patolojiler bu mekanizmanın aksamasına neden olabilmektedir (Pabuçcu, 2005).

Pelvik İnflamatuvar Hastalık (PİH): Gonore ve/veya Klamidyanın en önemli patojenler olarak kabul edildiği PİH daha önce bahsedilen sebepler ile hem tübal hem de peritoneal faktörler sonucunda infertilite yaratabilmektedir. Laparoskopisi ile PİH infertilite insidansı %21 olarak rapor edilmiştir İlk epizod ile %34 olan tübal hasar ikinci ve üçüncü epizodlar ile %54'lere yükselmektedir. Klinik olarak tanı alan PİH, servikal ve serolojik tetkikler ile doğrulanmalıdır. Ancak bazen hasta hikayesinde PİH net olarak bulunmasa da HSG ya da laparoskopide geçirilmiş PİH bulguları gözlenebilmektedir (Pabuçcu, 2005).

Endometriyozis: Genel olarak endometriyum/ve veya gland yapısının uterus dışında bulunması layıdır. İnsidans hasta yaşı, düşük parite ve orta-yüksek sosyoekonomik sınıfla artmaktadır. Pelvik ağrı (dismenore, dispareni) ve infertilite iki ana şikayettir. Birçok teori olmasına rağmen ailesel hikayenin ve endometriyotik odaklarda kromozomal defektlerin sıklığı sebebi ile genetik bağlantı üzerinde durulmaktadır. İnsidansı primer (%26), sekonder (%13) infertilite vakasında rapor edilmektedir. Ciddi endometriozisde (III ve IV) fallop tüplerinde ve overlerdeki adezyonlar veya ovaryen endometriyomaların varlığı açık infertilite nedeni olarak tanımlanmaktadır. Ortaya atılan mekanizmalar sırası ile;

- Artmış peritoneal makrofajların sebep olduğu artmış sperm fagositozu
- Artmış sperm zona pellusida bağlanması
- Peritoneal lenfositlerin proliferasyonu
- Artmış sitokin düzeyleri
- Artmış immünoglobulin üretimi
- Embriyo toksik serum
- Defektif natural killer aktivitesi
- Luteal faz defekti
- Oligo-ovülasyon
- Luteinize unrüptüre follikül sendromu (LUF)

Endometriozis bazen diagnostik laparoskopide raslantısal olarak tespit edilir. Lezyon boyutları makroskobik düzeyden mikroskobik düzeye kadar değişebilmekte, klasik olarak siyah pigmente, şeker yanığı lezyonlar mesane overler, fallop tüpler, cul de sac ve barsaklarda görülebilmektedir. Nonpigmente lezyonlarda kırmızı veya beyaz renkte veya damarsal görünümde olabilmektedir. Ancak kesin tanı için biyopsi mutlak yapılmalıdır (Pabuçcu, 2005).

Ovaryen sebepler: Pubertede Hipotalamo-Hipofizer aksın matürasyonu ile FSH ve LH gonadotropin releasing hormon (GnRH) kontrolünde normal salınım paternine kavuşmaktadır. Her menstrüyel döngünün başında kohort folliküllerinden sadece bir oosit seçilerek dominans azalmakta ve preovulatuva düzeye kadar gelişmektedir. Bu gelişim esnasında iki hücre iki gonadotropin mekanizması ile granüloza hücrelerinden artan düzeylerde estradiol salınmakta ve negatif down regülasyon ile FSH düzeyini baskımlarken pozitif feed back mekanizması ile LH surge oluşturmaktadır. Bu tetikleme sayesinde

ovulasyon başlamakta, oositin II. Mayoz gelişimi, CL oluşumu ve P₄ salınımı gerçekleşmektedir (Pabuçcu, 2005).

Ovulatuvar problemler anovulasyon disfonksiyonu menstrüel döngü sıklığını ve süresini etkilemekte normal ölçüler dışına taşımaktadır. Bu problemler düzensiz yada gecikmiş ovulasyona neden olabileceği gibi anovulasyonla da sonuçlanabilmektedir.

Oligomenorenin en sık sebebi polikistik over hastalığı (PCOD) infertiliteye oldukça sık olarak neden olabilmektedir (Pabuçcu, 2005).

Anovulasyon ise amenore ile sonuçlanmaktadır. Amenore primer olabileceği gibi sekonder de olabilmektedir. Primer amenore genellikle gonadal gelişim defektleri, Turner sendromu (45X) ile ilişkili olmaktadır. Bu hastalar seksüel infantilizm, kısa boy, yele boyun, kubitüs valgus ve streak gonadlara sahip olmaktadır. Genel olarak düşünülen genetik defektin hızlı oosit depleksiyonuna sebep olduğu ve hipergonadotropik hipogonadizm ile sonuçlanmasıdır. Bir diğer sebep prematür ovaryen yetmezlikte hipergonadotropik hipogonadik bir süreç oluşturmaktadır. Diğer kromozomal anormallikler herhangi bir X kromozomu kısa yada uzun kolunda parsiyel delesyonun neden olduğu 46XX ve mosaizmi (X/XXX; X/XX/XXX; puregonadal disgenезis; 46,XX;6XY) sayılabilir (Pabuçcu, 2005).

Primer amenore ayrıca GnRH sentez, nörotransmitter defektleri ya da izole yetmezliği sonucunda hipogonadotropik hipogonadizm oluşturmakta ve anovulasyon gerçekleşmektedir. Diğer nedenler grubunda estradiol ve P₄ yapım kaskadındaki enzim defektleri (17-alfa hidroksilaz yetmezliği ve 17, 20- desmolaz yetmezliği, vb) oluşturmaktadır. Konjenital olarak uterus, vajen yada himen yokluğu veya anormalliklerinde de primer amenore oluşmakta ancak normogonadotropik ve diğer tanısall tetkikler ile ayırıcı tanı yapılabilmektedir (Pabuçcu, 2005).

Sekonder amenore gebelik dışı sebepler ile >6 ay ovülasyonun engellenmesi halidir. Bu durumda ciddi endokrin işlev bozukluğuna neden olan tiroid, adrenal ve hipofizer (hiperprolaktinemi) sebepler görülmektedir. Ancak sıklıkla prematür ovaryen yetmezlik ile karşılaşılmaktadır (Pabuçcu, 2005).

PCOD: Hipotalamo-Hipofizer disfonksiyon olarak tanımlanan PCOD oligomenore infertilite ile ilişkili en sık karşılaşılan problemdir. Hastalar irregüler menstrüel döngüler (35-90 gün) disfonksiyonel uterin kanama, menoraji, hiperandrojenizm bulguları hirsutismus ve obezite ile doktora başvurmaktadır. Bu hasta grubunda azalmış fertilitе, kötü obstetrik hikaye ve artmış gebelik kayıpları hikayede sıklıkla yer almaktadır. Hormonal incelemede FSH/LH oranları değişmiş hatta tersine dönmüş, diğer glandular disfonksiyonlar sebebi ile prolaktin, tiroid ve

adrenal hormonlarda yükselme saptanmaktadır. US incelemede ovaryen tekozis, ovaryen korteks altında periferik dizilimli küçük folliküller (<10mm) izlenmektedir. Hiperinsülinemi ve bulguları olabileceği gibi hipertrigliseridemi de görülmektedir. Artmış diabet mellitus, memeca, kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz riski göz ardı edilmemelidir (Pabuçcu, 2005).

Uterin Sebepler: Uterus menstrüel döngü kaskadının son organı olarak embriyo ve fetüsün gelişiminin olduğu yerdir. Bu nedenlerle direkt olarak ya da gebelik kayıpları ve prematür doğumlar gibi komplikasyonlar ile infertiliteye sebep olabilmektedir. Konjenital yada edinsel olarak sınıflandırılmakta ve tüm infertilite sebeplerinin %2-5'ini oluşturmaktadır (IVF Embriyoloji Rehberi, 2005).

Konjenital defektler uterus, fallop tüpler, serviks ve üst vajenin anatomik oluşumunu üstlenen mülleriyan kanalların komplet yokluğu (Rokitansky- Küster Hauser sendromu) ile arkuat uterus va vajinal septa (transvers-longitudinal) gibi minör anomaliler spektrumunda olabilmektedir. 1950-1970 yılları arasında özellikle gebelik kayıplarını önlemek amacı ile kullanılan dietilstilbestrol (DES) maruziyeti ilişkisi ispatlaması ile bu maruziyet sonrası mülleriyan anomali riskinin arttığı belirtilmiş ve son 40 yıl içerisinde bu anomalilerin sıklığı artmıştır. Daha sonraki yıllarda endometriyal kavite düzensizlikleri (T shape uterus), serviks malformasyonları hatta clear cell karsinoma birliktelikleri de gösterilmiştir. Servikal yetmezlik, unicornus uterus sonucu implantasyon problemleri, erken doğum ve erken gebelik kayıpları tanımlanmıştır (Pabuçcu, 2005).

Özellikle sekonder infertilitede dilatasyon ve kürtaj, zor doğum, intrauterin araç, geçirilmiş cerrahi sonrası endometrit, adezyon yada sineşi (Asherman sendromu) ile endometriyal kavitenin parsiyel yada total obliterasyonu olabilmektedir. Plasental kalıntılardan plasental polipler veya hormonal endometriyal polipler gelişebilmekte, intramural, summüköz myomlar kavite distorsiyonuna neden olmakta obstetrik komplikasyonlara ve implantasyon bozukluğuna sebep olmaktadır (Pabuçcu, 2005).

Servikal Sebepler: Servikal faktörler ile ilişkili infertilite insidansı % 5-10 oranlarında rapor edilmiştir. Uterin serviks ilişki sonrasında sperm transportu ve kapasitasyonunda merkezi bir görev üstlenmiştir. Menstrüel siklus dönemlerine bağımlı olarak servikal mukus üzerinde üretim, miktar ve karakteristik olarak değişiklikler özellikle geç folliküler fazda gerçekleşmektedir. Ovülasyondan yaklaşık 24-48 saat öncesinde mukus sekresyonu artarak maksimal düzeye çıkmakta, daha ince, sulu alkali, asellüler ve elastik bir hal almaktadır. Bu

düzye bir filtre gibi davranarak anormal spermatozoa ve sellüler debrisleri filtre etmekte, mikrokanallar oluşturarak sperm transportu sağlamaktadır (Pabuçcu, 2005).

Sperm-mukus interaksiyonlarındaki anormalliklere bağı olan servikal faktör infertilitede tanımlanmıştır. Bu ilişkiyi incelemek amacıyla post koital test (PKT) olarak da bilinen Sims-Huhner test kullanıma girmiştir. Bu testle spermatozoonların sayısı, motilitesi, preovulatar dönemde servikal mukus ilişkisi değerlendirilir.

Pozitif PKT için 0.3-1 ml>10cm spinbarkeit, fering patern, selülarite ve 10-20 büyütme alanında sayı ve ileri motilite gözlenmelidir. Anormal PKT sonuçları: 1) kötü zamanlama, 2) servisite bağı bozukluklar (bakteri, mantar), 3) düşük Ph 4) sperm antibody mevcudiyeti 5) yanlış ilişki tekniğı (prematür ejakülasyon), 6) tanı almamış male faktör infertilite, ve/veya 7) anatomik anomalilere bağı elde edilebilmektedir. Bu nedenle kati tanı dikkatlice diğere testler ışığında konulmalıdır (Pabuçcu, 2005).

Endometriyal Sebepler: Endometriyum menstrüyel döngü boyunca hormonal sekresyona cevap olarak değışiklikler göstermektedir. Özellikle implantasyon, gebeliğın ve embriyonun gelişimi açısından bir diğere önemli faktördür. Luteal faz defektleri (LFD) endometriyal gelişimi ile menstrüyel siklus tarihi arasındaki korelasyon endometriyal biyopsi ile tanı almaktadır.(>2 gün). Bu bulguların en az ikisi menstrüyel döngüde gözlenmesi gerekmektedir. Tekrarlayan abortuslara da sebep olan LFD özellikle ovulatar disfonksiyon ile bağlantılıdır. Sırası ile ovülasyon zamanında follikül boyut olarak küçük ve immatürdür, preovulatar LH surge daha düşük düzeyde kalmaktadır ve bu düzey oosit mayozu için yeterli ise de follikül rüptürü ve CL işlevi için yetersiz kalabilmektedir. Serum P₄ düzeyleri tanı için iyi bir parametre olmamaktadır. Tedavide bu hastalarda endometriyal P₄ reseptörleri daha yüksek düzeylere hassas olduğundan daha yüksek P₄ kullanılmaktadır. Ayrıca endometriyal respitivite açısından onormal endometriyal proteinlerin salınımı, anormal integrin/adezyon molekülleri, anormal T hücre ve naturel killer aktiviteleri, embriyotoksik faktörlerin sekresyonu, uterin perfüzyon anormallikleri de endometriyal sebepler arasında sayılmaktadır (Pabuçcu, 2005).

2.5.2. Erkek Faktörü

Erkek eş mutlaka en az bir ay ara ile spermiyogram tetkiki ile incelenmelidir. Dikkatli özgeçmiş hikayesi alınmalı, çocukluğa ait ateşli hastalık, enfeksiyon, travma, geçirilmiş operasyon, konjenital yapı bozukluğu, varikosel, vb. irdelenmelidir. Etiyoloji pre-testiküler,

testiküler, post-testiküler nedenlere bağlı olabilir. Pre-testiküler sebepler, hipotalamik hastalık ve hipofizer hastalıklar olarak iki başlıkta izlenebilir. Hipotalamik sebepler GnRH yetmezliklerine bağlıdır. Bu hipogonadotropik süreci oluşturan hastalık ve sendromlar arasında izole LH ve FSH yetmezliği ve GnRH yetmezliği, konjenital hipogonadotropik sendromlar sayılabilir. Hipofizer hastalıklar ise genel olarak hipofizer disfonksiyona sebep olan infiltratif hastalıklar, tümörler, operasyonlar ve radyasyon maruziyeti, hiperprolaktinemi, hemokromatosis, vb. görülmektedir (Pabuçcu, 2005).

Testiküler sebepler arasındaki bazı somatik kromozomal anormallikler erkek infertilitesi ile ilişkilidir. Kromozomal anormallikler % 6.2 infertil erkek partnerde görülmektedir. Sperm sayısı <10 milyon/ml olan subgruplarda ise bu oranlar %11'e kadar çıkmaktadır. Azospermik hastalarda ise %21 gibi ciddi oranlar rapor edilmektedir. Klinefelter sendromu ekstra bir X kromozomu varlığında olmakta ve 1/500 erkekte görülmektedir. Jinekomasti yanında azospermi, gecikmiş seksüel maturasyon görülmektedir. Ayrıca Noonan sendromu (erkek Turner sendromu), sertoli cell only sendromu, miyotonik distrofi, bilateral anorşi, travma, gonadotoksinler, sistemik hastalıklar (renal yetmezlik, hepatik hastalık, sickle cell anemi), defektif andojen sentezleri, kriptoorşidizm ve varikosel testiküler infertilite sebepleridir.

Varikosel infertil erkek partnerlerde en sık tespit edilen bulgudur. Spermatik venlerde valvüler yetmezlik ya da yokluk sonucu oluşmakta ve %90 sol testiküler vende görülmektedir. Unilateral sağ varikosel venöz tromboz, situs invertus yada tümör varlığını gösterebilmektedir. İnfertil popülasyonda %40-50 gibi yüksek oranlarda görülen varikosel semen kalitesini bozmakta ancak tüm erkek partnerler infertil olmamaktadır. Venöz staz sonucu testiküler ısı artışına bağlı olarak;

1. Adrenal ya da böbreklerden toksik metabolitlerin retrograd akımı
2. Germinal epitelde kan akımı azalması
3. Hipotalamik – hipofizer ve gonadal aksa bozukluklar oluşmakta,
4. Spermatogenez etkilenmektedir.

Ancak, infertil erkeklerin en az %25-40'ında herhangi bir sebep gösterilememektedir. Yeni nedenler açığa çıktıkça ve erkek reproduktif fizyolojisinde yeni buluşlar gerçekleştikçe bu oranın azalacağı düşünülmektedir.

Post-testiküler sebepler, sperm transportu bozuklukları, sperm motilite veya fonksiyon bozuklukları ve seksüel disfonksiyon yapan nedenler görülmektedir. Sperm transport disfonksiyonları konjenital, edinsel ya da fonksiyonel bozukluklar sonucu olabilmektedir. Motilite yada sperm fonksiyon bozuklukları sperm kuyruk anomalilerine, maturasyon

defektleri, immünolojik bozukluklar ve enfeksiyon sonrasında oluşmaktadır. Yine seksüel disfonksiyon da erkek infertilitesi sebeplerindedir (Pabuçcu, 2005).

İmmünolojik nedenler: Açıklanamayan infertilitede antikörlerin rolü tartışmalıdır. Çesitli çalışmalar nükleer ve tiroid antijenlerine karşı oluşan otoantikörlerin, AFA ve ASA infertil hastalarda normal kadınlara göre daha fazla bulunduğunu göstermiştir.

Antifosfolipid antikor (AFA)'lar: AFA negatif yüklü hücre membran fosfolipidlerini bağlar ve sonuçta rekürren gebelik kayıpları ile bağlantıları vardır. AFA' u olan hastaların desidual damarlarında spesifik antikor birikimi gösterilmiştir.

Antisperm antikörler (ASA): ASA' da hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunan heterojen bir grup antikördür ve açıklanamayan infertilitede rolü olduğu düşünülmektedir. Spermier spermatogenez modülatörleri, kapasitasyon indükleyicileri, sperm ve oosit ilişkileri regülatörleri olarak hizmet eden kompleks antijenler açısından zengindir. Sperm antijenleri, vazektomi, travma, cerrahi veya konjenital anomalilere bağlı mekanik obstrüksiyon olgularında immünolojik sığınaklarından kaçabilirler. Örneğin kistik fibrozisi ve buna bağlı konjenital bilateral vas deferens yokluğu olan erkeklerin %71'inde motil sperme bağlanmış ASA vardır. ASA fertilizasyon öncesi fertilizasyon sırası ve sonrasında reproduktif işlemleri bozabilir, sperm transportunu ve zigot gelişmesini engelleyebilir.

2.5.3. Açıklanamayan İnfertilite

Bazı çiftlerde standart infertilite tetkikleri ile herhangi bir sebep gösterilememektedir. İnsidansı, hastaların araştırılma protokolleri, referans merkez olup olmaması, ileri diagnostik testlerin kullanılıp kullanılmamasına göre %10-15 olarak değişmektedir. Laporoskopinin kullanılmasıyla bu insidansı < 10 düşmektedir. Bazen çiftlerde herhangi bir sorun olmamakta bazı vakalarda ise kesin tanı koymak imkansız olmaktadır.

Bu çiftlerde tedavisiz 1.3 % siklus başına gebelik oranları, intaruterin inseminasyon ve ovulasyon indüksiyonu %8.3-17.1 ve IVF-ET ile %20.1'lere çıkmaktadır. Bu oranlar ile diğer sebeplerin tedavi sonuçları arasında ciddi farklar gözlenmemektedir (IVF Embriyoloji Rehberi, 2005).

2.4.3. In vitro fertilizasyon ve embriyo transferi (IVF–ET)

Oositin IVF'i ve zigotun uterusu taşıması (ET) yöntemi, birçok kısır (tüpleri tıkalı) kadının çocuk sahibi olmasını sağlamıştır. İlk IVF çocuğu (Louise Brown) 1978'de doğdu. Bundan sonra binlerce doğum gerçekleştirildi ve değişik yöntemler geliştirildi. IVF–ET'nin evreleri aşağıdaki gibidir:

Gonadotropinler uygulanarak ovaryum folliküllerinin büyümesi ve olgunlaşması stimüle edilir.

Olgun folliküllerden çok sayıda oosit laparoskopi ile aspire edilir. Oositler ultrason yardımıyla ve özel bir kateterle vajen duvarından girilip, ovaryuma ulaşılarak da toplanabilir (OPU). Oositler özel bir kültür medyumuna ve kapasite edilmiş sperm içerikli petri kutularına alınır.

Oositlerin fertilizasyonu ve yarıklanma mikroskopla izlenir.

Bölünen zigotlar (yarıklanmış embriyolar) dört ya da sekiz hücreli evreye ulaştıklarında, bir kateter yardımıyla, vajina ve servikal kanal yoluyla uterusu taşınır. Gebeliğin başarı oranı artırmak için 2-3 ET yapılır.

IVF'de çoklu gebelik riski, normal gebelikten daha yüksek olmuştur. Transfer edilen embriyolarda spontan abortus sıklığı normallerden fazladır. Bunun nedeni IVF sırasında gelişen kromozom ya da başka bir hücresel anomali olabilir (Pabuçcu, 2005).

2.4.6a. Embriyonun dondurularak saklanması

IVF sonucu oluşturulan embriyo ya da blastosistler, kryoprotektanlar (gliserol gibi) içinde dondurularak uzun süre saklanabilir. Daha sonra donu çözülerek uterusu transfer edilip, başarılı bir gebelik sağlanabilir.

2.4.6b. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)

Bir sperm matür bir oositin sitoplazmasına enjekte edilebilir. Bu teknik, IVF'in başarılı olmadığı durumlarda ya da in vitro seminasyon için yeterince sperm elde edilemediğinde başarıyla kullanılabilir.

2.4.6c. Yardımlı in vivo fertilizasyon

Gamet intrafallopiyan transfer (GIFT) denilen bu teknikte, fertilizasyon tuba uterinalarda gerçekleştirilir. Önce superovulasyon sağlanır (IVF'de olduğu gibi), oositler toplanır, spermeler biriktirilir ve oositler ile spermeler laparoskopik yöntemle tuba uterina lümenine yerleştirilir. Bu teknikte fertilizasyon normal yerinde; yani, ampullada olur.

2.7. Endometriyal Ko- Kültür Endikasyonları

- 1) Önceki yardımcı üreme teknikleri denemelerinde iyi kalitede ET'ne rağmen gebelik elde edilemeyen hastalar.
- 2) Önceki yardımcı üreme teknikleri denemelerinde düşük kalitede embriyo gelişimi (yüksek oranda fragmantasyon, düzensiz klivaj / yarıklanma, garnülasyon vakuo oluşumu) gözlenen hastalar.
- 3) Önceki yardımcı üreme teknikleri denemelerinde yavaş embriyo gelişimi gözlenen hastalar (3. Günde 6 blastomerden az hücre gözlenmesi)(Karaöz, 2009).

Endometriyal ko-kültürden aşağıdaki durumlarda yararlanılmaktadır:

- 1) Metabolik kilitlenme: Rutin kültürlerden farklı olarak ko-kültürlerde moleküler ağırlığı düşük bazı metabolitler, genetik aktivasyonu sağlayarak embriyo metabolizmasına süreklilik getirir. Bu da embriyonun normal olmayan metabolik gelişimini, yavaş gelişimini ya da gelişim duraksamasını engeller.
- 2) Toksik bazı metabolitlerin uzaklaştırılması: Somatik hücrelerde antioksidan sistemler embriyo için zararlı olabilecek metabolik artıkları embriyo çevresinden uzaklaştırılmasını sağlarlar. Ayrıca hücre genetik materyalini mutasyona uğratan serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması da aynı sistemle sağlanır.
- 3) Embriyo gelişimini destekleyen ve düzenleyen büyüme faktörlerinin (LIF, IGF, GM-CSF, TGF α , IL α) ve sitokinlerin ortam içerisinde belirli bir dengede oluşturularak miktarlarının stabilizasyonu sağlanır.
- 4) Endometriyal hücrelerin embriyonik parakrin molekül salgılaması ve (β 3 İntegrin) sonucu özellikle TİP hastalarında endometriyal reseptivite artırılır.
- 5) TİB hastalarının 3. Gün embriyo gelişiminin Pre implantasyon genetik tanı (PGT) öncesi biyopsi kriterlerine uygun düzeye getirilmesi sağlanır (Karaöz, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Yardımla Üreme Teknikleri Merkezi ile Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'nde ortak olarak yürütülmüştür. Bu çalışmaya katılan kadın hastalar için Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan (10.02.2009 tarih, proje No: 2009/30, İAEK Sayı: 4/20) onay alınmıştır.

Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezi'ne başvuran kadın hastalardan etiyolojisi itibariyle ko-kültür yöntemi için uygun görülenler çalışmamıza dahil edildi (n:11). Hastaların menstrüel sikluslarının 21. günü yani luteal fazda endometriyal biyopsi örneği alındı. Seçilen hastalardan çok sayıda oosit elde etmek amacıyla kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) uygulandı. KOH protokolü için yeterli over cevabın elde edilmesi, hipofizin baskılanması nedeniyle siklus iptalini azaltan uzun protokol seçildi. Hastalara menstrüel siklusun 21. günü 10 mg Lucrin başlandı. Menstrüel kanamanın 2. günü hastaya gonadotropin başlandı ve Lucrin dozu 5mg'a düşürüldü. En az 3 adet 17 mm üzerinde folikül olduğu zaman çatlatma iğnesi hCG enjeksiyonu yapıldı. Alınan endometriyal biyopsi örneğine aşağıdaki endometriyal ko-kültür protokolü uygulandı (Karaöz,2010)

3.1. Endometriyal Ko-kültürleri Hazırlanması

3.1a. Endometriyal ko-kültür hazırlığında kullanılan malzemeler:

- 1- İnce uçlu penset.
- 2- İnce uçlu makas
- 3- Cam pastör pipeti
- 4- 5 ml polystiren tüp (Falcon katalog no:352003)
- 5- 10 ml polystiren tüp (Falcon katalog no :352001)
- 6- 15 ml vida kapaklı konik tüp (Falcon katalog no :352095)
- 7- 0.45 µm filtre (Sartorius katalog no:16555)
- 8- 0.22 µm filtre (Sartorius katalog no:16534)
- 9- 10 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril, Falcon katalog no:357551)

- 10- 5 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril, Falcon katalog no:357543)
- 11- 2 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril, Falcon katalog no:357507)
- 12- 1 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril, Falcon katalog no:357521)
- 13- 35 mm petri kabı (Falcon katalog no:353801)
- 14- 60 mm petri kabı (Falcon katalog no:353802)
- 15- 100 mm petri kabı (Falcon katalog no:353803)
- 16- 78 cm² hücre kültür flask (Falcon katalog no: 353024)
- 17- 25cm² hücre kültürlü flask (Falcon katalog no:353014)
- 18- 4-kuyucuklu hücre kültür kabı (Nunc katalog no :176742)
- 19- Kriyotüp (Nunc katalog no:375418)

3.1b. Endometrial ko-kültür hazırlığında kullanılan solüsyon ve kimyasal maddeler:

- 1-Earle' Balanced Salt Solution (Sigma katalog no: E2888)
- 2-Hepes Buffer (1M) (Sigma katalog no : H0887)
- 3-Pirüvik Acid (Sigma katalog no : P2256)
- 4-Dulbecco's PBS (GIBCO katalog : 14287-080)
- 5-RPMI-1640 (Sigma katalog no: R8758)
- 6-Pen.-strep.-ampho. sol.(biological industries kotalog no: 03-033-1C)
- 7-HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)
- 8- %0.2'lik Kollajenaz tip 2 (Sigma katalog no: C-6885) solüsyonundan 40 ml hazırlamak için:**
 - %5 oranında antibiyotik (Pen.-strep.-ampho. ; 5000 mg/100ml)
 - 0.08 gr kollajenaz tip 2
 - 40 ml HBSS koyulur ve 37 derecede 30 dak. bekletilip kollajenazın eridiğinden emin olunduktan sonra 22 µm'lik filtreden geçirildi.
- 9-Anne serumunun hazırlanması:**
 - Anne adayından 50 ml heparinsiz tüplere kan alındı.
 - 4000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
 - Serum alınarak başka bir tüpe kondu ve 56 °C'de inaktive edildi.
 - 22 µm'lik filtreden geçirildi.
- Besiyeri hazırlanması :**
 - 50 ml için:
 - 45 ml RPMI 1640

- 5 ml anne serumu

- 250 µl antibiyotik (Pen-strep-ampho; %0,5 oranında) eklendi ve 37°C 'ye getirildikten sonra kullanıldı.

10- Dimetilsülfoksit – DMSO (Sigma katalog no : D-5879)

11- %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu (Etilen DiAmin Tetra asetik asit) (Gibco BRL katalog no : 25200-056)

12- Minimum Essential Medium-alfa (Gibco BRL katalog no : 41061-029)



Şekil 3.1 : Kültür ortamlarının hazırlanışı (<http://www.tupbebek-genetik.com> / icerik / laboratuvar / embriyoloji/)

3.1c. Endometriyal Ko-Kültür Protokolü (Şekil 3.1)

- 1- Luteal faz endometriyumdan alınan biyopsi örneği, hastanın 50 cc kanı ile birlikte laboratuvara %5 oranında penisilin-streptomisin-amphoteresin (5000µg/100ml) içeren HBSS içeren 15 ml'lik santifüj tüpü ya da steril idrar / semen kabı içerisinde getirildi ve steril penset yardımı ile HBSS içeren 3 adet petriden birincisine aktarıldı.
- 2- Doku üç kez HBSS içinde yıkandıktan sonra boş bir petriye alındı (dördüncü petri). Endometriyum dokusu steril cerrahi makas yardımı ile petri içerisinde arka arkaya seri bir şekilde kesilerek parçalandı. Parçalama işleminde elde edilen parçaların en büyüğü 1x1x1 mm boyutta oluncaya kadar devam edildi.
- 3- Üzerine 10 ml %0.2'lik kollejenaz tip II solüsyonu eklendi ve tüm parçalar santrifüj tüpüne aktarıldı. Çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 5 dk bekletildi.
- 4- Pipetle homojenize edildi.
- 5- 5 dk birim gravitede sedimentasyona bırakıldı.
- 6- Sedimentasyon sonrasında süpernatant 15 ml'lik tüpe alınarak 1900 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
- 7- Pellet %10 maternal serum ve penisilin-streptomisin (5000µg/100ml) içeren 1ml RPMI-1640 ile sulandırıldı.
- 8- Bu enzimatik işlem dört kez tekrarlanarak toplam dört adet stroma ve küçük gland hücrelerini içeren tüp elde edildi.
- 9- Dört adet tüp birleştirilerek santrifüj edildi, kültür medyumunu eklenerek bir kez daha santrifüj edildi ve stroma olarak ekilip ve inkübatöre kaldırıldı.
- 10- Glandlar (ilk tüpten artan pellet) 10 ml HBSS ile resüspanse edildi.
- 11- 30 sn birim graviteye bırakıldı.
- 12- Tüpün üstünden 8 ml alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve 5 dk birim graviteye bırakıldı.
- 13- Süpernatant atıldı. Pellet (glandlar) %10 maternal serum ve penisilin-streptomisin (500µg/100 ml) içeren RPMI-1640 ile sulandırıldı.
- 14- Flaska ekim yapıldı. 37 °C %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.
- 15- İki-üç günde bir medya değişimi yapılarak inverted mikroskopta gözlendi.
- 16- Hücreler konfluent hale geldiğinde tripsin-EDTA ile pasaj yapıldı.
- 17- Hücrelerin üzerine % 10 maternal serum ve penisilin-streptomisin (500µg/100 ml) içeren RPMI-1640 ekleyerek 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.

18- Hücrelerin üzerine önceden hazırlanmış dondurma solüsyonu (maternal serum:dimetil sülfoksit, 9:1) eklendi. Homojenize edilerek kriyo tüplere (1ml/tüp) aktarıldı.

19) -70 °C’de bir gece bekletildikten sonra sıvı nitrojene aktarıldı.

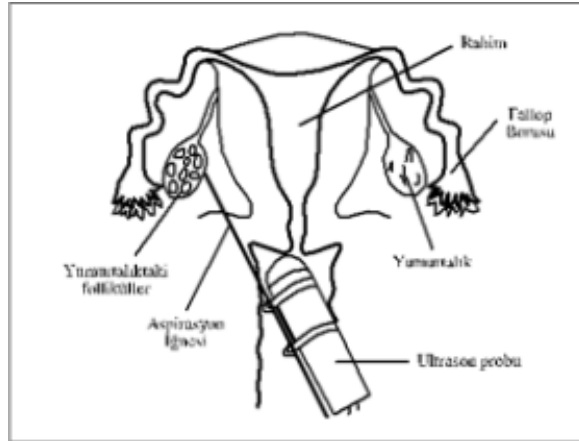
20- Hücreler hastaya hCG uygulaması yapıldığı gün çözüldü; hücre sayısı ve canlılığı saptandı.

21- Her bir kuyucuğa 500.000 olacak şekilde dört gözlü (four well) petrinin iki adetinin içerisine lamel konarak ekim yapıldı. Petri üzerine hasta adı ve ekim tarihi yazıldı. Hücre sayısı, kalınlığı ve genel hücre morfolojisi formlara not edildi.

22- Ertesi gün petri yüzeyine tutunan hücreler aynı solüsyonla yıkandıktan sonra solüsyon tazelendi ve üzeri yağ ile kaplandı. 5 adet hazırlanan dört gözlü petrinin bir tanesi yağlanmadan kontrol boyaması için inkübatörde bekletildi.

3.2. OOSİT TOPLAMA (Oocyte pick up; OPU)

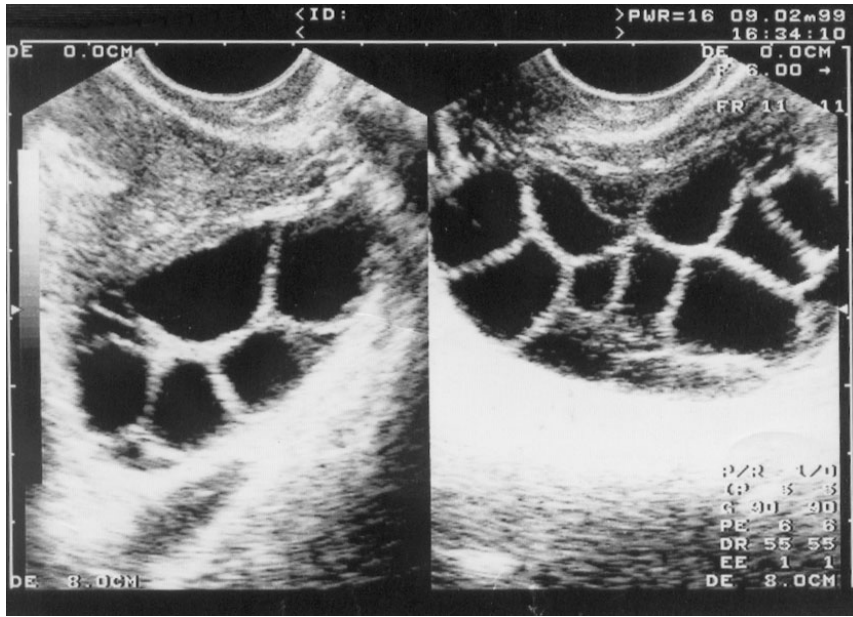
OPU, kolay ve genellikle ciddi ağrıya yol açmayan bir işlem olup anestezi altında yapıldığından işlem gününden önceki akşam saat 24:00’den itibaren hiçbir şey yiyip içmemeleri ve sabah bildirilen saatte, aç olarak merkezimize gelmeleri ve Hcg



Şekil 3.2: Vajinal ultrasonografi ile yönlendirilen bir iğne yardımıyla oosit toplanması

(<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

Hastalara yumurta çatlatma iğnesi hCG uygulamasından 2 gün sonra OPU işlemi doktor tarafından ultrasonografi (US) probuna sabitlenmiş bir OPU iğnesi eşliğinde oositler steril bir tüp içerisine aspire edildi ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi (Şekil 3.2 ve 3.3) Embriyoloji laboratuvarında bir embriyolog tarafından, steril tüp içerisinde gelen oositler, steril kabin içerisinde stereomikroskop altında, folikül sıvısı içinden steril tek kullanımlık cam pipet yardımıyla alındı. Gelişimini devam ettirebileceği HTF (Human tubal fluid) medyumu içerisine konuldu (Bu işlem yumurta sayısına bağlı olarak yaklaşık 15-20 dakika sürmektedir). hCG enjeksiyonunun doğru zamanda ve doğru şekilde yapılması çok önemlidir. hCG enjeksiyonunun yanlış uygulanması durumunda, oositler gelişimlerini tamamlayamazlar ve mikroenjeksiyon için yeterli olgunlukta ve sayıda oosit elde edilemez. Bu nedenle hastalar hCG enjeksiyonu konusunda ayrıntılı şekilde bilgilendirildi.



Şekil 3.3 : Ultrasonografi ile görüntülenen foliküller (<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

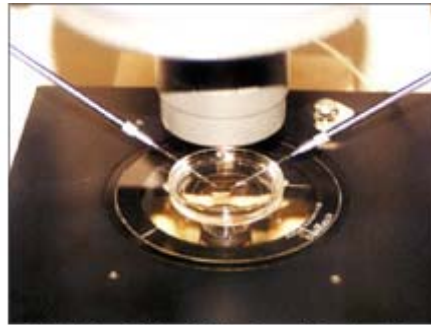
3.3. ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

OPU işlemi sonucunda elde edilen yumurtalar önce çevresindeki kümülüs hücrelerinden temizlenerek, olgun ve kullanılabilir durumda belirlendi.

Mikroenjeksiyon işlemi yapılacak olan steril, toksik olmayan plastik kapta, önce erkeğe ait spermelerin konulacağı özel medyum içeren bir havuz oluşturuldu.

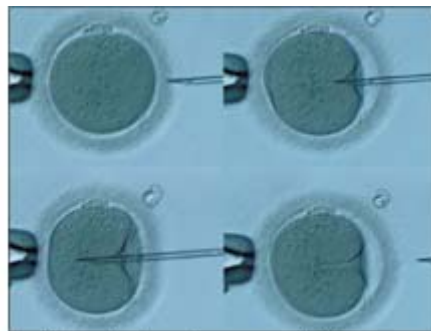
Mikroenjeksiyon uygulaması, mikropipetler yardımı ile Olympus Invert Mikroskop altında sperm, oosit içine enjekte edilmesidir. İşlemler mikroskobun ısıtılmış yüzeyinde, 200–400 X büyütme altında ve mikromaniplatör aracılığı ile yapıldı (Şekil 3.4)

Bu işlem için oositlerin konulacağı özel medyum içeren mikro damlacıklar hazırlandı. Sperm ve oosit kendilerine ait yerlere konulduktan sonra mikroskop altında şekil olarak normal görünümlü ve varsa hareketli sperm seçilerek mikroenjeksiyon pipeti ile kuyruğun orta bölümüne bastırılarak hareketsizleştirildi. Kuyruk kısmından yakalanan sperm pipet içine alınarak oositin içinde olduğu damlacığa gidildi. Özel tutma pipeti ile sabitlenen oositin içine hareketsizleştirilen sperm enjekte edildi. Bu işlem tüm oositlere aynı sıra ile uygulandı (Şekil 3.5). İşlem bittikten sonra yumurtalar HTF medyumuna alınarak Sanyo MCM-18M markalı inkübatöre konuldu. İşlemden 18 – 20 saat sonra dölllenme kontrolü yapıldı.



ICSI işlemi için kullanılan mikropipetler

Şekil 3.4 :Invert mikroskopta ICSI işlemi (<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)



İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

Şekil 3.5: ICSI işlemi (<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

3.4. OPU Sonrası Embriyolar

3.4.a. OPU Sonrası 1. Gün:

Dört gözlü petri kabında, sabah ko-kültür hücreleri üç beş kere taze medyum ile yavaşça pipetlemek suretiyle yıkandı (bu işlem için Falcon 7575 pipet kullanıldı). Yapışmamış ölü hücreler, parçalanmamış kütleler ve eritrositler bu sırada uzaklaştırıldı. 2 göze 1:10 human serum albumin (HSA) ile hazırlanıp gazlanan life globalden 0.75 ml medyum eklendi, üzeri 0.5 ml inkübe edilmiş yağ ile kaplanarak inkübatöre yerleştirildi. Olympus Invert Mikroskop altında okuma sonrası, embriyoların bir kısmı konvansiyonel kültür ortamına aktarılırken (n=80), bir kısmı ko-kültür (n=25 embriyo) ortamına alındı. Kültür ortamlarına aktarılan embriyolar, embriyoloji laboratuvar formuna kaydedildi. Embriyoların fotoğrafları çekildi. Diğer 3 adet dört gözlü petrinin RPMI solüsyonu her gün tazelendi. Bu işlem ikinci, üçüncü ve dördüncü gün olmak üzere gerçekleştirildi.

3.4b. OPU Sonrası 2. Gün:

Embriyo gelişimi kontrol edildi (blastomer sayısı, sitoplazmik fragmentasyon oranları). Embriyoların konulacağı dört gözlü petrinin 2 gözüne 1:10 HSA ile hazırlanıp gazlanan life globalden 0.75 ml medyum eklendi, üzeri 0.5 ml inkübe edilmiş yağ ile kaplandıktan sonra embriyolar konulup inkübatöre yerleştirildi. Gelişen embriyoların fotoğrafları çekildi. Geride kalan dört gözlü petrilerin RPMI solüsyonu hergün tazelendi. Kültür petrileri inkübatöre alındı. Aktarılan embriyoların olduğu dört gözlü petrideki endometriyal hücreler fikse edildi.

3.4c. OPU Sonrası 3. Gün:

Embriyoların gelişimleri kontrol edildi (blastomer sayısı ve sitoplazmik fragmentasyon oranları). Kayıtlar embriyoloji laboratuvar formuna geçirildi. Embriyoların konulacağı dört gözlü petrinin 2 gözüne 1:10 HSA ile hazırlanıp gazlanan life globalden 0.75 ml medyum eklendi, üzeri 0.5 ml inkübe edilmiş yağ ile kaplandıktan sonra embriyolar konulup inkübatöre yerleştirildi. Gelişen embriyoların fotoğrafları çekildi. Geride kalan

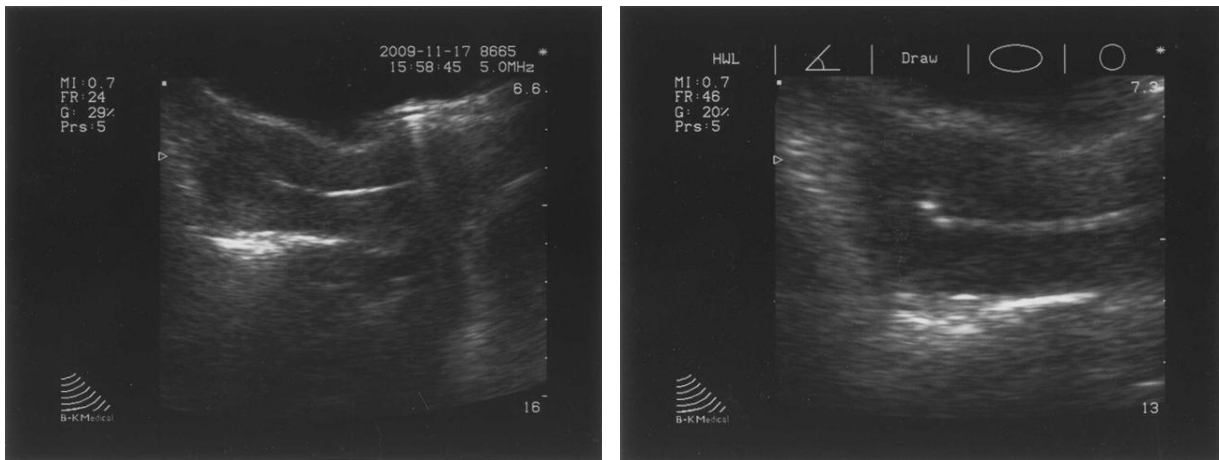
dört gözlü petrilere RPMI solüsyonu her gün tazelenir. Kültür petrilere inkübatöre alındı. Aktarılan embriyoların olduğu dört gözlü petrideki endometriyal hücreler fikse edildi.

3.4d. OPU Sonrası 4. Gün:

Ko-kültür petrilindeki hücrelerin canlılığı ölçüldü. Embriyoların gelişimleri kontrol edildi (blastomer sayısı ve sitoplazmik fragmentasyon oranları). Kayıtlar embriyoloji laboratuvar formuna geçirildi. Embriyoların konulacağı dört gözlü petrinin 2 gözüne 1:10 HSA ile hazırlanıp gazlanan life globalden 0.75 ml medyum eklendi, üzeri 0.5 ml inkübe edilmiş yağ ile kaplanarak inkübatöre yerleştirildi. Gelişen embriyoların fotoğrafları çekildi. Kültür petrilere inkübatöre alındı. Aktarılan embriyoların olduğu dört gözlü petrideki endometriyal hücreler fikse edildi.

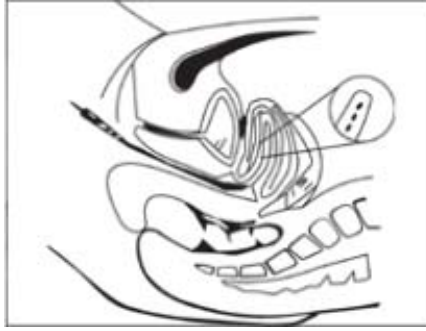
3.4e. OPU sonrası 5. gün:

İyi kalitedeki embriyo ya da embriyolar transfer edildi. Embriyoların uterus içine verileceği en uygun yerin saptanması ve endometriyuma dokunulmaması açısından, ET işlemi dolu mesane (idrar torbası) ile US eşliğinde yapıldı (Mesanenin dolu olması transfer işlemi kolaylaştırmaktadır). Yüksek çözünürlüğü olan US kullanımı da transfer işleminin daha iyi görülmesi; başarıyı olumlu etkilemektedir (Şekil 3.6). Uterusun öne doğru bir eğimi varsa uterus ve serviks arasındaki açığı azaltmakta ve böylece uterusu düzleştirerek transfer kateterinin geçişini kolaylaştırmaktadır.



Şekil 3.6: Embriyo transfer işleminin ultrasonografik görüntüsü (<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

ET işlemleri sırasında servikste bulunan mukus steril bir çubuk ile temizlendi, ince ve yumuşak bir kateter yardımı ile embriyolar uterus içerisine bırakıldı (Şekil 3.7). Transferde yumuşak kateter tercih edilmesi, servikste kanama riskini de azaltmaktadır. Kullandığımız kateterlerin uçları US ile gözlemlendiği için embriyoların uterus içine bırakılacağı bölge net olarak tespit edilebilirdi. Embriyolog tarafından laminar flow hood içinde katetere yüklenen embriyoların transferi cerrah tarafından nazik bir şekilde yapıldıktan sonra kateter yavaşça çıkarıldı ve embriyolog tarafından mikroskop altında bakılarak embriyoların tümünün transfer edildiği kontrol edildi. Transferde kullanılan dışında gelişen embriyo varsa embriyo kalitesine göre donduruldu veya imha edildi. Aktarılan embriyoların olduğu dört gözlü petrideki endometriyal hücreler fikse edildi



Şekil 3.7 : Özel bir kateter yardımıyla embriyoların uterusu nakledilmesi
(<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

3.5. ERKEN VE İLERİ DÖNEM EMBRİYO GELİŞİMİ

Tüp bebek tedavisinde en önemli basamak, laboratuvar şartlarında embriyo gelişiminin sağlanmasıdır. Döllenme sağlandıktan sonra, laboratuvar koşulları ve çalışan ekibin tecrübesi dahilinde embriyo gelişimi takip edilerek uygun olan günde transfer işlemi gerçekleştirilir.

3.5a. Erken Embriyo Gelişimi

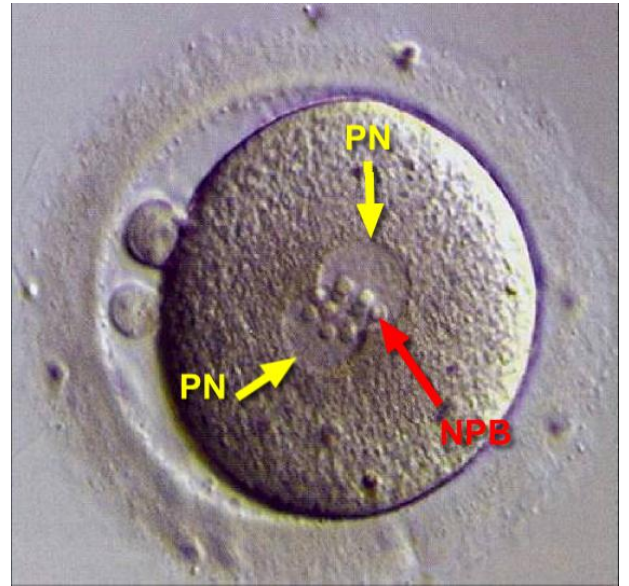
Pronükleer değerlendirme ve sınıflandırma

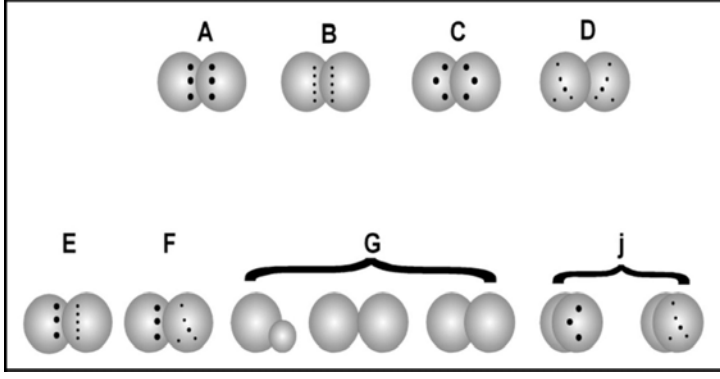
Fertilizasyonun kontrolü IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 12-18 saat sonra yapıldı. Fertilizasyonda, 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimciği gözlemlendi ve bu evrede değerlendirilen parametreler (Şekil 3.8) ;

Pronükleusların (PN) pozisyonu ve boyutu, Nükleolus öncül cisimciklerinin (NPB) sayısı, büyüklüğü ve dağılımı, kutup cisimciklerinin yerleşimi ve sitoplazmik halonunu varlığı dikkate alınarak yapıldı (PN oluşumu sırasında meydana gelen hatalar ya da asenkronizasyonun, embriyonun kromozal yapısı ve anoplidi ile ilişkili olduğu bilinmektedir)(Şekil 3.8).

Pronükleus değerlendirmesi şu şekilde yapıldı (Şekil 3.9)

- A: Nükleolus öncü cisimcikleri iri, kesişim noktasında ve sıralı
- B: Nükleolus öncü cisimcikleri küçük, kesişim noktasında ve sıralı
- C: Nükleolus öncü cisimcikleri iri ve dağınık
- D: Nükleolus öncü cisimcikleri küçük ve dağınık
- E: Nükleolus öncü cisimcikleri irili ufaklı, kesişim noktasında
- F: Nükleolus öncü cisimcikleri irili, ufaklı ve dağınık
- G: Pronükleuslar birbirinden ayrı veya boyutları farklı
- J: Erken singami (erken birleşme)





Şekil:3.8:A skor pronükleus yapısı ve 2 polar cisim gözlenen normal döllenmiş yumurta

Şekil 3.9: Pronukleus değerlendirilmesi

(<http://www.tupbebek-genetik.com>

[icerik/laboratuvar/embriyoloji/](http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/))

A, B, C, D, E, F normal döllenmiş zigot olarak kabul edilir ve embriyo gelişiminde fark gözlenmez. G, J olarak sınıflanan zigotlarda normal döllenmiş zigot olarak kabul edilir fakat diğerlerinden ayrı olarak takip edilir.

Bölünme Evresi Sınıflaması

Döllenmiş bir yumurta yaklaşık 20 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak 2 hücreli bir embriyo oluşturmaktadır. Bu dönemden itibaren embriyoların değerlendirilmesi

Blastomerlerin şekli ve boyutu ,

Blastomerler arası fragmantasyon derecesi ,

Blastomerlerdeki nükleus sayısı(mültinükleasyon)

Sitoplazmik görünüm ve

Erken kompaktlaşma gibi parametreler dikkate alınarak yapılır.

Bölünme hızına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen limitleri arasında ise normal gelişen bir embriyo, eğer bu sayı düşükse yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirilir. Normal bölünme hızına sahip bir embriyo 22-25. saatte 2 hücre, 2.günde (42-44 saat) 3-4 hücre, 3.günde (66-68 saatte) 6-8 hücre ve 4.günde ise birleşme işaretlerine bağlı olarak 10 ve üzerinde hücreye sahip olan embriyodur. Kalite değerlendirmesine göre ise eşit büyüklükte blastomer yapısına sahip olan, % 0-5 arasında fragmantasyon içeren ve sitoplazmasında belirgin granüler yapı gözlenmeyen embriyolar "I.kalite" olarak değerlendirilir (Şekil 3.10). Bu değerlendirmeye göre kalite sıralaması şu şekilde olmaktadır;

1. Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %0-5 oranında fragmantasyon içeren ve Kalite granülasyon işaretleri göstermeyen embriyo.
2. Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %5-10 oranında fragmantasyon içeren veya Kalite granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
3. Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmantasyona sahip veya kalite granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
4. Blastomer sayısı net sayılamayan, %30 dan fazla fragmantasyona sahip, blastomerler Kalite birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

Embriyo kalitesinin düşüşüyle birlikte embriyonun ileri gelişim gösterme, canlılığını devam ettirme ve implantasyon potansiyelide azalmaktadır.



Şekil 3,10: 44. saat 4 hücreli embriyo



72. saat 8 hücreli ve birleşme yok



72. saat 8 hücreli ve birleşme başlamış

<http://www.tupbebek-genetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>

3.5b. İleri Dönem Embriyo Gelişimi

Fertilizasyondan sonraki 4. günde gelişen embriyodaki hücre sayısı inseminasyonu takiben yaklaşık 96 saat sonra 16–20 hücre arasındadır. Kompaktlaşma hücrelerin daha yakın bir şekilde yapışmasına neden olan bir seri hücreler arası sıkı bağlantıların (dezmozom, gap junction) oluşması sonucu meydana gelir. Embriyo kompaktlaşmaya başladığı zaman morula adını alır. Moruladan sonra kavitasyon dönemi başlar. Kavitasyonun oluşması ile kaviteden salgılanan sıvı, blastosöl oluşumunu tetikler. Kavitasyon ilerledikçe kompaktlaşma sırasında hücrelerin (blastomerlerin) kutuplaşmasıyla iki farklı hücre grubunu (trofoektoderm-dış hücre kütle ve iç hücre kütle) oluşturacaktır (Şekil 3.11).

4.gün embriyolarının kalite değerlendirmesi şu şekilde yapılmaktadır;

1. Kalite Early blastosist,kavitasyon ve full morula ve herhangi bir anomali (fragmantasyon, vakuolizasyon gibi) içermeyen embriyo
2. Kalite Morula veya compact embriyo morfolojisine sahip en az bir anomalinin eşlik ettiği embriyo
3. Kalite Morula veya compact embriyo morfolojisine sahip 2 veya 3 anomalinin eşlik ettiği veya 10 hücre ve üzeri blastomer sayısına sahip birleşmeye başlamış embriyo.
4. Kalite Blastomer sayısı 10 veya daha az sayıda olan herhangi bir birleşme bulgusu gözlenmeyen embriyo



Şekil 3.11: 4. gün 10 hücreli birleşme başlangıcı gözlenen 3. kalite embriyolar

96. saat 4.gün morula aşamasındaki 2. kalite embriyo

96. saat 4. günde kavitasyon izlenen 1. kalite embriyo

Blastosist oluşumu inseminasyondan sonra 5. ve 6. günlerde gerçekleşir. Embriyoları blastosist dönemine kadar takip etmenin önemli avantajlarından birisi de yavaş gelişen veya gelişimi duraksamış embriyoların ayırt edilebilmesidir. Blastosist gelişiminin gözlenmesi ve blastosist transferinin yapılması, embriyonun rahim içine tutunmasını ve dolayısı ile asıl hedef olan gebelik şansının artmasını sağlar (Şekil 3.12).

3.5c. Blastosist Dönemi Sınıflandırması

Blastosist aşamasında farklılaşmış iki hücre grubundan oluşan embriyo kalitesi hakkında net bilgiler mevcuttur. Bu iki farklı hücre grubundan en önemlisi iç hücre kitlesi

(embriyoblast) olarak tanımlanan ve gebelik esnasında embriyoyu oluşturmakla görevli olan hücre kitlesidir. Diğeri ise dış hücre kitlesi (trofoblast) olarak tanımlanan ve gebelik esnasında gebelik kesesi ve bebeğin beslenmesi için gerekli kısımları oluşturan hücre kitlesidir. Blastosist skorlama sisteminde her bir embriyoya aşağıdaki kriterlere göre 3 ayrı skor verilir;

Blastosist gelişim seviyesi (kavitasyonun başlangıcından tomurcuklanmaya kadar)

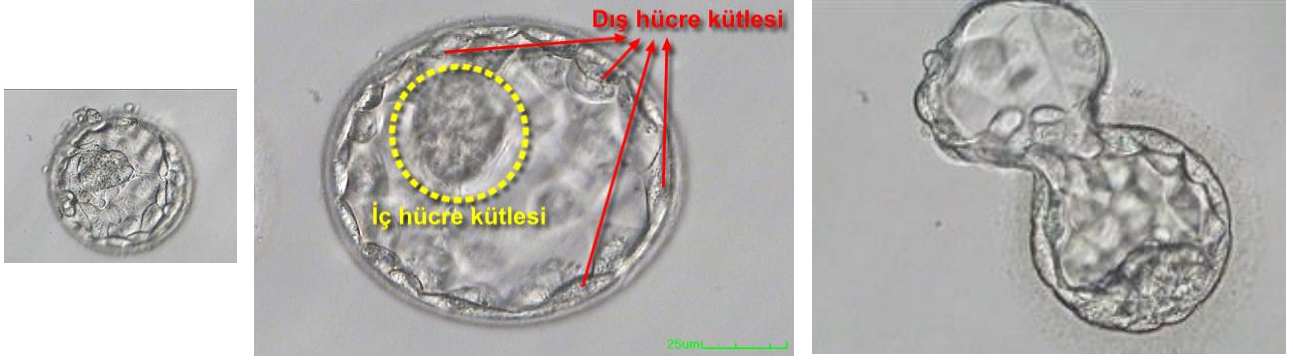
İç hücre kütlesi kalitesi

Dış hücre kütlesi kalitesi

Skor	Blastosist gelişim seviyesi
1	Kavitasyonun başlaması, blastosöl hacminin embriyo hacminin yarısından az olması
2	Blastosöl hacminin embriyo hacminin yarısından fazla olması
3	Blastosöl hacminin embriyo hacminin tamamını kaplaması
4	Blastosöl hacminin embriyo hacminden büyük olması, dış çeperin incilmesi
5	Dış çeperin kırılarak tomurcuklanmanın başlaması
6	Embriyonun dış çeperden tamamen ayrılması, tomurcuklanmanın tamamlanması

Skor	Dış hücre kitlesi kalitesi
A	Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitel yapı
B	Daha gevşek bağlı birkaç hücreden oluşan epitel yapı
C	Çok az ve büyük hücrelerden oluşan epitel yapı

Skor	İç hücre kitlesi kalitesi
A	Sıkı paket halinde çok hücre içermesi
B	Gevşek ama birçok hücre içermesi
C	Çok az sayıda hücre içermesi



5. gün
4AA kalite
embriyo

5.gün
5AA kalite
embriyo

Şekil 3.12: 5.gün Embriyosu

(<http://www.tupbebekgenetik.com/icerik/laboratuvar/embriyoloji/>)

3.6. İmmünohistokimya:

Fiksasyon işleminde endometriyal kültür petriplerindeki coverslip kaldırıldı. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandıktan sonra -20 °C' de soğuk metanol damlatılıp -20'de 10 dk bekletildi. Kurumaya bırakıldı. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanıp, Block serum eklendi, oda ısısında 30 dk. bekletildi. Sürenin sonunda PBS ile yıkanıp primer antikor eklendi ve 2 saat bekletildi. Sekonder antikor eklenip oda ısısında 30 dk. bekletildi. Daha sonra PBS ile yıkanıp kurutuldu. Floresan mikroskopta inceleme için 4-6-Diamino-2-phenyl indole ile boyandı ve mounting medium ile kapatma işlemi gerçekleştirildi. Endometriyal kökültürler 1., 2., 3., 4. günlerde floresan mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.7.İstatistiksel Çalışmalar:

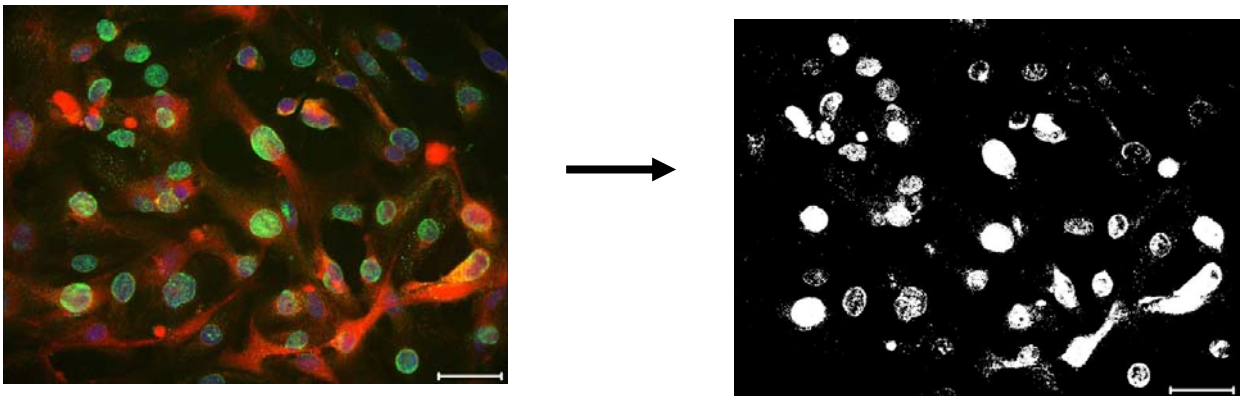
Çalışmamızda sayısal verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Scineces) 13.0 for Windows paket programı kullanıldı. Birlikte değişimleri görmek

için korelasyon analizi yapıldı. İki ortalama arasındaki farkı değerlendirmek için Mann Whitney-U testi kullanıldı (gebe kalanlar ile gebe kalamayanlar).

Bağımlı iki grubun ortalamasını karşılaştırmak için Wilcoxon testi uygulandı. Bu sayısal veriler $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. İki'den fazla bağımlı grubun ortalamalarını karşılaştırmak için Friedman testi kullanıldı ($p < 0.01$).

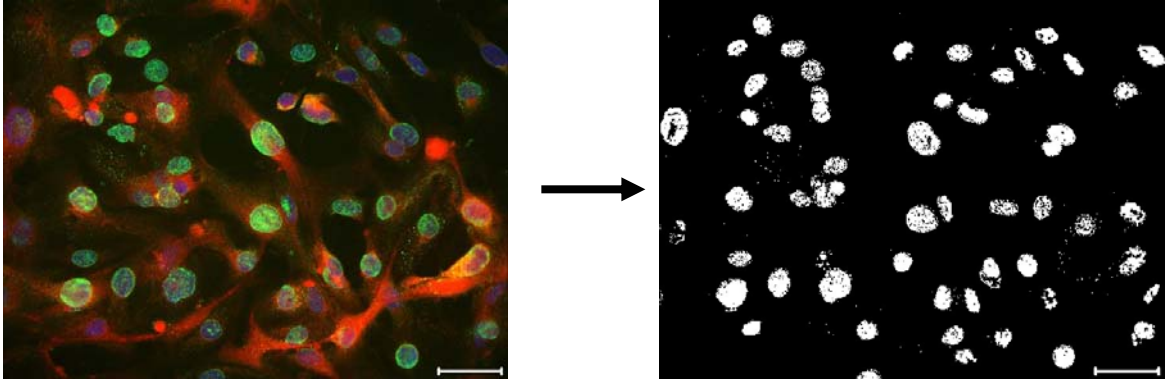
Fotoğraftaki hücrelerin sayımı

Gruplara göre çekilmiş olan fotoğraflar üzerinde göz sayımının yanısıra Fero Lab (Fred Hutchinson Cancer Research Center; Seattle, WA, ABD) tarafından önerilen hücre sayım protokolü temel alınarak NIH (National Institutes of Health) tarafından oluşturulan Java™ temelli NIH ImageJ programı (NIH, Maryland, ABD) analiz ve sayısallaştırma için kullanıldı. Protokol çekilen mikroskopi fotoğraflarına göre çalışma ve sonuç için en optimize şekilde modifiye edildi. Protokolde; mikroskopi fotoğrafları 2176x1632 piksel ve 72 dpi/inç çözünürlükte standardize (normal kalitede) JPEG fotoğrafları kullanıldı, sabit odak uzaklığı üzerinde eş çözünürlük kullanılması, belirli bölgede aynı miktarda alanın fotoğraflanmasını sağlamıştır. Aynı hastaya ait hücre fotoğraflamasında kesinliği arttırmak için birbirine eş alanlar ve odak uzunluğunda çekilmiş olan fotoğraflar ortalama alınacak biçimde dahil edildi. Normal çalışma prosedüründe ImageJ üzerinde threshold (keskinleştirme) uygulanmış ve her üç renk (RGB – Kırmızı/Yeşil/Mavi) katmanının ayrılarak keskinleştirme yapılması ve sayılması, karışık boyanmanın olduğu ya da boyanmanın üstüste bindiği durumlarda kullanıldı (Şekil 3.13).



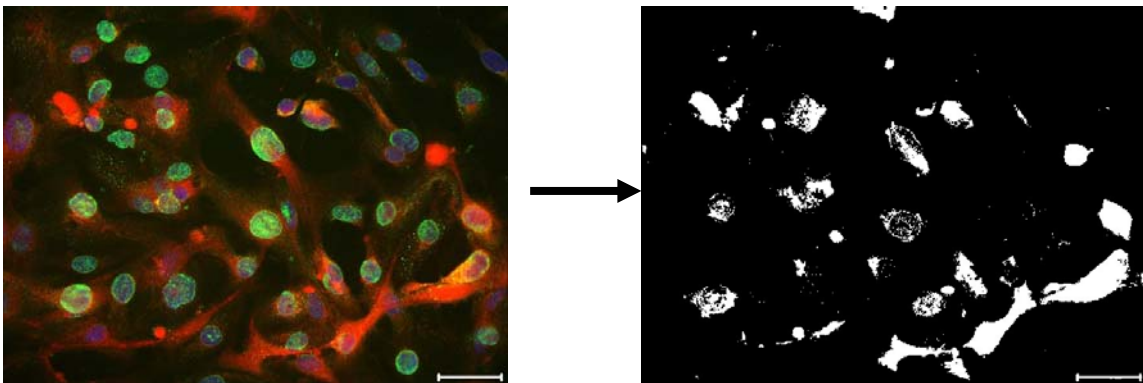
Şekil 3.13 : Orijinal imaj (sol); threshold uygulanmış çok kanallı imaj (sağ; karışık, sayım yapılmayan)

ImageJ programına ie aktararak alınan imajlar (fotoğraflar), doğrudan renkli olarak işleme alınmadı. Tek renk boyama olan fotoğraflar için iki aynı sonucu veren yol izlendi. Birinci yolda imaj ImageJ, Image menüsünden Adjust > Threshold uygulanarak siyah-beyaz keskin hale getirildi, ikinci yolda ise Process menüsünden Binary > Make Binary komutu verilerek imajlar işlenmeye ve sayısallaştırılmaya hazır hale getirildi (Şekil 3.14).



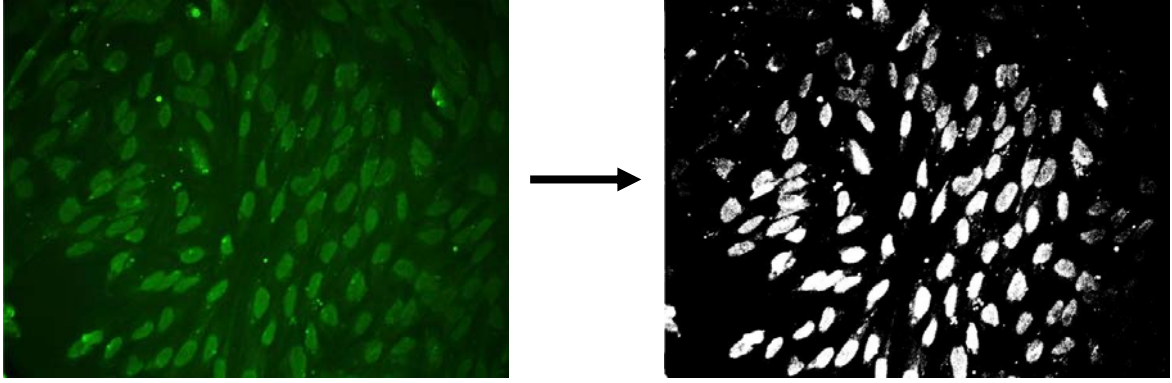
Şekil 3.14: Orijinal imaj (sol), threshold uygulanmış çok kanallı imaj (sağ; yeşil-mavi iki kanal)

Karışık boyama olan imajların işlenmesinde ise bu iki yola başvurmadan önce bir diğer işlem olarak renk kanallarına ayırma işlemi gerçekleştirildi. Bunun için yine Image menüsünden Color > Split Channels uygulandı ve R/G/B (Kırmızı {255}, Yeşil {255}, Mavi {255}) olmak üzere ayrıştırıldı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 : Orijinal imaj (sol), threshold uygulanmış tek kanallı imaj (sağ, kırmızı)

Ayrıştırılan renk kanallarından boyamanın tipine göre kırmızı olan CD26 için, mavi ve yeşil olanlar kullanılan floresan tipine göre Trophinin için seçilmiş ve başta ifade edilen iki yoldan bir tanesi uygulanarak işlenmeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 : Orijinal imaj (sol), threshold uygulanmış tek renkli imaj (sağ)

İşlenmeye hazır hale getirilen imajlar sıralı çoklu işlem ile sayıma alındı. ImageJ programının sıralı çoklu işlem yapma özelliğinden yararlanılarak CD26, Trophinin ve karma imajlar sıra ile işlendi. Çoklu işleme geçmeden önce örnek imajlar üzerinde göz sayımına karşı olarak program değerleri karşılaştırıldı. Uygun olmayan ve renk kanallarına ayrılması gereken imajlar dışındakiler otomatik olarak işlendi.

İşlenmeyi takiben, hücre sayımının yapılması ve sayısal veri elde edilmesi işlemine geçildi. Analyze menüsünden Analyze Particles komutu verildi (Size: 20-sonsuz ve Circularity 0,50 – 1.00 px² olmak üzere; değerler sonuç ve özet tablolarına yazdırılmış, Excel'e çıktı verilerek veri tabloları oluşturuldu.

Veri tablolarında baz alınan dosya değeri (data type: string) olmak üzere hasta adı, hücre tipi ve grup bilgisini içeren dosya adıdır. Diğer değerlerin tamamı sayısal veri şeklinde işleme alındı. Değerler bu dosya adlarına göre yazılıp, SPSS 13.0 (IBM, NY, ABD) programında analizleri yapıldı. ImageJ for microscopy, Tony J. Collins, BioTechniques 43:S25-S30 (July 2007)

4. BULGULAR

Çalışmamıza yaşları 26-36 arasında değişen 13 hasta katıldı. İki hasta teknik nedenlerle çalışma dışı bırakıldı. Geriye kalan 11 hastanın yaşları, bazal hormon değerleri, endometriyal ko-kültürleri ve embriyoların gelişme ve implantasyon oranlarına ait verileri değerlendirdik.

Çalışmaya katılan kadın hastaların yaş ortalaması; gebe kalanlarda 28 ± 3.54 bulunurken, gebe kalamayanlarda 32.67 ± 2.81 olarak bulunmuştur. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.035$) bir farklılık olduğu görüldü (Çizelge 4.1).

Çalışmaya katılan gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların bazal hormon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

FSH seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 7.26 ± 2.54 iken, gebe kalamayan kadınlarda 6.33 ± 1.15 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların FSH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.583$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

LH seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 4.71 ± 0.34 iken, gebe kalamayan kadınlarda 4.52 ± 1.16 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların LH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.783$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

E2 seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 36.62 ± 5.60 iken, gebe kalamayan kadınlarda 46.78 ± 16.44 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların E2 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.465$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

TSH seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 1.42 ± 0.75 iken, gebe kalamayan kadınlarda 2.53 ± 1.33 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların TSH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.054$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

ST3 seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 3.61 ± 0.25 iken, gebe kalamayan kadınlarda 3.38 ± 0.21 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların ST3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.198$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

ST4 seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 1.37 ± 0.15 iken, gebe kalamayan kadınlarda 1.33 ± 0.29 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların ST4 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.279$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

PRL seviyeleri ortalaması; gebe kalan kadınlarda 18.88 ± 13.55 iken, gebe kalamayan kadınlarda biraz daha yüksek olup 23.18 ± 5.19 olarak saptanmıştır. Gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların PRL seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p=0.273$) bulunmadı (Çizelge 4.1).

11 hasatadan alınan endometriyal biyopsilere uygulanan ko-kültür tekniğinden yararlanılarak embriyoların ko-kültür ortamlarında ve konvansiyonel kültür ortamlarında gelişmeleri 1.günden 4.güne kadar izlendi.

1. günden 4.güne kadar, embriyoların endometriyal ko-kültür ortamında trophinin ve CD26 ekspresyonları floresan mikroskopta incelendi.

Hastalar embriyoların gelişme durumuna göre üç grupta ayrıldı:

1. Embriyosu gelişmeyen grup ve gebe kalamayan grup,
2. Embriyosu geliştiği halde implantasyonu gerçekleşmeyen ve gebe kalamayan grup,
3. Embriyosu gelişen ve implantasyonu gerçekleşen gebe kalan grup.

Embriyosu gelişmeyen grupta iki hasta; embriyosu gelişip, implantasyonu gerçekleşmeyen grupta yedi hasta; embriyosu gelişen ve implantasyonu gerçekleşen grupta; beş hasta mevcuttu. Kontrolleriyle beraber tüm gruplara ait ko-kültürlerde embriyo gelişiminin 1. Gününden 4. gününe kadar Trofinin ve CD 26 immünoreaktif boyanan endometriyal hücreler görüldü (Şekil 1-15).

Gebe kalan ve gebe kalamayan hastalar arasında, elde edilen embriyoların 1.günden 4. güne kadar olan erken gelişme döneminde, ko-kültür ortamında trophinin ve CD26 ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık ($p=0.046$), 1.gündeki trophinin (+) hücre sayısında bulundu (Çizelge 4.1; Şekil 6,12).

Gebe kalanlarda 1.gün CD26 (+) endometriyal hücre sayısının gebe kalamayanlara göre daha fazla olduğu; buna karşı trophinin (+) boyanmış hücrelerin daha az olduğu görüldü (Çizelge 4.1 ; Şekil 6,12)

Gebe kalamayanlarda 1.gün trophinin (+) endometriyal hücre sayısı 11.00 ± 4.30 iken, gebe kalanlarda 5.00 ± 1.63 olup bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Çizelge 4.1)

2.günden 4.güne kadar incelenen endometriyal ko-kültür ortamlarının trophinin ve CD26 (+) hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Çizelge 4.1).

Trophinin (+) hücre sayısı, kontrol trophinin grubunda (embriyosuz endometriyal ko-kültür ortamında) 17.25 ± 19.76 iken, gebe kalan hasta grubunda embriyo varlığında bu sayı düşmektedir. Oysa gebe kalamayan hasta grubunda, gebe kalanlara göre bu ortalama değerlerin 1.gün trophinin (+) boyanma dışında istatistiki olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek olduğu görüldü (Çizelge 4.1 Şekil 1,4,6,11,12).

Gebe kalan ve gebe kalamayan hastalara ait endometriyal ko-kültür ortamlarında CD26 (+) boyanan hücre sayılarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla beraber, embriyo varlığında CD26 (+) hücre sayısı 1. ve 2.günlerde gebe kalan grupta hafifçe yükselmiş ve 3. ve 4.günlerde ise hafifçe azalmıştı. Gebe kalan grubun kontrol CD26 (+) hücre sayısı da, gebe kalamayan gruptan daha yüksek bulundu (Çizelge 4.1; Şekil 1,4,11).

Kontrol CD26 ile kontrol trofinin parametreleri arasında kuvvetli bir negatif korelasyon görüldü ($r = -0.836$, $p = 0.005$) (Çizelge 4.2).

Gebe kalan grupta, kontrol trofinin (+) hücre sayısı gebe kalamayan gruptan düşüktü. Kontrol CD26 (+) hücre sayısı ise gebe kalan grupta, gebe kalamayan gruptan yüksekti. Yani gebe kalan grupta kontrol trofinin (+) hücre sayısı, kontrol CD26 (+) hücre sayısından düşükken gebe kalamayan grupta kontrol trofinin (+) hücre sayısı, kontrol CD26 (+) hücre sayısından yüksekti (Çizelge 4.1).

Hasta yaşı ile 3.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü ($r = 0.678$, $p = 0.045$) (Çizelge 4.2).

Genellikle gebe kalanlarda CD26 (+) hücre sayısı, gebe kalamayan gruba göre daha yüksekti. Sadece 3.gün CD26 (+) hücre sayısı düşüktü (Çizelge 4.1).

Tüm gruplara ait hastaların embriyolarının gelişimi 1. günden 4. Güne kadar izlendi (Şekil 16-21)

Bazal hormon değerlerinden LH ile 4.gün trofinin parametreleri arasında negatif bir korelasyon görüldü ($r = -0.701$, $p = 0.035$) (Çizelge 4.2). Yani 4.gün gebe kalanlarda ortalama LH değeri 4.71 ± 0.34 iken, ortalama trofinin (+) hücre sayısı 9.25 ± 11.33 'e yükseldi. Gebe kalan ve gebe kalamayan gruplar arasında ortalama LH düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Bazal hormon değerlerinden E2 ile 2.gün trofinin parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü ($r = 0.698$, $p = 0.037$) (Çizelge 4.2). Gebe kalan ve gebe kalamayan

gruplar arasında ortalama E2 düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamakla beraber, gebe kalan grupta E2 ve trofinin (+) hücre sayıları gebe kalamayan gruptan daha düşük olduğu görüldü.

Bazal hormon değerlerinden ST3 ile 1.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü ($r = -0.814$, $p=0.014$) (Çizelge 4.2). Ortalama ST3 değeri ve CD26 (+) hücre sayısı; gebe kalan grupta gebe kalamayan gruba göre yüksekti.

1.gün CD26 ile 2.gün CD26 parametreleri arasında kuvvetli bir pozitif korelasyon bulundu ($r=0.817$, $p=0.007$) (Çizelge 4.2). 1.gün ve 2.gün ortalama CD26 (+) hücre sayısı; gebe kalan ve gebe kalamayan gruplarda korelasyon gösteriyordu.

1.gün CD26 ile 4.gün trofinin parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü ($r=0.763$, $p=0.017$) (Çizelge 4.2). Yani embriyo varlığında en yüksek ortalama CD26 (+) hücre sayısı ile en yüksek trofinin değerleri 4.gündeydi.

2.gün CD26 ile 4.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü ($r=0.700$, $p=0.036$) (Çizelge 4.2). 2.gün ve 4.günlerde CD26 (+) hücre sayıları arasında korelasyon izlendi.

3.gün trofinin ile kontrol CD26 parametreleri arasında negatif bir korelasyon görüldü ($r = -0.679$, $p=0.044$) (Çizelge 4.2). Embriyo varlığında 3.gün trofinin (+) hücre sayısı azalırken, kontrol CD26 (+) hücre sayısı artıyordu.

Kontrol trofinin grubu ile 1. gün trofinin grubu arasında ortalama trofinin (+) immunreaktif hücre sayıları arasında Wilcoxon testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p= 0.036$).

Kontrol trofinin grubu ile 2. gün trofinin grubu arasında ortalama trofinin (+) immunreaktif hücre sayıları arasında Wilcoxon testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p= 0.021$; Şekil 1,2,4,7,11,13).

Yani 1. ve 2.günlerde (embriyo varlığında) trofinin (+) hücre sayısı, kontrol trofinin (embriyosuz ortamada) grubuna göre daha düşüktü (Şekil 1,2,4,7,11,13).

İkiden fazla bağımlı grubun ortalamalarını karşılaştırmak için kullandığımız Firedman analiz ile anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Çizelge 4.1: Gebe kalan ve gebe kalamayan hastaların yaşlarını, bazal hormon değerlerini, embriyoların 1.-2.-3.-4.günlerde ko-kültürde trophinin ve CD26 (+) hücre sayılarını karşılaştıran istatistik sonuçları görülüyor ($p \leq 0.05$).

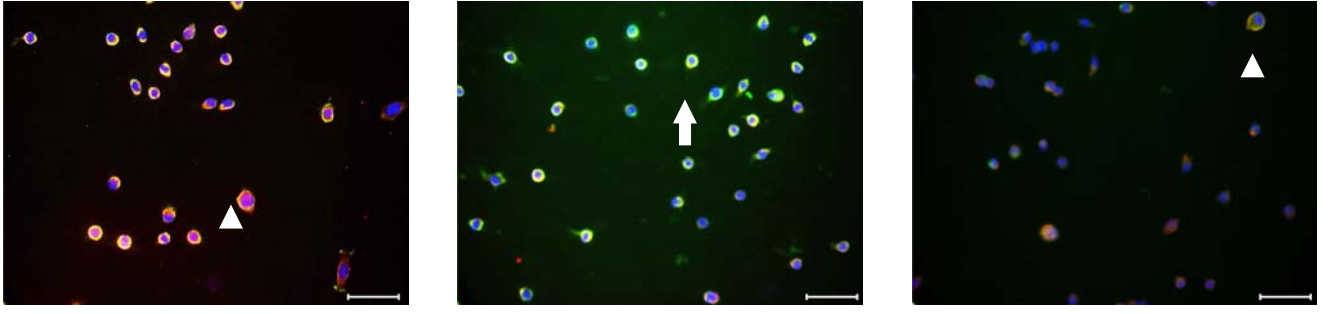
	Gebe kalanlar (N= 5)	Gebe kalamayanlar (N= 6)	p değeri
FSH	7,26 ± 2,54	6,33 ± 1,15	0,583
LH	4,71± 0,34	4,52 ± 1,16	0,783
E2	36,62 ± 5,60	46,78 ± 16,44	0,465
TSH	1,42 ± 0,75	2,53 ± 1,33	0,054
ST3	3,61 ± 0,25	3,38 ± 0,21	0,198
ST4	1,37 ± 0,15	1,33 ± 0,29	0,279
PRL	18,88 ± 13,55	23,18 ± 5,19	0,273
1.gün trophinin	5,00 ± 1,63	11,00 ± 4,30	0,046
1.gün CD 26	32,00 ± 25,86	17,60 ± 5,32	0,624
2.gün trophinin	5,00 ± 2,16	9,20 ± 7,43	0,537
2.gün CD 26	25,25 ± 12,34	20,80 ± 9,15	0,462
3. gün trophinin	3,50 ± 2,38	16,40 ± 11,78	0,138
3.gün CD 26	18,50 ± 17,62	28,00 ± 11,77	0,221
4.gün trophinin	9,25 ± 11,33	10,00 ± 9,46	0,803
4.gün CD 26	27,00 ± 19,20	38,00 ± 34,91	0,806
Kontrol Trophinin	17,25 ± 19,76	25,40 ± 15,82	0,140
Kontrol CD 26	30,75 ± 12,92	22,00 ± 9,77	0,268
Hasta yaşı	28,00 ± 3,54	32,67±2,81	0,035

Çizelge 4.2. Hastaların yaşlarını, bazal hormon değerlerini, embriyoların 1-4. günlerde ve kontrol grubunda ko-kültürde trophinin (+) ve CD26 (+) hücre sayılarını karşılaştıran korelasyon analizine göre istatistik sonuçları görülmüyor. *korelasyon $p < 0.05$ seviyesinde anlamlıdır.

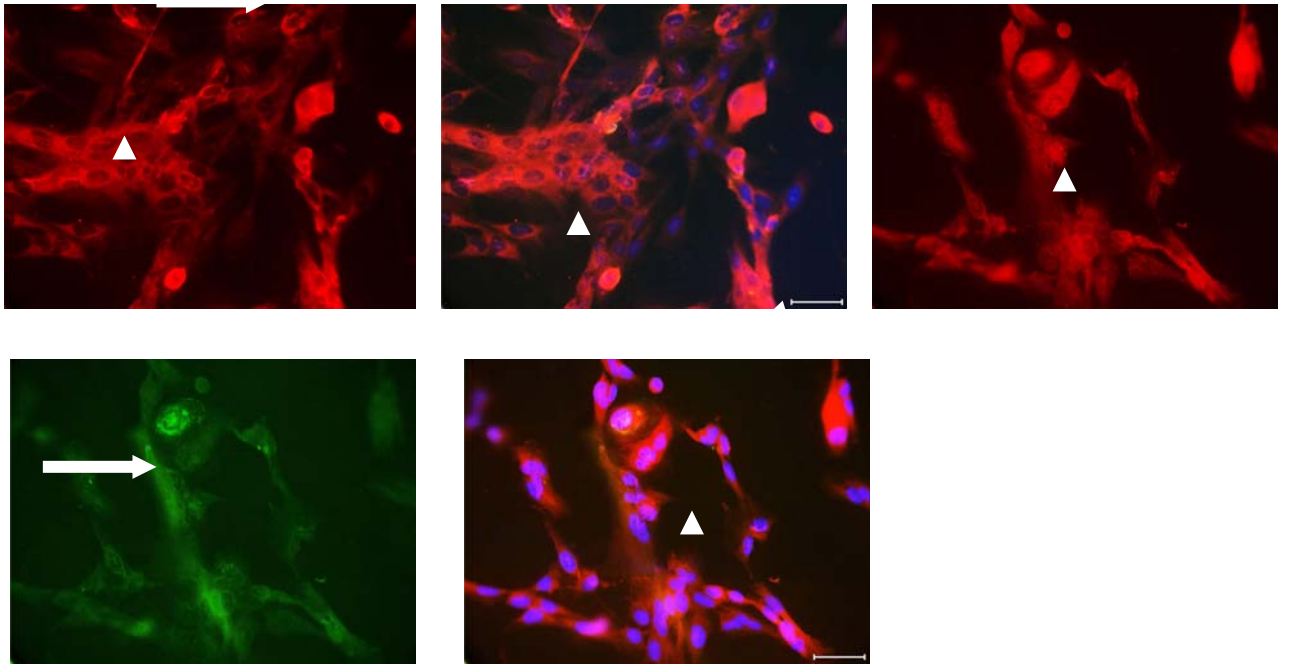
	hastayas	FSH	LH	E2	TSH	ST3	ST4	PRL	1Gtrof	1Gcd26	2Gtrof	2G cd26	3G trof	3Gcd26	4G trof	4G cd26	Kcd26	Ktrof
hastayas	R	1,000	-0,419	-0,029	0,543	-0,019	-0,367	-0,126	0,332	-0,033	-0,236	-0,100	0,181	0,678	0,009	0,377	-0,155	0,197
	P	.	0,154	0,925	0,084	0,952	0,241	0,696	0,383	0,932	0,540	0,797	0,640	*0,045	0,983	0,318	0,690	0,611
	N	13	13	13	11	12	12	12	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
FSH	R	-0,419	1,000	-0,012	0,142	-0,364	0,090	0,252	0,179	-0,067	0,553	0,042	0,139	-0,393	0,085	-0,318	-0,151	0,412
	P	0,154	.	0,968	0,678	0,244	0,780	0,429	0,645	0,864	0,123	0,915	0,721	0,295	0,828	0,404	0,698	0,271
	N	13	13	13	11	12	12	12	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
LH	R	-0,029	-0,012	1,000	-0,407	-0,231	0,415	-0,021	-0,009	-0,513	-0,178	-0,597	-0,483	-0,042	-0,701	-0,420	0,021	0,000
	P	0,925	0,968	.	0,214	0,470	0,180	0,948	0,983	0,158	0,647	0,090	0,188	0,915	*0,035	0,260	0,957	1,000
	N	13	13	13	11	12	12	12	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
E2	R	-0,083	-0,124	1,000	-0,364	0,098	0,198	-0,266	0,051	0,033	0,698	0,167	0,336	0,200	-0,051	0,317	-0,410	0,326
	P	0,788	0,687	0,362	0,270	0,761	0,538	0,404	0,897	0,932	*0,037	0,668	0,376	0,606	0,897	0,406	0,273	0,391
	N	13	13	13	11	12	12	12	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
TSH	R	0,543	0,142	-0,407	1,000	0,062	-0,394	0,091	0,442	-0,060	-0,145	-0,192	0,115	-0,108	0,405	-0,228	0,024	0,404
	P	0,084	0,678	0,214	0,270	0,856	0,230	0,802	0,273	0,888	0,731	0,649	0,786	0,799	0,320	0,588	0,955	0,321
	N	11	11	11	11	11	11	11	10	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ST3	R	-0,019	-0,364	-0,231	0,062	1,000	-0,103	-0,315	-0,282	0,814	-0,030	0,635	-0,079	-0,216	0,528	0,252	0,506	-0,620
	P	0,952	0,244	0,470	0,856	.	0,750	0,345	0,498	*0,014	0,943	0,091	0,853	0,608	0,179	0,548	0,201	0,101
	N	12	12	12	11	12	12	12	11	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ST4	R	-0,367	0,090	0,415	-0,394	-0,103	1,000	-0,253	-0,593	-0,145	0,110	-0,446	-0,463	-0,554	-0,136	-0,241	-0,030	-0,206
	P	0,241	0,780	0,180	0,230	0,750	.	0,452	0,122	0,733	0,796	0,268	0,247	0,154	0,748	0,565	0,943	0,624
	N	12	12	12	11	12	12	12	11	8	8	8	8	8	8	8	8	8
PRL	R	-0,126	0,252	-0,021	0,091	-0,315	-0,253	1,000	0,407	-0,300	0,008	-0,417	0,487	-0,100	-0,017	-0,383	-0,209	0,025
	P	0,696	0,429	0,948	0,802	0,345	0,452	.	0,277	0,433	0,983	0,265	0,183	0,798	0,965	0,308	0,589	0,949
	N	12	12	12	10	11	11	11	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Çizelge 4.2.'nin devamı: Hastaların yaşlarını, bazal hormon değerlerini, embriyoların 1-4. günlerde ve kontrol grubunda ko- kültürde trophinin (+) ve CD26 (+) hücre sayılarını karşılaştıran korelasyon analizine göre istatistik sonuçları görülmüyor. *korelasyon $p < 0.05$ seviyesinde anlamlıdır. **korelasyon $p < 0.01$ seviyesinde anlamlıdır.

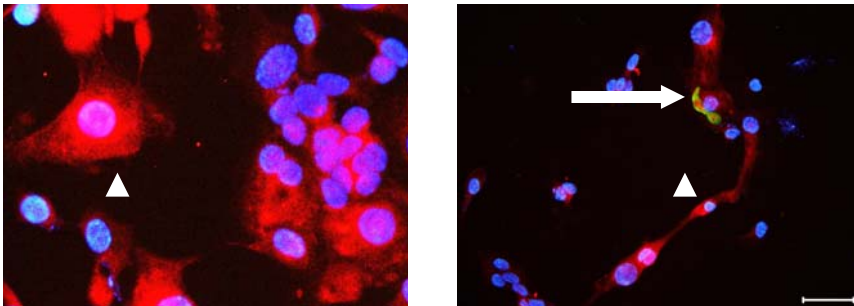
	hastayas	FSH	LH	E2	TSH	ST3	ST4	PRL	1Gtrof	1Gcd26	2Gtrof	2Gcd26	3Gtrof	3Gcd26	4Gtrof	4Gcd26	Kcd26	Ktrof
1G ntrof	R	0,332	0,179	-0,009	0,442	-0,282	-0,593	0,407	1,000	0,254	0,085	0,136	0,231	0,254	0,155	0,034	0,264	-0,009
	P	0,383	0,645	0,983	0,273	0,498	0,122	0,277		0,509	0,827	0,728	0,550	0,509	0,690	0,931	0,493	0,983
	N	9	9	9	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
1G cd26	R	-0,033	-0,067	-0,513	-0,060	0,814	-0,145	-0,300	0,254	1,000	0,345	0,817	0,067	-0,067	0,763	0,617	0,494	-0,477
	P	0,932	0,864	0,158	0,888	*0,014	0,733	0,433	0,509		0,364	**0,007	0,864	0,865	*0,017	0,077	0,177	0,194
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2G trof	R	-0,236	0,553	-0,178	-0,145	-0,030	0,110	0,008	0,085	0,345	1,000	0,294	0,585	-0,101	0,530	0,420	-0,460	0,359
	P	0,540	0,123	0,647	*0,037	0,731	0,796	0,983	0,827	0,364		0,442	0,098	0,796	0,142	0,260	0,213	0,343
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2Gcd26	R	-0,100	0,042	-0,597	-0,192	0,635	-0,446	-0,417	0,136	0,817	0,294	1,000	0,193	0,250	0,559	0,700	0,285	-0,159
	P	0,797	0,915	0,090	0,649	0,091	0,268	0,265	0,728	**0,007	0,442		0,618	0,516	0,117	*0,036	0,458	0,683
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
3Gtrof	R	0,181	0,139	-0,483	0,115	-0,079	-0,463	0,487	0,231	0,067	0,585	0,193	1,000	0,319	0,487	0,387	-0,679	0,549
	P	0,640	0,721	0,188	0,786	0,853	0,247	0,183	0,550	0,864	0,098	0,618		0,402	0,183	0,304	*0,044	0,126
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
3Gcd26	R	0,678	-0,393	-0,042	-0,108	-0,216	-0,554	-0,100	0,254	-0,067	-0,101	0,250	0,319	1,000	-0,203	0,600	-0,318	0,402
	P	*0,045	0,295	0,915	0,799	0,608	0,154	0,798	0,509	0,865	0,796	0,516	0,402		0,600	0,088	0,404	0,284
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4Gtrof	R	0,009	0,085	-0,701	0,405	0,528	-0,136	-0,017	0,155	0,763	0,530	0,559	0,487	-0,203	1,000	0,475	0,034	-0,068
	P	0,983	0,828	*0,035	0,320	0,179	0,748	0,965	0,690	*0,017	0,142	0,117	0,183	0,600		0,197	0,931	0,862
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
4Gcd26	R	0,377	-0,318	-0,420	-0,228	0,252	-0,241	-0,383	0,034	0,617	0,420	0,700	0,387	0,600	0,475	1,000	-0,176	0,092
	P	0,318	0,404	0,260	0,588	0,548	0,565	0,308	0,931	0,077	0,260	*0,036	0,304	0,088	0,197		0,651	0,814
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Kcd26	R	-0,155	-0,151	0,021	0,024	0,506	-0,030	-0,209	0,264	0,494	-0,460	0,285	-0,679	-0,318	0,034	-0,176	1,000	-0,836
	P	0,690	0,698	0,957	0,955	0,201	0,943	0,589	0,493	0,177	0,213	0,458	*0,044	0,404	0,931	0,651		**0,005
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Ktrof	R	0,197	0,412	0,000	0,404	-0,620	-0,206	0,025	-0,009	-0,477	0,359	-0,159	0,549	0,402	-0,068	0,092	-0,836	1,000
	P	0,611	0,271	1,000	0,321	0,101	0,624	0,949	0,983	0,194	0,343	0,683	0,126	0,284	0,862	0,814	**0,005	
	N	9	9	9	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9



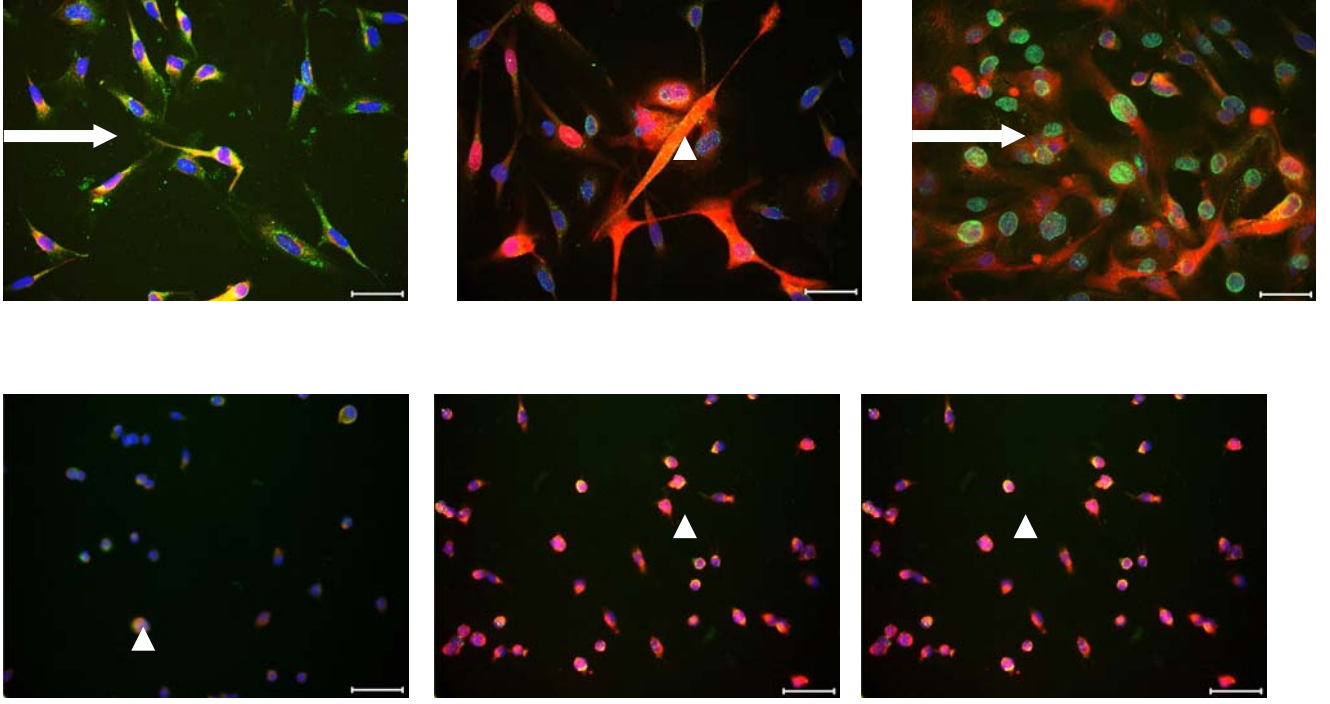
Şekil 4.1: Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun kontrolünde ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



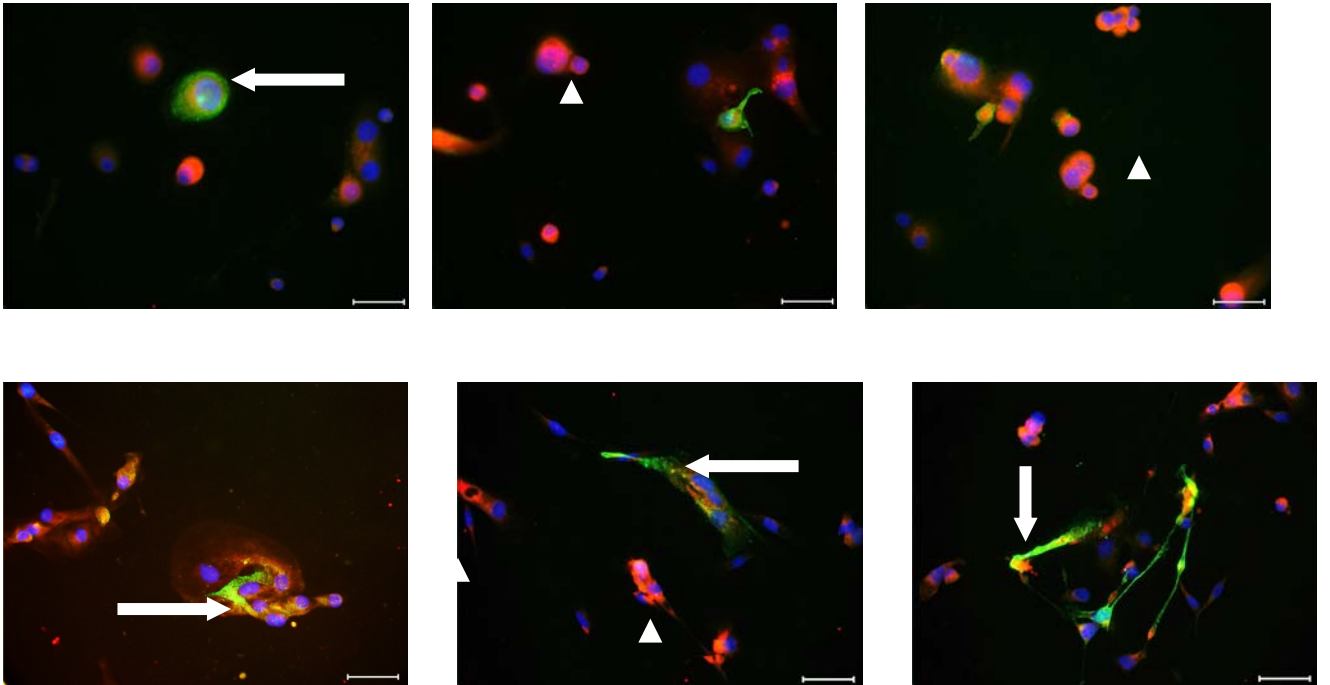
Şekil 4.2: Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun 2. gün ko-kültürde CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



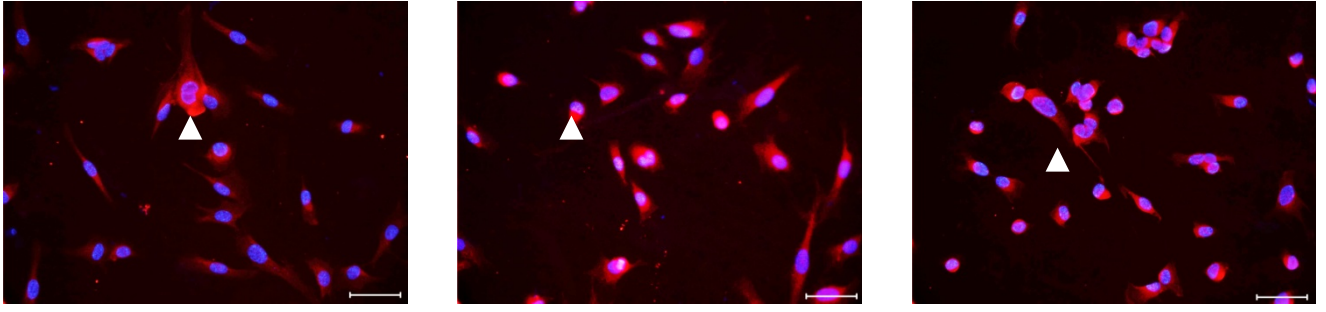
Şekil 4.3: Embriyosu gelişmeyen hasta grubunun ko-kültürde 2.günde solda trofinin (ok) ve 3.günde sağda CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücrele görülüyor.



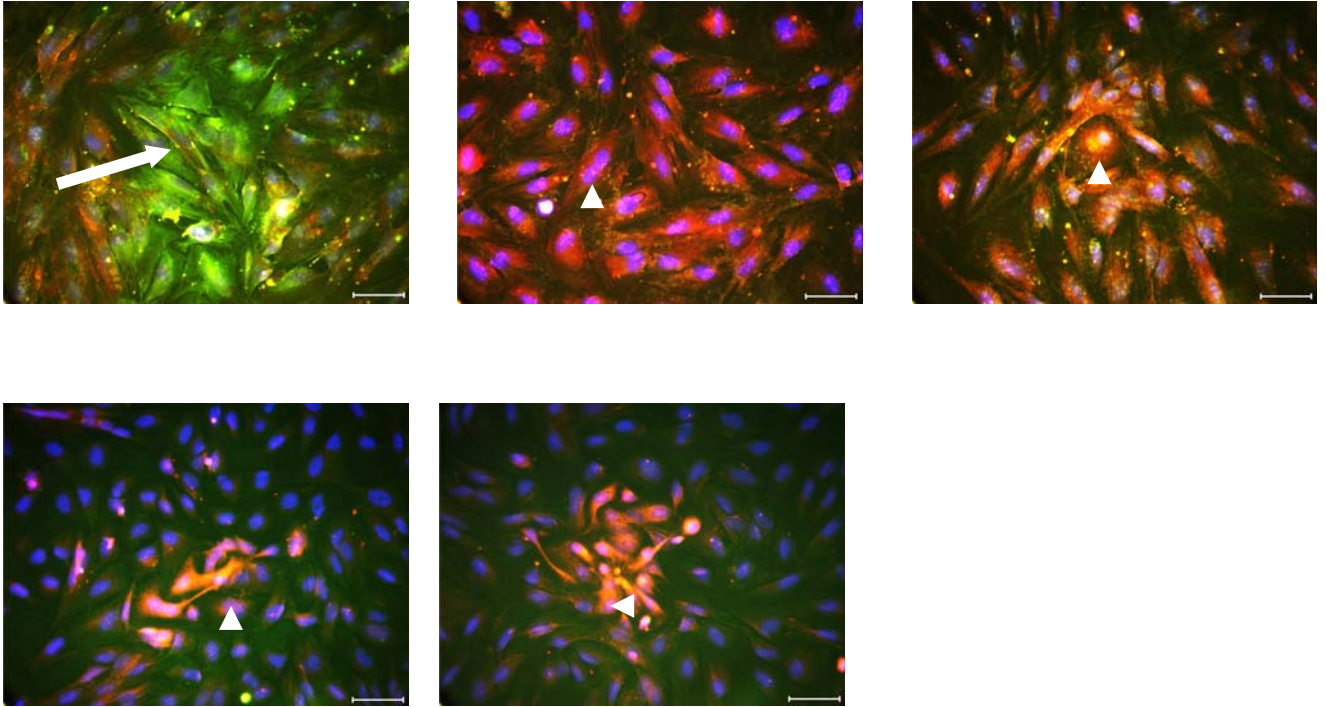
Şekil 4. 4: Embriyosu gelişen implantasyona gitmeyen hasta grubunun kontrolünde ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



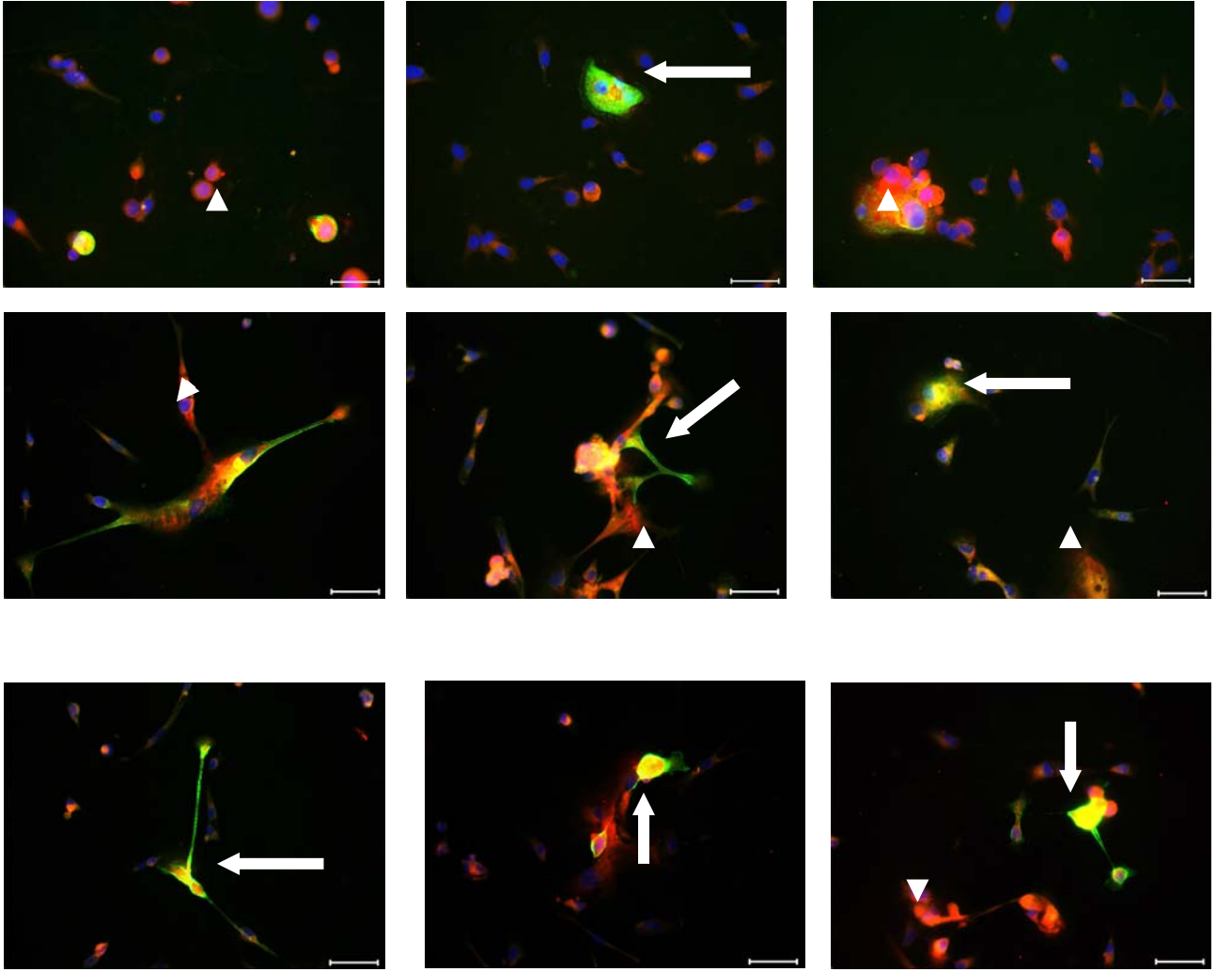
Şekil 4. 5: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta 1.gün ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor



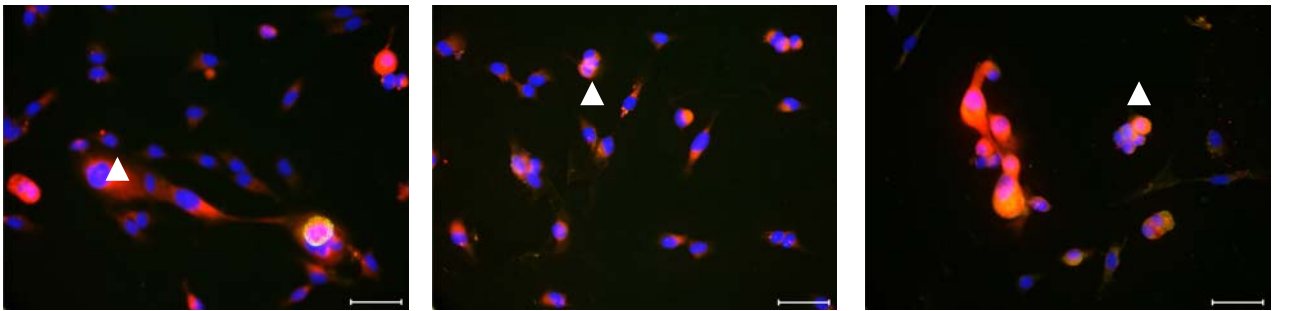
Şekil 4. 5'in devamı: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta soldaki resim 1.gün, sağdaki ve ortadaki resim 2.gün ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



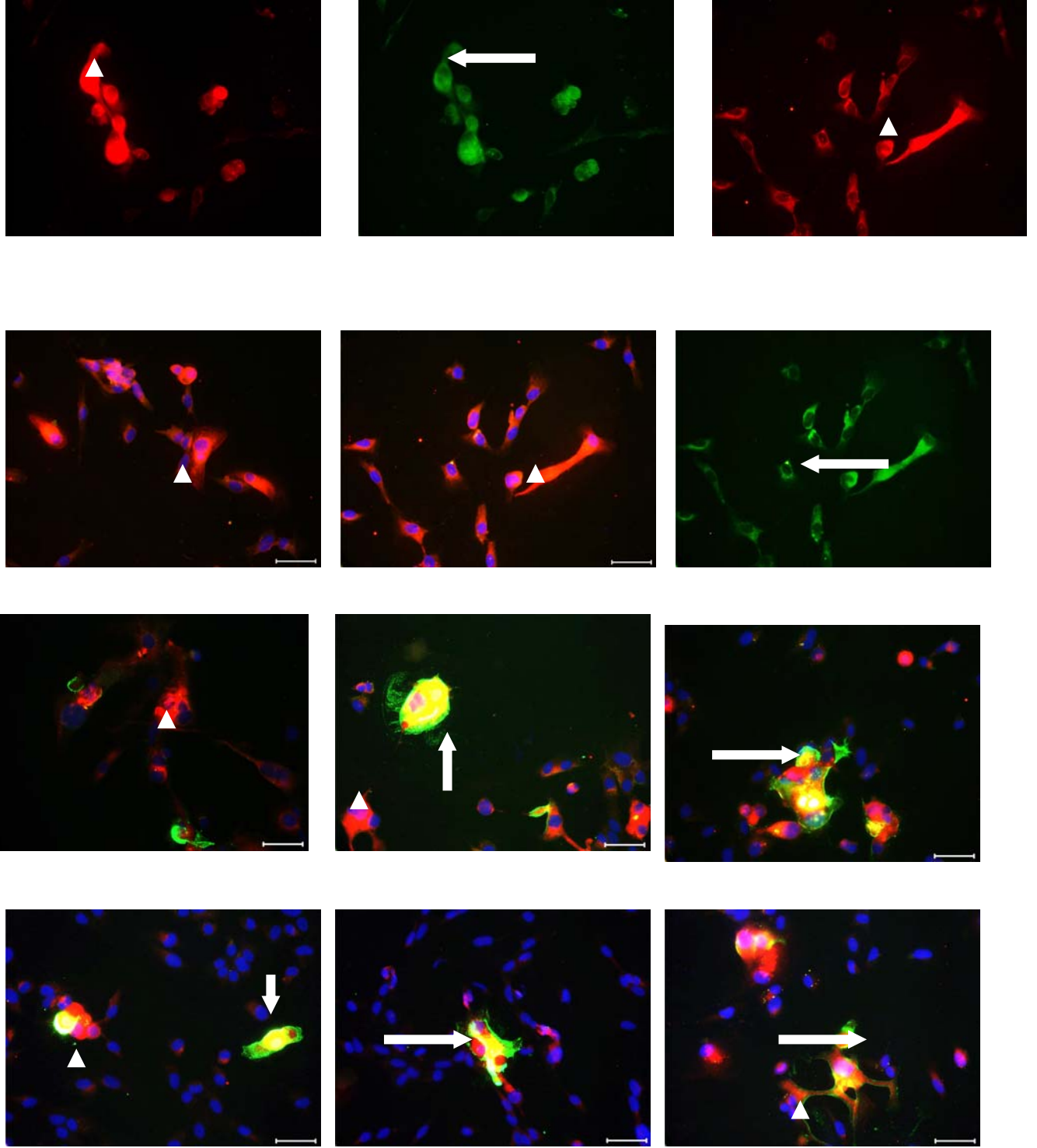
Şekil 4. 6: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta 1.gün ko-kültürde trofinin (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor; embriyonun olduğu bölgede yoğun boyanma dikkati çekiyor (ET yapıldı, implantasyonu gerçekleşmedi).



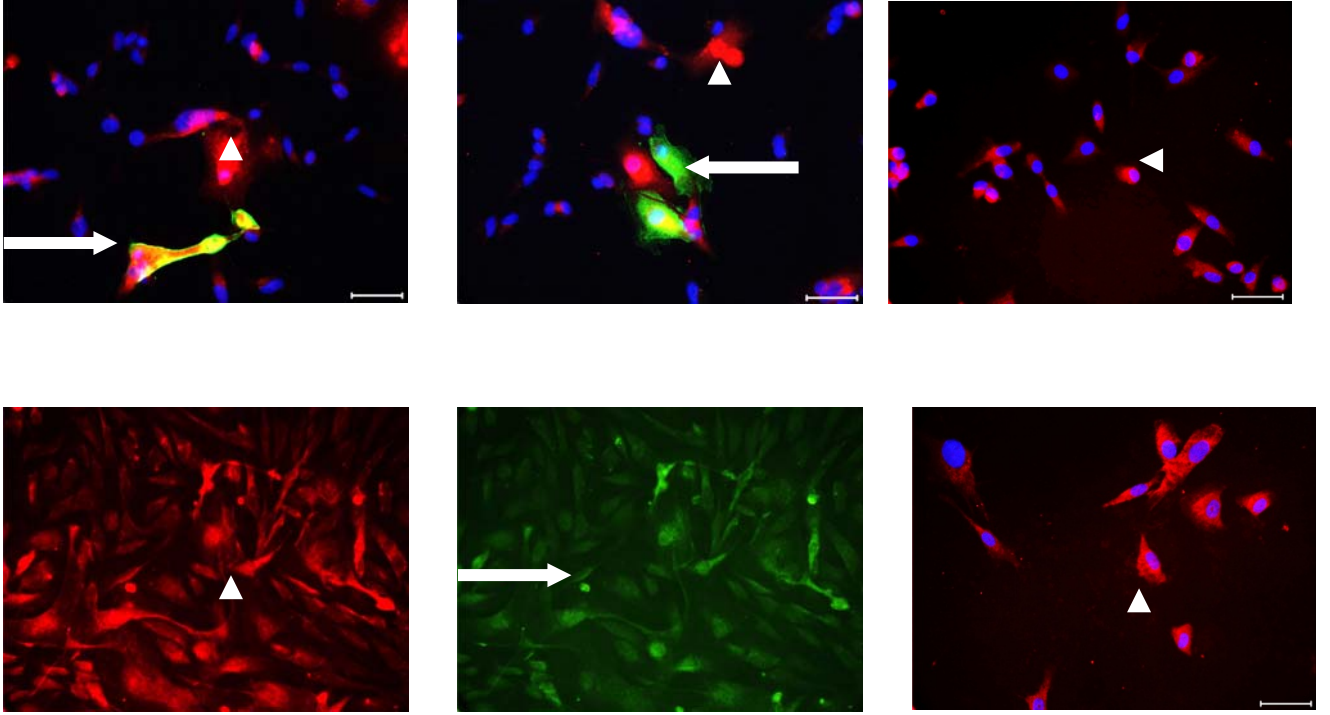
Şekil 4. 7: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta 2.gün ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor



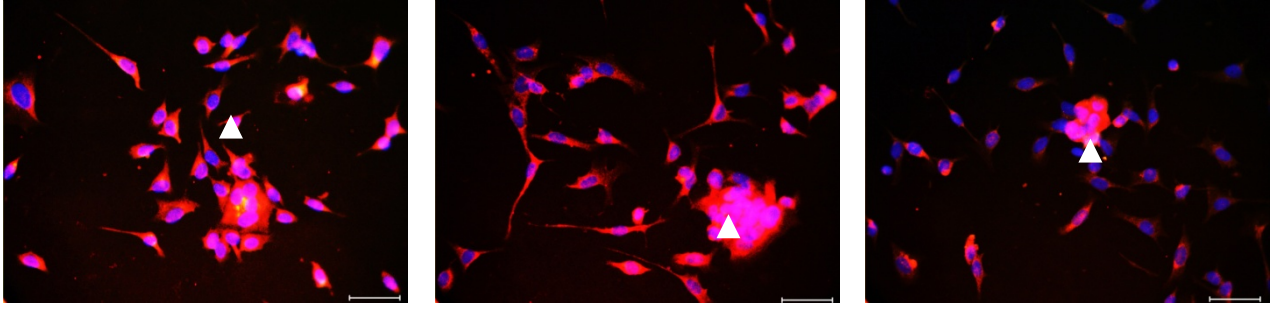
Şekil 4. 8: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta, solda ve ortada 2. gün ve sağda 3.gün ko-kültürde CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



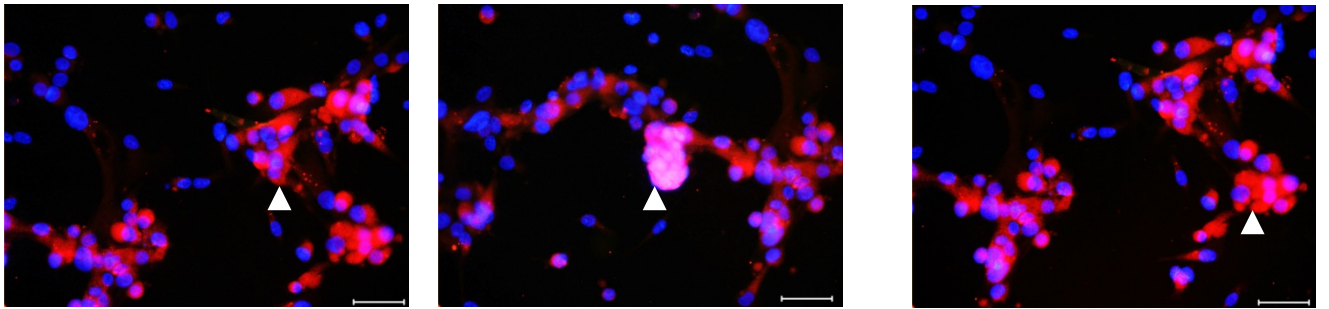
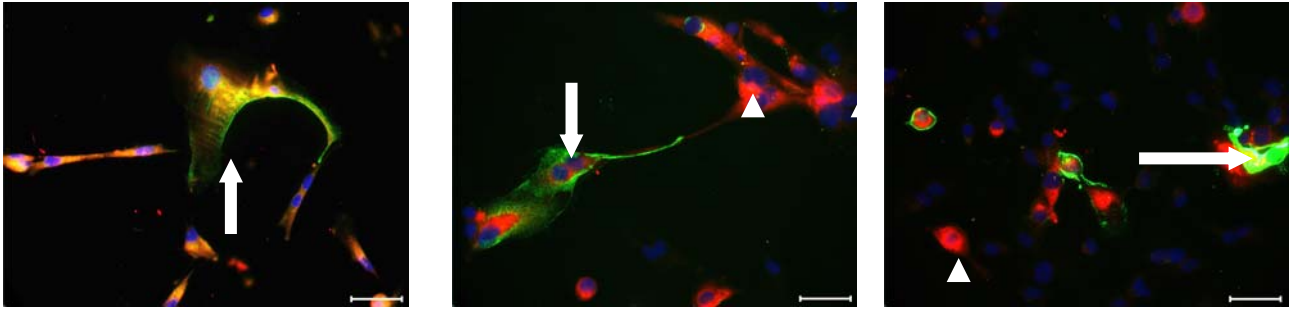
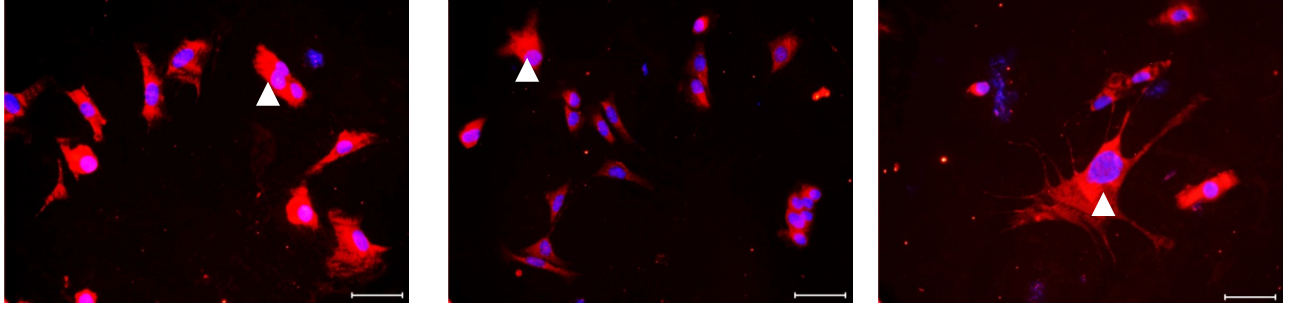
Şekil 4. 9: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta 3.gün ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



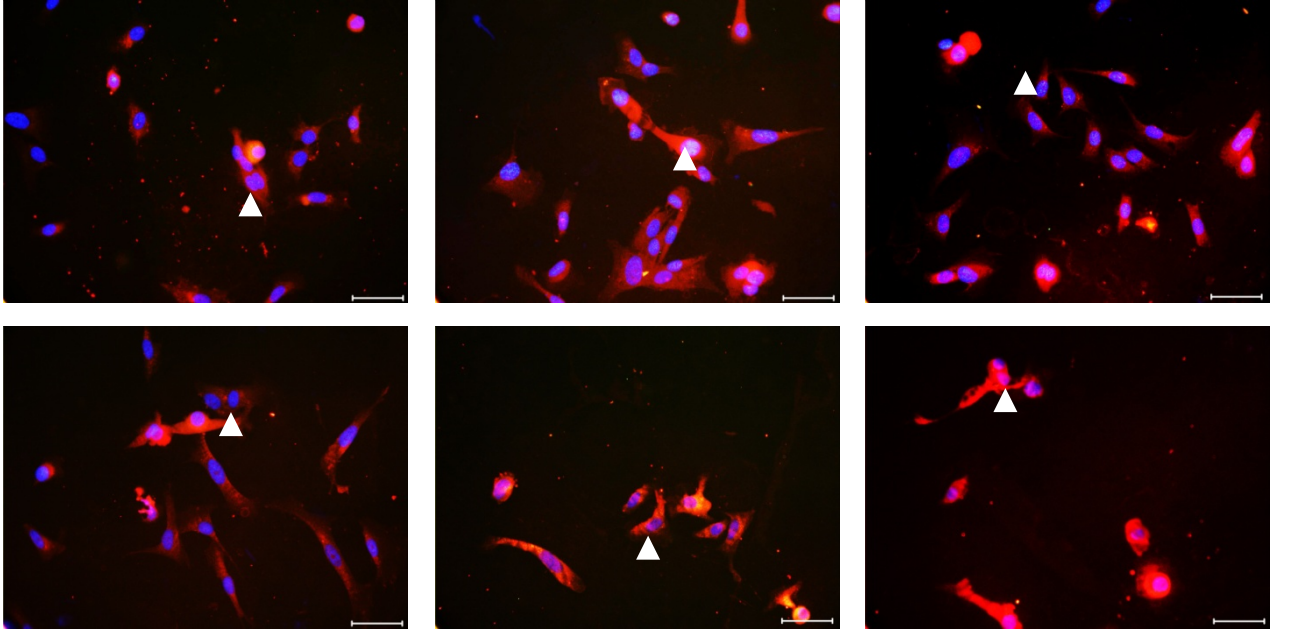
Şekil 4 10 : Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta 4. gün ko-kültürde trofinin (ok), CD26 (ok başı) immunoreaktif hücreler ve sağda üstte nukleus boyanması görülüyor



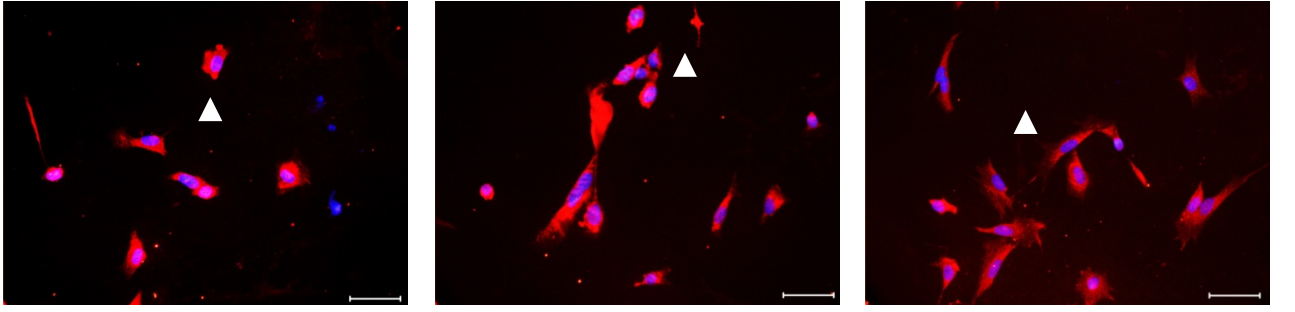
Şekil 4.11: Embriyosu gelişip implantasyona giden hasta grubunun kontrolünde ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.



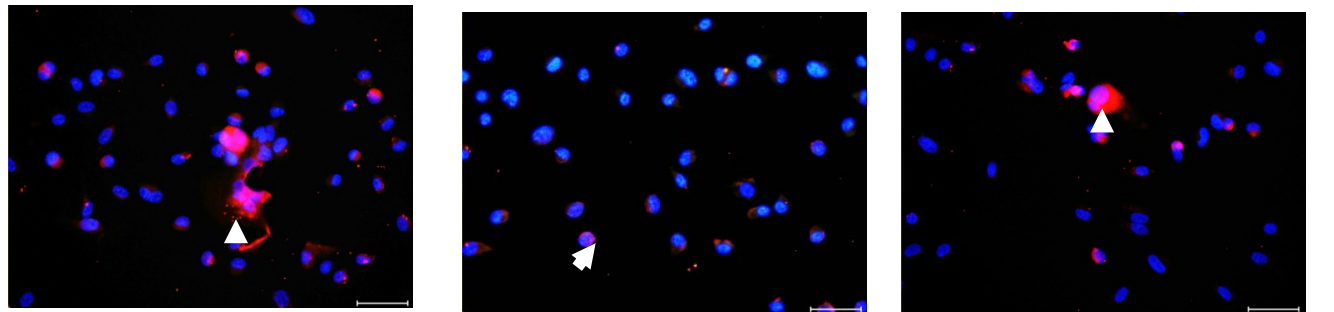
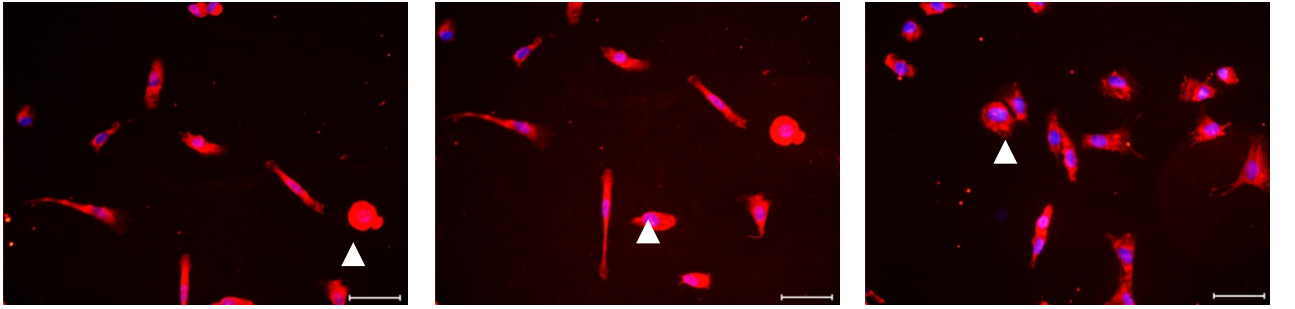
Şekil 4.12: Embriyosu gelişip implantasyona giden grupta 1.gün ko-kültürde trofinin (ok) ve CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor



Şekil 4.13: Embriyosu gelişip implantasyona giden grupta 2.gün ko-kültürde CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.

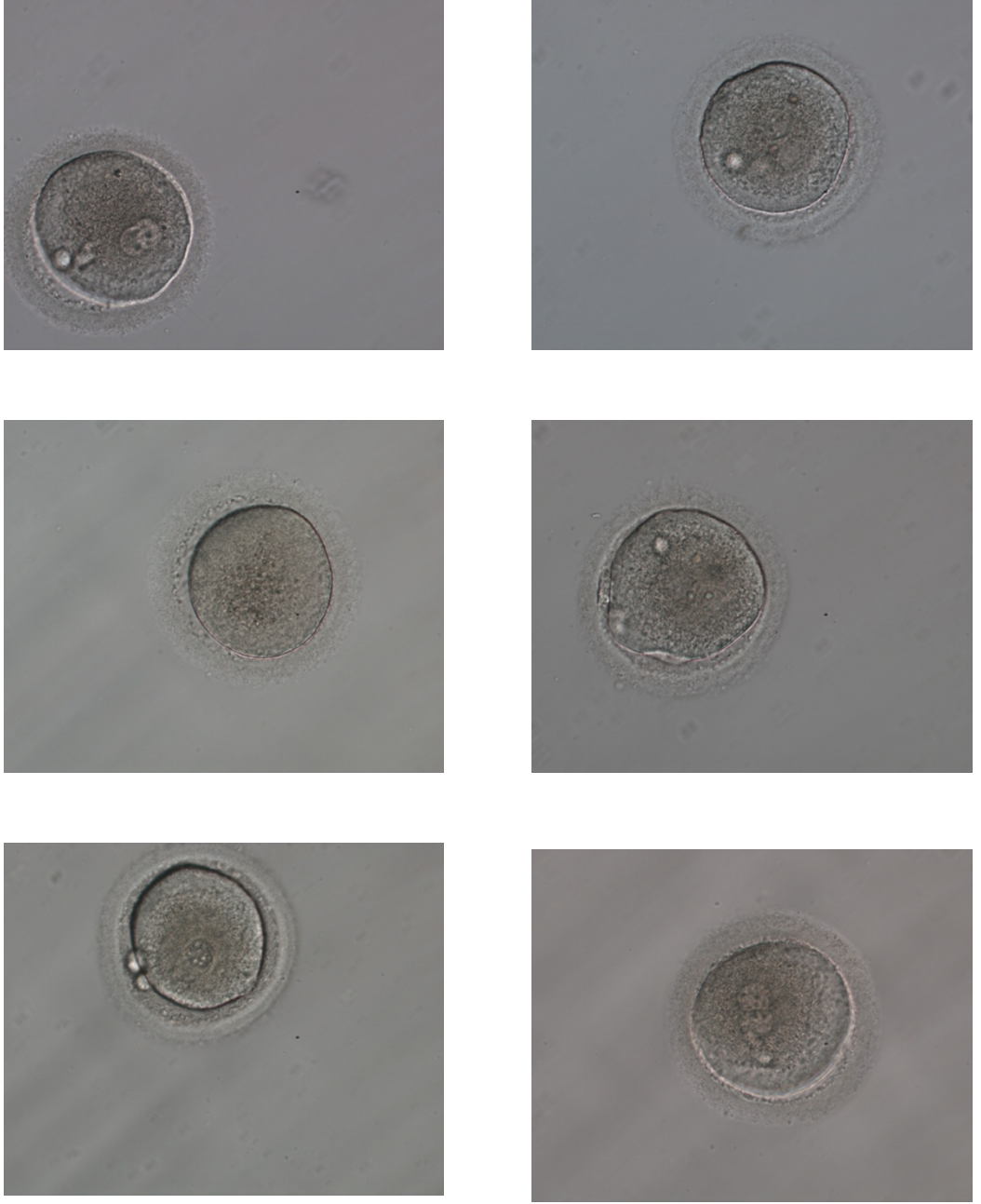


Şekil 4.14: Embriyosu gelişip implantasyona giden grupta 3.gün ko-kültürde CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.

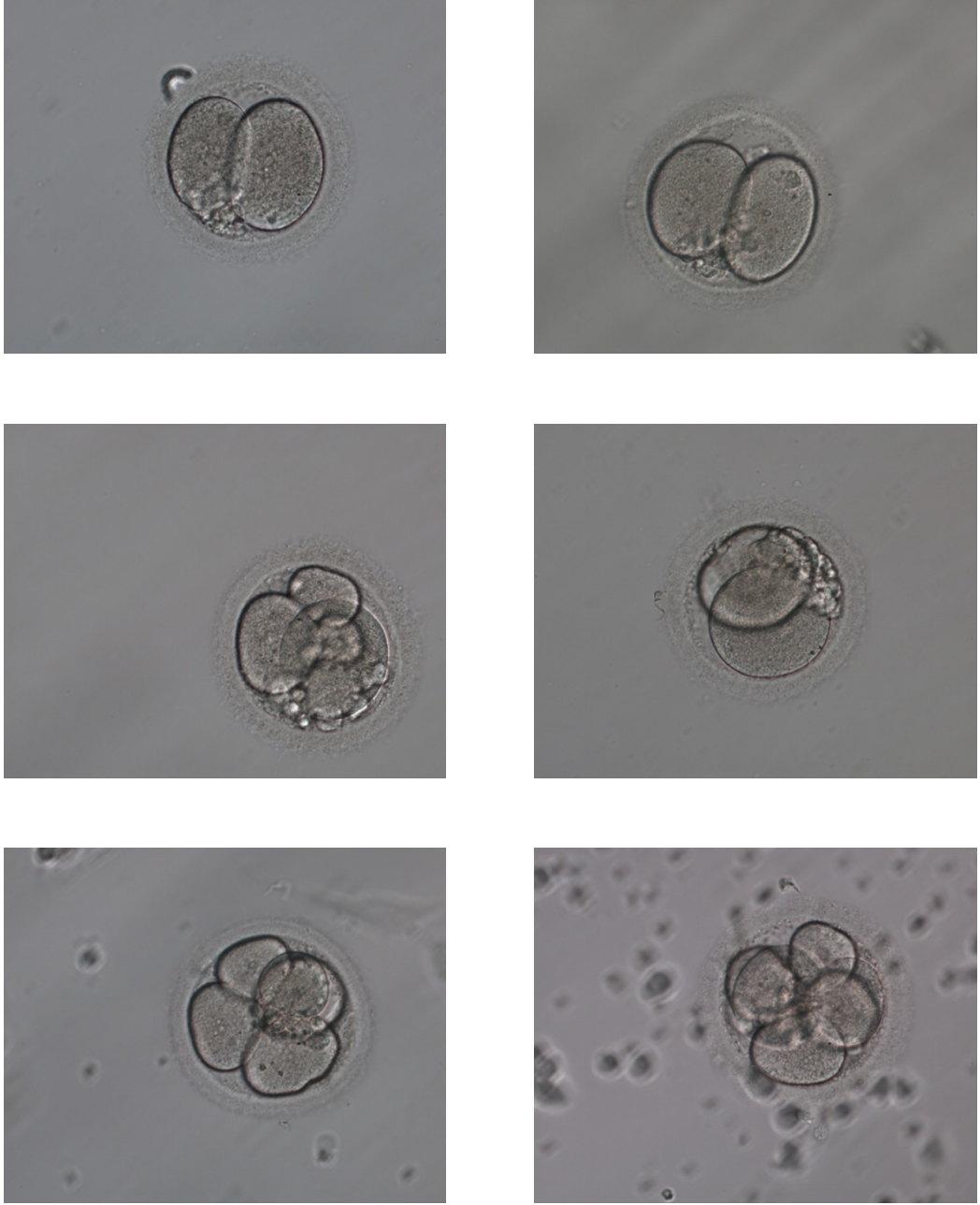


Şekil 4.15: Embriyosu gelişip implantasyona giden grupta 4.gün ko-kültürde CD26 (ok başı) immunoreaktif endometriyal hücreler görülüyor.

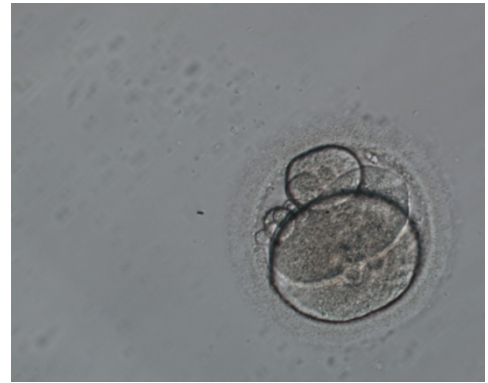
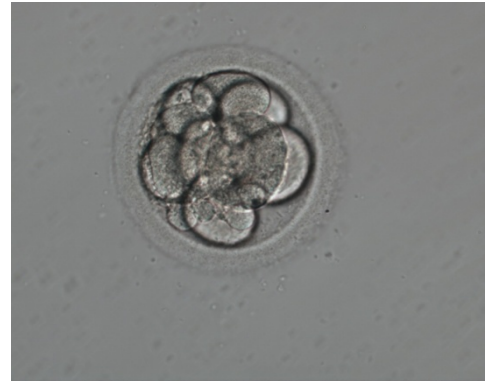
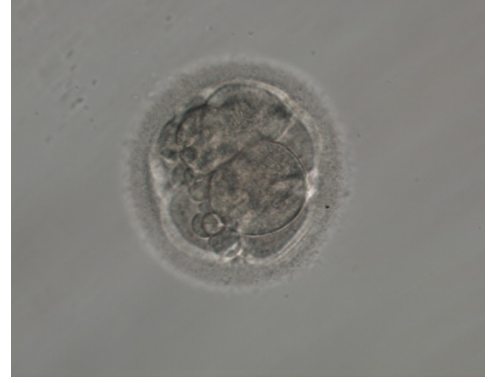
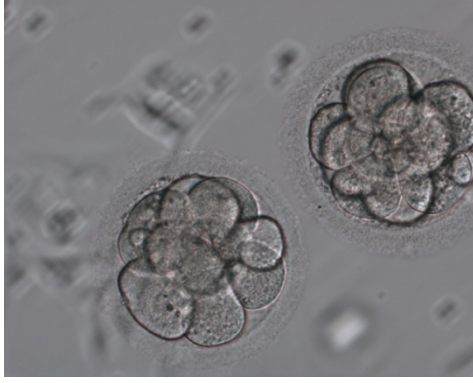
EMBRIYO ŐEKİLLERİ



Şekil 4.16: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta ũstte ko-kũltũr, ortada ve altta konvansiyonel kũltũrde 1.gũn 2PN embriyolar gũrũlũyor.



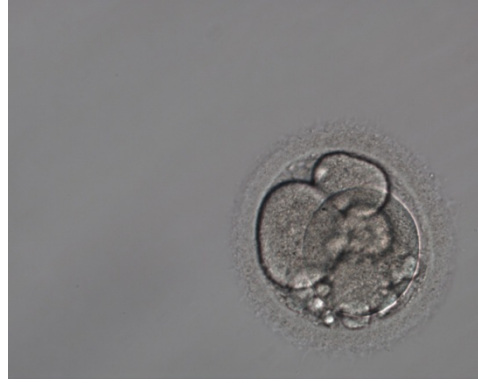
Şekil 4. 17: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta üst ve orta sırada konvansiyonel kültürde ve alt sırada ko-kültürde 2.gün embriyolar görülüyor.



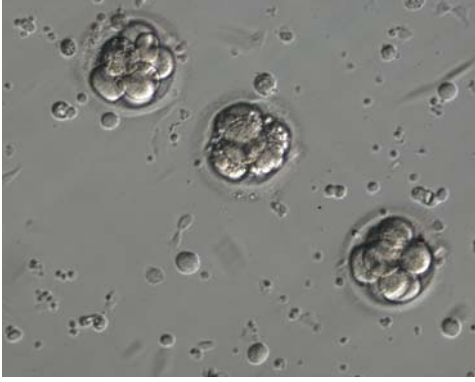
Şekil 4.18: Embryosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta ilk resim ko-kültürde ve diğer 5 resim konvansiyonel kültürde 3.gün embriyolar görülüyor.



Şekil 4.19: Embriyosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta ilk 5 resim konvansiyonel ve alta sağdaki resim ko-kültürde 4. gün embriyolar görülüyor.



Şekil 4.20: Embryosu gelişip implantasyona gitmeyen grupta ilk 2 resim ko-kültürde (ilk sıra sağda embriyo transferi yapıldı) ve diğerleri konvansiyonel kültürde 5. gün embriyolar görülüyor.



Şekil 4.21: Embriyosu gelişip implantasyona giden grupta sırasıyla ilk üçü ve 6.sı ko-kültürde olmak üzere üstte 1.gün ve 2.gün, ortada 3.gün ve altta 4. ve 5.gün embriyolar görülüyor.

5.TARTIŞMA

Yardımlı Üreme Merkezlerine başvuran çiftlerin yarısından fazlasında embriyo gelişmesine rağmen gebelik olmamaktadır. Bizim de çalışmamızda 11 hastadan 2 hastada embriyo gelişimi gerçekleşmedi; 7 hastada embriyo geliştiği halde implantasyonları gerçekleşmedi; sadece 5 hastada embriyo gelişimi devam etti ve implantasyonları gerçekleşti.

Yapılan çalışmalarda dölleme olmasına rağmen gebelik oluşmamasının nedeni olasılıkla embriyonun implantasyon aşamasındadır (Aplin, 2007; Urman, 2010). Bununla beraber, ovidukt kaynaklı embriyotrofik faktör (ETF3)'ün, trofektodermin gelişimini ve embriyoların bölünme sürecini arttırdığı da gözlenmiştir (Lee et al., 2004).

Aplin (2007) endometriyal reseptivite ve embriyo preparasyonunun daha yüksek gebelik oranlarına götüreceğini, erken dönemde gebelik başarısızlığını azaltacağını ve daha az çoğuz gebeliklerin olacağını bildirmiştir. Embriyo ve endometriyum arasındaki ilk temas yeri, luminal epithelium (LE) olup non-reseptivitededen ve adezyon sistemlerinin ekspresyon, organizasyon veya aktivasyonundan sorumludur. İmplantasyonda pek çok potansiyel adezyon mediyatörünün LE hücrelerinin apikalinden ziyade yan yüzlerinde yerleşik olduğu dikkati çekmiş ve epitele tutunan embriyoların hızla adeziv yan membran domain'ine geçiş yaptığı bildirilmiştir (Aplin, 2007).

ET sonrası embriyo bölünmeye ve büyümeye devam etmekte olup ve belirli bir büyüklüğe ulaştığında zona pellusida yırtarak endometriyuma gömülmektedir. Gebeliğin oluşmamasının nedenlerinden biri embriyonun kendisini çevreleyen zona pellusida'yı yırtarak dışarıya çıkamaması ve dolayısıyla implante olamamasıdır. Bu problemi çözmek için ET'i öncesinde kimyasal, mekanik, veya lazer yöntemleri ile bu zarda küçük bir delik açılarak embriyonun dışarı çıkması (hatching) kolaylaştırılmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar bu yöntemle de gebelik oranlarında anlamlı bir yükselme olduğunu göstermiştir (Urman, 2010).

Kültür işlemi sonunda blastosist sayısı anlamlı olarak ko-kültür grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur (% 61'e karşı %3). Ko-kültür sisteminin insan embriyolojik gelişimini düzenlediği, erken dönemde embriyoları kurtarabileceği işaret edilmiş. İnvitro kültürü devam ettirmek suretiyle IVF metoduyla elde edilen embriyoların daha uygun zamanda transfer edilebilmesi, erken bloke olmuş yumurtaları ayırmayı ve dondurma prosedürlerinin en başarılı zamanı olan blastosist aşamasında embriyo dondurma işlemleri kültür sistemleri sayesinde mümkün olduğu bildirilmiştir (Menezo et al., 1990). Ko-kültürlerin tekrarlayan tüp bebek

başarısızlıkları olan çiftlerde kullanılması ile gebelik oranlarının arttığını gösteren çalışmalar vardır (Spandorfer 2003; Zeyneloğlu, 2009). Ayrıca gebelik oranlarını artırıcı etkinin ko-kültüre mi yoksa endometriyumda oluşturulan kontrollü travmaya mı bağlı olduğu tartışmalıdır. Ko-kültürlerin popülaritesinin azalmasında en önemli neden ise son yıllarda kullanılan ve embriyo gelişimini 5-6. güne kadar destekleyen ardışık kültür ortamlarının çıkmış olmasıdır. Bu ortamlarda blastosist aşamasına giden embriyo oranı ko-kültür yapılanlardan farksız olduğu ya da daha iyi olabileceği bildirilmiştir (Urman et al., 2010).

Bu durum bazı hastaların endometriyumlarında kimi CAM'lerin ya da sitokinlerin ekspresyonlarının yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir. Bizim çalışmamızda da embriyosuz kontrol trofinin (+) boyanan ve CD26 (+) boyanan ko-kültürlerimiz incelendiğinde gebe kalan ve gebe kalamayan gruplara arasındaki farklılık dikkat çekmektedir. Shimomura ve ark. (2006), insan blastosistlerinin zona pellusida'yı hatch ederek endometriyuma yapışma yeteneği kazandığını, embriyo ve uterus arasındaki ilişki senkronize bir gelişimin ve farklılaşmanın meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, CD26'nın endometriyumda implantasyon döneminde iyi bir marker olduğunu 35 adet insan blastosistinde incelemişlerdir. Blastosistleri tek tabakalı hücre kültürlerine almışlar ve CD26 overekspresyonunun anlamlı olarak daha yüksek blastosist yapışma oranına sahip olduğunu ve trofoektodermin daha geniş olarak geliştiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, preimplantasyonda bir CD26 ligandı, fibronektin ekspresyonunu da göstermişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçları CD26 ve embriyonal fibronektinin blastosist implantasyonu ile ilişkili olabileceği şeklindedir (Shimomura et al., 2006).

Son dönemlerde geliştirilmiş kültür ortamları embriyoların in vitroda daha uzun süre yaşatılmalarına olanak sağlarken gebelik oranlarının de yükselmesine neden olmuştur. Embriyonun anne endometriyumuna tutunmadan önce ulaştığı en son gelişim aşaması blastosist olduğundan ET'nin bu aşamada yapılması implantasyonu kolaylaştırmaktadır. Çalışmamızda da bu aşamada transferi yapılan embriyolar sayesinde gebeliğin devamı mümkün olmuştur. Çalışmamıza yaşları 26-36 arasında değişen hastalar katıldı. Çalışmaya katılan kadın hastaların yaş ortalaması; gebe kalanlarda daha genç (28 ± 3.54) bulunması beklenen bir durum olup önceki çalışmalarla uyumludur. Hasta yaşı ile 3.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü. Genellikle gebe kalanlarda CD26 (+) hücre sayısı, gebe kalamayan gruba göre daha yüksekti. Sadece 3.gün CD26 (+) hücre sayısı düşüktü.

Çalışmamızda gebe kalan ve gebe kalamayan hastalar arasında, elde edilen embriyoların 1.günden 4. güne kadar olan erken gelişme döneminde, ko-kültür ortamında trophinin ve CD26

ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık ($p=0.046$), 1.gündeki trophinin (+) hücre sayısında bulunmuştur. Gebe kalanlarda 1.gün CD26 (+) endometriyal hücre sayısının gebe kalamayanlara göre daha fazla olduğu; buna karşı trophinin (+) boyanmış hücrelerin daha az olduğu görülmüştür. Gebe kalamayanlarda 1.gün trophinin (+) endometriyal hücre sayısı 11.00 ± 4.30 iken, gebe kalanlarda 5.00 ± 1.63 olup bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Gebe kalan ve gebe kalamayan hastalara ait endometriyal ko-kültür ortamlarında CD26 (+) boyanan hücre sayılarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla beraber, embriyo varlığında CD26 (+) hücre sayısı 1. ve 2.günlerde gebe kalan grupta hafifçe yükselmiş ve 3. ve 4.günlerde ise hafifçe azalmıştı. Gebe kalan grubun kontrol CD26 (+) hücre sayısının da, gebe kalamayan gruptan daha yüksek olduğu görüldü.

Çalışmamızda trophinin (+) hücre sayısı, kontrol trophinin grubunda (embriyosuz endometriyal ko-kültür ortamında) 17.25 ± 19.76 iken, gebe kalan hasta grubunda embriyo varlığında bu sayı düşmektedir. Oysa gebe kalamayan hasta grubunda, gebe kalanlara göre bu ortalama değerlerin 1.gün trophinin (+) boyanma dışında istatistiki olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol CD26 ile kontrol trofinin parametreleri arasında kuvvetli bir negatif korelasyon görülmüştür.

Gebe kalan grupta, kontrol trofinin (+) hücre sayısı gebe kalamayan gruptan düşüktü. Kontrol CD26 (+) hücre sayısı ise gebe kalan grupta, gebe kalamayan gruptan yüksekti. Yani gebe kalan grupta kontrol trofinin (+) hücre sayısı, kontrol CD26 (+) hücre sayısından düşükken gebe kalamayan grupta kontrol trofinin (+) hücre sayısı, kontrol CD26 (+) hücre sayısından yüksek oldu görüldü.

Sugihara ve ark. (2007) insan embriyosu implantasyonu sırasında blastosistin uterus epiteline adezyonunun TE aracılığıyla olduğunu ve embriyonun hızlı gelişimi ve maternal dokuya yayılmasının embriyonal hücrelerin adezyonla uyarılan aktivasyonu olduğunu önermişlerdir. Araştırmacılar, trofinin ligasyonunun homofilik bir CAM olduğunu ve trofoblastik hücreler üzerinde tirozinin fosforilasyonunu uyararak üzerinde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Maymun blastosist kültürlerinde bu peptidin varlığında TE hücrelerinin sayısı ve motilitesi artmıştır. Araştırmacıların bu sonuçları, trofinin aracılığıyla hücre adezyon işlevlerinin insan embriyosu implantasyonunda TE aktivasyonu için moleküler bir anahtar olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmaya katılan gebe kalan ve gebe kalamayan kadınların bazal hormon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bazal hormon değerlerinden LH ile 4.gün trofinin parametreleri arasında negatif bir korelasyon görüldü. Yani 4.gün gebe

kalanlarda ortalama LH değeri 4.71 ± 0.34 iken, ortalama trofinin (+) hücre sayısı 9.25 ± 11.33 'e yükseldi. Gebe kalan ve gebe kalamayan gruplar arasında ortalama LH düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Bazal hormon değerlerinden E2 ile 2.gün trofinin parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü. Gebe kalan ve gebe kalamayan gruplar arasında ortalama E2 düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamakla beraber, gebe kalan grupta E2 ve trofinin (+) hücre sayıları gebe kalamayan gruptan daha düşük olduğu görüldü.

Bazal hormon değerlerinden ST3 ile 1.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü. Ortalama ST3 değeri ve CD26 (+) hücre sayısı; gebe kalan grupta gebe kalamayan gruba göre yüksekti.

1.gün CD26 ile 2.gün CD26 parametreleri arasında kuvvetli bir pozitif korelasyon bulundu. 1.gün ve 2.gün ortalama CD26 (+) hücre sayısı; gebe kalan ve gebe kalamayan gruplarda korelasyon gösteriyordu. 1.gün CD26 ile 4.gün trofinin parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü. Yani embriyo varlığında en yüksek ortalama CD26 (+) hücre sayısı ile en yüksek trofinin değerleri 4.gündeydi. 2.gün CD26 ile 4.gün CD26 parametreleri arasında pozitif bir korelasyon görüldü. 2.gün ve 4.günlerde CD26 (+) hücre sayıları arasında korelasyon izlendi. 3.gün trofinin ile kontrol CD26 parametreleri arasında negatif bir korelasyon görüldü. Embriyo varlığında 3.gün trofinin (+) hücre sayısı azalırken, kontrol CD26 (+) hücre sayısı artıyordu.

Kontrol trofinin grubu ile 1. gün trofinin grubu arasında ortalama trofinin (+) immunreaktif hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p= 0.036$). Yine kontrol trofinin grubu ile 2. gün trofinin grubu arasında ortalama trofinin (+) immunreaktif hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p= 0.021$). Yani 1. ve 2.günlerde (embriyo varlığında) trofinin (+) hücre sayısı, kontrol trofinin (embriyosuz ortamada) grubuna göre daha düşüktü.

İnsanda endometriyum apoptozu implantasyon penceresi döneminde artar. Fetal veya plasental kaynaklı faktörler gibi maternal hormonal faktörler apoptotik sinyal moleküllerinin regülasyonunda potansiyel rol oynarlar. Apoptotik sinyal yollarından biri olan Fas-Fas ligand (Fasl) sistemi, lokal immüntoleransta implantasyon boyunca ve sonra önemli görülmüştür. hCG uygulamaları hücre proliferasyonunu azaltır ve endometriyal hücrelerin apoptozunu arttırdığı ileri sürülmüştür. Ko-kültür deneylerinde hCG uygulanan endometriyal hücreler T hücre apoptozisinde artış gösterdiği ve invivo sonuçların erken gebelik döneminde hücrelerin decidua güçlü Fasl immünoreaktivite eksprese ettiğini ve desidual alanların çeşitli TÜNEL pozitif hücrelere sahip intersitisyel sitotrofoblastlar içerdiğini göstermiştir. İntersitisyel sitotrofoblastsız desidual alanlara göre intersitisyel sitotrofoblast içeren desidual alanlarda

açıkça daha az miktarda TUNEL (+) hücreler gözlenmiştir. hCG'nin peritrofoblastik immüntoleransın bir bağlantısı olabileceği ve endometriyal hücrelerde FasI gibi proapoptotik molekülleri regüle ederek trofoblast invazyonunu kolaylaştırabileceği bildirilmiştir (Kayışlı et al., 2003).

Embriyo implantasyon aşamalarında kısıtlamalardan biri; embriyo uterus interaksiyonunun yerini alabilecek elde edilebilir in vitro model yoksunluğudur. Önceki çalışmalarda; embriyolar, embriyoların yapışıp gelişebileceği endometriyal hücreler veya ekstraselüler matriks substratına tek tabaka olarak kültüre edilmiştir. Fakat, bu modeller embriyonik invazyonu göstermede primer olarak in vivo'da elde edilebilen kısa kritik yapısal ve moleküler destekler yüzünden başarısızlığa uğramıştır. Gebeliğin 4. günü toplanan fare endometriyumu ko-kültürü uygun bir medyumda blastosistlerle kontak kurabilecek şekilde yerleştirilmiş ve 24 saat kültürde embriyolar endometriyuma bağlanma özelliğinde izlenmiş ve endometriyal stromaya kısmi invazyon göstermişler; endometriyum yüzeyinde trofoblastlar görülmemiş, fakat embriyonik kutupta spesifik bağlanma izlenmiştir. Bu model, endometriyal stroma içinde embriyonun doğru invazyonunu göstermiştir ve erken embriyo implantasyonu ile ilgili çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (Tan et al., 2005).

In vitro olarak embriyo üretimin etkileyen faktörler üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar in vitro embriyo üretimi (IVP) nin, sığır üretiminde en önemli biyoteknolojilerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Oositlerin sadece %30-40'ı blastosiste gelişmekte olduğu, bunun sebebinin in vitro çevrede in vivo çevrenin aynen taklit edilemediği ve embriyolardaki sonuçların morfolojisi ve gen ekspresyonunu değiştirmekte olduğu bildirilmiştir. Çeşitli faktörlerin IVP çalışmalarını etkileyebileceği ve in vivo ve in vitro üretilen embriyolar arasındaki farklılıklara katkısı olduğu ifade edilmiştir. At oositlerinin in vitro maturasyon (IVM)'nda ovidukt epitelyal hücreler veya fetal fibroblast hücrelerin ko-kültürünün etkisi ve onların ICSI sonrası blastosist ve fetüslerin gelişim potansiyeli araştırılmıştır. Oositler, ovidukt epitelyal hücreler ve fibroblast hücreleriyle ko-kültüre edilmiş; metafaz 2 ionomycin- muamele edilen spermatozoonla ile ICSI yapılmıştır. Morfolojik olarak normal blastosistler alıcı kısırakların uterusuna transfer edilmiştir. İki farklı ko-kültür grubunda sadece TCM 199'da olgunlaştırılan oosit grubundan önemli derecede daha yüksek blastosist oranları bulunmuştur. Ovidukt epitelyal hücrelerle ko-kültüre edilen oositlerden geliştirilen bu blastosistlerden 6'sı alıcı kısıraklara transfer edilmiş ve 4 gebelikle sonuçlanmıştır. IVM'da ovidukt epitelyal hücre veya fetal fibroblastlarla ko kültürün yararlı etkilerini göstermiştir (Lee et al., 2004).

Başarılı implantasyon sürecinde hangi yabancı blastosistin maternal endometriyum tarafından kabul edilmesi bir çok sistemin karşılıklı etkileşimini içermektedir. İmplantasyon maternal endometriyumun blastosisti kabul etmeğe hazır olduğu ve diğer taraftan spesifik rol oynayan; varsayılan implantasyon penceresinde meydana gelir. Burada sitokin ve kemokinler üretilir ve adezyon molekülleri ile belirli MHC molekül sınıflarını eksprese olur. Sitokinlerle kontrollü saldırının anahtarı olduğu; gebeliğin oluşumunda aşırı pro veya anti inflamasyonun zararlı olduğu bildirilmiştir. Kemokinlerin embriyonun oryantasyonunu kontrol ettiği, adezyon moleküllerinin anne ve blastosist arasındaki fiziksel etkileşimi tespit etmek için gerekli olduğu immün hücrelerin ve özellikle uterin NK ve regülatör T hücrelerin blastosisti indüklenme toleransı için çok önemli olduğu anlaşılmıştır (van Mourik et al., 2009). Sitokinler ve büyüme faktörlerinin lokal mediatörler olarak endometriyumda steroid oksidasyonunda endometriyumu implantasyona hazırlamada rol oynadığı hakkında kuvvetli deliller mevcuttur (Saharkey, 1998). Bu faktörlerin ayrıca; çeşitli türlerde preimplantasyon embriyoların gelişimini düzenlemek için otokrin ve parakrin şekilde rol oynadığı gösterilmiştir. Her sitokinin fonksiyonunu tanımlama girişimi, reseptör lokalizasyonunu, şeklini ve in vivo-in vitro deneyleri içerir. Bunun yanında sitokin ağlarının fazladan ve karışık doğası yüzünden faktörlerin fazlalığının implantasyonda kritik rol aldığı kanıtlanmıştır. Preimplantasyon embriyoların gelişiminin sitokinler tarafından direk olarak etkilenebilmesine rağmen, çeşitli türlerden tanımlanmış embriyoların in vitro kültürü ekzojen sitokinlerin blastosist aşaması gelişimi için gerekli olmadığını da düşündürmüştür. Bununla beraber, ortama büyüme faktörleriyle birlikte yapılan ilaveler insanlar ve evcil türlerde desteklenmiş üreme tekniklerinde çok kullanılan in vitro embriyo kültürünün zararlı etkilerine çare bulmada değerlidir. Endometriyumunda LIF'ü eksprese edemeyen fareler implantasyonu desteklemede başarısızdırlar. Reseptif endometriyum için bu proteinin üretimi kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Tersine; epidermal büyüme faktörü için reseptörü kapatan CF1 soyundaki fare embriyoları, bağlanmakta başarısızdırlar, bunun göstergesi olarak bu reseptör implantasyon yetenekli embriyo üretmek için gereklidir. Bu reseptörlerin ve onların ligandlarının anormal ekspresyonu insan infertilitesinin bazı formlarına temel oluşturur. Endometriyumda bu faktörlerin etkilerinin araştırılması embriyo bağlanması ve implantasyonun temelini incelemeye izin verecektir. LIF'ün uterin ekspresyonu embriyo implantasyonunda fare için kesinlikle gerekli, insan için kritik olduğu bildirilmiştir (Chen et al., 2004). LIF mRNA seviyeleri değişik dokularda (desidua, koryonik villus) veya değişik hastalarda farklı bulunmamıştır. LIF-R β mRNA seviyeleri koryonik villusda desidüadan önemli derecede yüksek bulunmuştur; fakat NP ve AP arasında değişiklik bulunmamıştır.

Başka bir çalışmada endometriyal epitelyal hücreler ve immün hücreler arasındaki interaksyonu in vivo ko-kültür modelinde incelenmiştir. Flow sitometri analizi ve hücre yüzey boyama markerları intraepitelyal lenfositler (IEL), timositler, splenositler ve periferal kan lökositleri gibi alanlardan uygun lökositleri belirlemek için kullanılmıştır. Fare endometriyal epitelyal hücrelerinin (EEC) periferal kan lökositleriyle (BPL) ko-kültürü, lökositlerin ve epitelyal bariyer fonksiyonunun yaşamını etkilediği ileri sürülmüş; son zamanlarda sergilenen endometriyal epitelyal hücre ve immün hücrelerin in vitro kültür modelinde birbiriyle karşılaştırılması uterin enfeksiyonlar üzerine lokal hücresele immün yanıtları araştırmaya anlam sağlayabilir (Ho et al., 2006).

Embriyo implantasyonu trofoblast-endometriyal interaksyonlarının koordinasyonunu içeren kompleks bir işlemdir. İmplantasyon boyunca, blastosiste tutunan trofoblast hücreleri endometriyal stromaya invazyondan önce endometriyum lümen epiteline penetre olur. Önceki çalışmalar kalsitoninin aktif olarak rat ve insan endometriyal epitelyal hücreleri (EEC) tarafından implantasyon penceresi boyunca salgılandığını ve endometriyal kalsitonin ekspresyonunun amaçlanan parçalanmasının embriyo implantasyon oranlarını azalttığını göstermiştir. Kalsitoninin kalsiyum mobilizasyonu ile EEC'nin trofoblastik yer değişimini düzenlediğini ve dolayısıyla embriyo implantasyonunu kolaylaştırdığını gösterilmiştir (Li, 2007). Hemokoryal plasantasyonlu türlerde (fare ve insan gibi) implante olan blastosistin trofoblast hücrelerinin apoptozisini uyardığı ve endometriyumun yüzey epiteliyle karşılıklı ilişkisi sonucu endometriyal epitelyal hücrelerle (EEC) ile yer değiştirir. Anti Fas aktive edici antikoru p38, MAPK ve JNK'yı EEC apoptozisini indüklemek için aktive edebileceğini ve dolayısıyla EEC'de trofoblast gelişimini desteklediğini kanıtlamıştır (Hsu et al., 2008).

$\alpha\beta_3$ integrinin endometriyal reseptivite markerı olduğu insan ve diğer memeli türlerde kanıtlanmıştır; immünohistokimyasal, ve flow-sitometrik çalışmalar rat endometriyal epitelyal hücrelerde (EEC)'de uterusun nonreseptif, prereseptif, reseptif fazları boyunca $\alpha\beta_3$ integrinin ekspresyonunu göstermek için yapılan çalışmalarda; rat EEC'sinde endometriyal reseptivite işareti olarak başarılı olarak gösterilmiş ve bu molekülün bu türlerde, implantasyon işlemi için vazgeçilmez olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Bizim çalışmamızda da embriyosuz kontrol trofinin (+) boyanan ve CD26 (+) boyanan kök kültürlerimiz incelendiğinde gebe kalan ve gebe kalamayan gruplara arasındaki farklılık dikkat çekmektedir. İmplantasyon endometriyumun blastosisti kabul etmeğe hazır olduğu düşünülen “implantasyon penceresi”nde meydana geldiğine göre burada bu sırada sitokinler, kemokinler ve CAM ile bazı MHC molekülleri eksprese olduğu anlaşılmıştır. Bu faktörlerin preimplantasyon embriyoların gelişimini otokrin ve parakrin olarak etkilediği anlaşılmaktadır. Blastosistlerin endometriyuma yapışma yeteneği kazanması, embriyo ve uterus arasındaki ilişkilerin zamanında ve gerekli mediyatörlerin ve CAM’lerinin eksiksiz ve dengeli ekspresyonlarının önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Konseptus ve anne arasında gelişimin ve farklılaşmanın kök kültür ortamlarında daha ayrıntılı incelenmesi gerekliliği hala geçerlidir. Araştırmacıların sonuçları da CAM’lerinin daha ayrıntılı çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Alikani M. E. (2005) Epithelial cadherin distribution in abnormal pre-implantation embryos. *Human Reproduction*, Vol. 20, No. 12 pp. 3369-3375.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell. Cell junctions, Cell adhesion and the extracellular matrix.* P.1065-1124; *Germ Cells and Fertilization.* P. 1127-1156. Fourth edition. Garland Science Taylor and Francis Group. ISBN: 0-8153-3577-6.
- Almolda E.A.C, Huovila A-pj, Sutherland AE, Stephens LE, Calorca PG, Shaw LM.(1995) Mouse integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell*, 81:1095-104.
- Aplin J.D., (1997) Adhesion molecules implantation. *Rev Reprod* 2(2):84-93.
- Aplin J.D., (2007) Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reprod Biomed Online*. 2007;14 Spec No 1:49-55.
- Atabekoğlu C.S., Engin Y., Üstün Y., Aytaç R. (2002) Üreme Fizyolojisi ve Adhezyon Molekülleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Cilt 55, Say 1, 85-92.
- Bahar L. ve Baykal T. (2008) Endometriyal reseptivitenin implantasyondaki rolü. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2):1-6.
- Bamberger A.M, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger C.M., Drakakis P., Coutufaris C., Makrigiannakis A. (2000) The adhesion molecule CEACAM1 (CD66 a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblasts. *Am J Pathol* , 156:1165-70.
- Bentin-Ley U., Sjögren A., Nilsson L., Hamberger L., Larsen J.F., Horn T. (1999) Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 14: 515-520.
- Bischof P., Campana A. (1995) Effect of Leukemia Inhibitory Factor on Human Cytotrophoblast Differentiation along the Invasive Pathway. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2 (2): 198.
- Bischof P., Meisser A., Campana A. (1998) Involvement of Trophoblast in Embryo Implantation: Regulation by Paracrine Factors. *Journal of the Reproductive Immunology*, 39 (1-2): 167-177.
- Breckwold M. (1996) Expression of Ad4/Bp/cytochrome 450 sidechain cleavage and induction of cell death in long term cultures of human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*, 6:391-400
- Campbell S., Swann H.R., Aplin J.D., Seif M.W., Kimber S.J., Elstein M. (1995) CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod*, 10: 425-430.
- Can A. (2000) Hücre-Hücre Hücre-Matriks İlişkileri.[http:// histemb.medicine.ankara.edu.tr / Hucre_Hucre_Hucre_Matriks_Iliskileri.pdf](http://histemb.medicine.ankara.edu.tr/Hucre_Hucre_Hucre_Matriks_Iliskileri.pdf)
- Carlson B.M. (1996) *Patten's Foundations of Embryology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill. p.3-188.
- Carson D.D., Tang J.P., Julian J. (1993) Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol*, 155: 97-106.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. (2000) Embryo implantation. *Dev Biol*, 223:217-237.
- Casta-Rendon, W.A., Castro-Alvarez, J.F., Guzman- Martinez, C., and Bueno-Sanchez J.C. (2006) Blastokist-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 39:1373-1385.
- Chakraborty I., Das S.K, Wang J, Dey S.K. (1996) Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo- oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol*, 16: 107-122.

- Chen, H.F., Chao K.H., Shew, J.Y., Yang, Y.S., and Ho, H.N. (2004) Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor is not altered in decidua and chorionic villi of human anembryonic pregnancy. *Human Reproduction*, Vol. 19, No.7 pp 1647-1654.
- Chernevak JL., Illsley NP. (2000) Episialin acts as antiadhesive factor in an in vitro model of human endometrial-blastocyst attachment. *Biol. Reprod.*, 63:294-300.
- Collins Tony J. (2007) ImageJ for microscopy *BioTechniques* 43:S25-S30 doi 10.2144/000112517.
- Daita Nadano, Kazuhiro Sugihara, Bibhash C. Paria, Sakura Saburi, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, Jun Nakayama, Michiko N. Fukuda (2002) Significant Differences Between Mouse and Human Trophinins Are Revealed by Their Expression Patterns and Targeted Disruption of Mouse Trophinin Gene *Biology of Reproduction* 66, 313–321.
- Damsky C.H., Librach C., Lim K.H. (1994) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 120: 3657-3666.
- Das S.K., Wang X.N., Paria B.C, Damm D., Abraham J.A., Klagsburn M., Andrews G.K., Dey S.K. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*; 120:1071–1083.
- Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. (2002) Network of Cytokines, Integrins and Hormones in Human Trophoblast Cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 53 (1-2): 257-268.
- Dey SK, Paria BC, Huet-Hudson YM. (1995) *Molecular and Cellular Aspects of the Peri-Implantation Process*. New York: Springer; 113–124.
- De Felici M, Camaioni A, Russo MA, Siracusa. (1990) Selective binding of mouse and human spermatozoa to beads coated with extracellular matrix component. *Mol. Reprod Dev* 27:337-43.
- Dimitriadis E, Sharkey A.M., Tan Y.L., Salamonsen L.A. and Sherwin J.R.A. (2007) Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5:44.
- Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F. (1999) Embryo-Maternal Interactions at the Implantation Site: A Delicate Equilibrium. *Gynecology and Reproductive Biology*, 83 (1): 85-100.
- Fawcett D.W. and Jensch R.P. (2002) *Concise Histology. Female Reproductive System*. Second edition. Arnold A member of the Hodder Headline Group. P. 283-299. ISBN: 034080677X.
- Fu, J.J, Lin, P., Lv, X, Y, Yan, X., J., Wang, H. X, Zhu, C., Tsang, B.K., Yu, X.-G, Wang, H. (2009) Low molecular mass polypeptide-2 in human trophoblast: over-expression in hydatiform moles and possible role in trophoblast cell invasion. *Plasenta*, 1-8.
- Fusi F.M., Montesano M., Bernocchi N., Panzeri C, Ferrara F., Villa A, Bronson R.A. (1996) P-selectin is expressed on the oolemma of human and hamster oocytes following sperm adhesion and is also detected on equatorial region of acrosome-reacted human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod*, 2:341-7
- Fukuda M.N., Sato T, Nakayama J, Klier G., Mikami M., Aoki D, Nozawa S. (1995) Trophinin and tascin, a novel cell adhesion complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev*, 9: 1199–1210.
- Fukuda MN, Nozawa S. (1999) Trophinin, tascin, and bystin: a complex mediating unique attachment between trophoblastic and endometrial epithelial cells at their respective apical cell membranes. *Semin Reprod Endocrinol*, 17:229–234.
- Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. (1991) Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? (1991) *Am J Pathol* 138:537-43.

- Galan A, O'Connor E, Valbunea D. (2000) The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol. Reprod.*, 63:430-439.
- Gartner L.P. and Hiatt, J.L. (2009) *Renkli Histoloji Atlası. Dişi Üreme Sistemi. Çeviri Editörleri: Dağdeviren A., Müftüoğlu S., Karabay G., Güneş Tıp Kitabevleri. Dördüncü Baskı. p.343-365.*
- Geng J.G., Raub T.J., Baker C.A., Sawada G. A. , Ma L, El Hammer A.P. (1997) Expression of P-selectine ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectine on acrosomal membrane of porcine sperm cells. Poencial implications for their involvement in sperm-egg interactions. *J Cell Biol.*, 137:743-54.
- Glander H.J, Herrman K, Haustein U.F. (1987) The equatorial fibronectin band on human spermatozoa: diadnostic help for femal fertility? *Androlog* 2:335-9.
- Gökçimen A., Temel S. (2004) İmplantasyon ve moleküler etkileşimler, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*,11(4):25-33.
- Grewal, S., Carver,G.J., Ridley, A.J., Mardon H., J (2008) Implantation of the human embriyo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Pnas*, July 2, vol. 105 (42), 16189–16194.
- Grewal, S., Carver,G.J., Ridley, A.J., Mardon, H. J. (2010) Human endometrial stromal cell Rho GTPases have opposing roles in regulating focal adhesion turnover and embriyo invasion in vitro. *Bor Papers in Pre ss*.Published on March 31, as DOI:10.1095/biolreprod.109.080630.c
- Grosskinsky C.M, Yowell C.W, Sun J., Parise L.V, Lessey B.A. (1995) Modulation of Integrin Expression in Endometrial Stromal Cells In Vitro. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* , 2 (2): 198
- Guan JL, Hynes RO. (1990), Lyphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4/beta 1. *Cell* 60:53-61.
- Guillomot M. (1999)Changes in Extracellular Matrix Companents and Cytokeratins in the Endometrium During Goat Implantation. *Plasenta*, 20 (4): 339-345.
- Gürsoy E. ve Koptagel E. (1997) *Embriyoloji Atlası. Dişi Üreme Sistemi. Esnaf Ofset Matbaacılık. ISBN: 975-96334-0-X. s.31-85.*
- Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonenberg A et al. (1990) The a6/b1 integrin heterodimers mediates cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* 10:2175-84.
- Hannan, J.N., Jones, R.L., White C, Salamonsen L.A. (2006) The Chemokines, CX3CL1, CCL1, CCL14, and CCL 14, promote humantrophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biology of Reproduction* 74, 806-904. Published online before print 1 February 2006 DOI 10.1095/biolreprod.105.045518.
- Harduf H, Goldman S and Shalev E.(2009) Progesterone receptor A and c-Met mediates spheroids-endometrium attachment, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:14 doi:10.1186/1477-7827-7-14.
- Hemler M.E. (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, fuctions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8:365-400.
- Henkel R, Schaller J, Glander HJ, Schill WB. (1996) Low expression of adhesion molecules and matrix proteins in patients showing poor penetration in zona –free hamster oocytes. *Mol. Hum Reprod* 2:335-9
- Hirota Y., Osuga Y., Hasegawa A., Kodama A.,Tajima T.,Hamasaki K., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Harada M.,Takemura Y., Yano T., Tsutsumi O., Taketani Y. (2000) IL-1 β stimulates migration and survival of first trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial epithelial cell-derived IL-8. London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone; p.341-371.
- Ho L.S., Tsang L.L., Chung Y.W., Chan H.C.(2006) Establishment of a mouse primary co-culture of endometrial epithelial cells and peripheral blood leukocytes: Effect on epithelial barrier function and leukocyte survival. *Cell Biology International*, 30: 977-982.

Hogervorst F., Kuikman I., van Kessel A.G., Soneneberg A. (1991) Molecular cloning of the human $\alpha 6$ integrin subunit: alternative splicing of $\alpha 6$ mRNA and chromosomal localization of $\alpha 6$ and $\beta 4$ genes. *Eur J Biochem* 199:425-33.

Hsu, W. L., Chen Y. H., Chao K., C., Chang S. P., Tsui, K. H, Li, H. Y., Sung, Y. J. (2008) Anti- fas activating antibody enhances trophoblast outgrowth on endometrial epithelial cells by induction of P38 MAPK/JNK-mediated apoptosis. *Plasenta*, 29:338-346.

Hynes R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69:11-25.

Illingworth I.M., Kiska I., Bagley S., Ireland G.W, Garrod D.W, Kimber S.J. (2000) Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the pre-implantation period of pregnancy: a mechanism for facilitating implantation. *Biol Reprod*, 63: 1764-1773.

Imai, K., Kanzaki, H., Fujiwara, H., Maeda, M., Ueda, M., Suginami, H. and Mori, T. (1994) Expression and localization of aminopeptidase N, neutralendopeptidase, and dipeptidyl peptidase IV in the human placenta and fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170, 1163±1168.

İrez T. (2010) Embriyoloji Ders Notları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Reprodüktif Endokrinoloji Bilim Dalı Tüp Bebek Merkezi, İstanbul.

Jha, K.R., Titus S., Saxena D., Kumar P.G., Laloraya, M. (2006) Profiling of E-cadherin, β -catenin and ca^{2+} in embryo-uterine interactions at implantation. *FEBS letters* 580 5653-5660.

Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2009) Temel Histoloji, Text and Atlas. Dişi üreme sistemi. Çeviri Editörleri Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener Aytekin Nobel Kitabevleri, ISBN:978-975-420-699-9. Eleventh Edition Mc Graw – Hill Companies. s. 435-452.

Fu J.J, Lin P., Lv , X.Y., Yan J., Wang, C. Zhu, B.K. Tsang, X.-G. Yu., H. Wang (2009) Low Molecular Mass Polypeptide-2 in Human Trophoblast: Over-Expression in Hydatidiform Moles and Possible Role in Trophoblast Cell Invasion. *Placenta*, 1–8.

Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y. (1998) Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol Hum Reprod*, 4: 990-998.

Karaöz E. (2009) II. Temel Hücre Kültürü Teknikleri ve Endometriyum-Embriyo-Ko-kültürü Uygulamaları Kursu, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi Kocaeli.

Kayisli U.A., Selam B.,Guzeloglu-Kayisli O., Demir R.,and Arici A. (2003). Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating fas-fas ligand system. *The Journal of Immunology*, 171:2305-2313.

Kenny, A.J., O'Hare, M.J. and Gusterson, B.A. (1989) Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet*, 2: 785-787.

Kierszenbaum A.L. (2006) *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Follicle Development and Menstrual cycle.* Mosby. p.565-607.

Kimber S.J., Brown D.G., Pahlsson P., Nilsson B. (1993) Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. *Histochem J*, 25: 628-641.

Klentzeris L.D, Bulmer JN, Trejdosiewicz LK, Morrison L., Cooke ID. (1993) Beta 1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile woman. *Hum Reprod* 8:1223-30

-Kamijo T., Rajabi M.R., Mizunuma H., Ibuki Y. (1998) Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol Hum Reprod*, 4: 990-998.

- Korkmaz C. (2002) Yardımcı Üreme Tekniklerinde (IVF, ICSI) Farklı Hücre Kültürleri ile elde edilen insan embriyolarının blastomer fragmentasyonlarının azaltılması açısından incelenmesi. Doktora Tezi, Danışman: Yrd.Doç.Dr. Mehmet Cıncık, 2002, 60 sayfa.
- Krussel J.S., Bielfeld P., Polan M.L., Simo'n C.(2003) Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 110: 2-9.
- Kuehnel W. (2003) Female sexual organs. *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy*. 4th ed, revised and enlarged. Thieme Stuttgart and New York. p.400-437.
- Kumtepe Y., Kıran H., Tokat Z.G., Kendirci A.Ç., Çetin M. T. (2007) Yardımcı Üreme Tekniklerinde Ko-KültürKullanımı, *Arşiv*, 16: 235.
- Larsen W.J. (1993) *Human Embryology. Gametogenesis, Fertilization, and the First Week*. Churchill Livingstone. New York, Edinburgh, Lndon, Melbourne, Tokyo. p.1-31.
- Lee, Y. L., Lee, K. F., Xu, J.S., He, Q.Y, Chiu J.F., Lee, W. M., Luk, JM., and Yeung W.S.B. (2004) The embriyotrophic activity of oviductal cell-derived complement C3b and İc3b, a novel function of complement protein in reproduction. Vol.279, No. 13, Issue of March 26, pp. 12763-12768.
- Lessey B.A., Damjanovich L., Coutifaris C., Castelbaum A., Albeda S.M., Buck C.A. (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium: correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest*, 90: 188-195.
- Li, H. Y., Shen J.T, Chang S.P., Hsu W.L., Sung Y.J. (2007). Calcitonin promotes outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells: involvement of calcium mobilization and protein kinase c activation. *Plasenta*, 29 20-29.
- Mac Camlan C.D., Getsios S., Chen G.T. (1998) Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. *Am J Reprod Immunol*, 39:96-107.
- Makrigiannakis A, Coukos G, Blaschuk O, Coutifaris C. (2000)Follicular atresia and luteolysis evidence role for N-cadherin. *Ann NY Acad Sci*. 900:46-55.
- Margarit, L.,Gonzalez, D., Le, Lewis, P.D., Hopkins, L., Davies, C., Conlan, R.S., Joels, L.,and White, J.O. (2009) L- selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Human Reproduction*,1-11. Doi:10. 1093/humrep/dep 247.
- Menezo Y.J.R., Guerin J.F., Czyba J.C. (1990) Improvement of Human Early Embryo Development in vitro by Co-culture on Monolayerse of Vero Cells. *Biology of Reproduction* 42, 301-306.
- Merviel P., Challier J.C., Carbillon L., Foidart J.M., Uzan S. (2001) The Role of Integrins in Human Embryo Implantation. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16: 364-371.
- Meseguer M. Pellicer A, Simon C, (1998) MUC1 and endometrial receptivity *Mol Hum Reprod* 4:1089-1098.
- Moore K.L, Persaud T.V.N. (2009) The Developing Human. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. In: Dalçık H ve Yıldırım M., 8.Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, (Philadelphia: WB Saunders), p.14-53.
- Motta, E.L.,Smith, M.G., Serafini, P.C., Coslovsky, M., Hassun, P., Rocha, A.M., Yadid, I. (2009) Human choriogonadotropin prior to controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization improves implantation, and pregnancy rates. *Assisted Reproduction* DOI 10.1007/s10815-009-9322-x.
- Murphy C.R., Rogers P.A.W., Hosie M.J., Leeton J., Beaton L. (1992) Tight junctions of human uterine epithelial cells change during the menstrual cycle: a morphometric study. *Acta Anat* 1992; 144: 36-38.
- Naot D., Sionov RV Ish-Shalom D. (1997) CD 44: Structure function, and assosiation with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71:241-319.

- Nishioka Y., Higuchi T., Sato Y., Yoshioka S., Tatsumi K., Fujiwara H. and Fujii S. (2003) Human migrating extravillous trophoblasts express a cell surface peptidase, carboxypeptidase-M, *Molecular Human Reproduction* Vol.9, No.12 pp. 799-806.
- Novaro V, Rettori V, Gonzalez ET, Jawerbaum A, Faletti A, Canteros G, Gimeno MAF. (1996) Interaction Between Uterine PGE and PGF2a Production and the Nitridergic System During Embryonic Implantation in the Rat. *Prostaglandins*, 51 (6): 363-376.
- Oehninger S. (2001) Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction. *Cells Tissues Organs*, 168:58-64.
- Paria B.C., Huet-Hudson Y.M., Dey S.K. (1993) Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1;90(21):10159-62.
- Paria BC, Lim H, Wang X-N, Liehr J, Das SK, Dey S.K. (1998) Coordination of different effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 139: 5235-5246.
- Paria B.C., Elenius K., Klagsbrun M., Dey S.K. (1999) Heparin-binding EGFlike growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*, 126:1997–2005.
- Parr E.L. and Parr M.B. (1989) Epithelial cell death during rodent embryo implantation. In: Yoshinago K, ed. *Blastocyst Implantation*. Boston: Serono Symposia USA Adams Publishing Group; 105-115.
- Poirier F, Kimber SJ. (1997) Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol Hum Reprod*, 3: 907-918.
- Raab G, Klagsbrun M. (1997) Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 1333: 179-199.
- Raga, F., Casan, E.M. and Bonilla-Musoles F. (2008) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I regulation of interleukin (IL)-1b and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *Obstetrics Gynecology Research* Vol. 34, No. 4: 464-472.
- Rohde LH, Julian J, Babikania A, Carson DD. (1996) Cell surface expression of HIP, a novel heparin/heparan sulfate binding protein of human uterine epithelial cells and cell lines. *J Biol Chem* 1996; 271: 11824-11830.
- Rufas O, Fisch B, Ziv S, Shalgi R. (2000) Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Mol Hum Reprod*, 6:163-9.
- Ruoshlahti E, Pierschbacher MD. (1987) New prospective in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-7.
- Ross H.S. (2003) *Histology A text and Atlas. Female Reproductive System*. Fourth edition. p.726-783. ISBN: 0-683-30242-6.
- Sadler TW. (2004) *Langman's Medical Embryology*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.3-48.
- Sarani S.A., Ghaffari-Novin M., Warren M.A, Dockery P., Cooke I.D. (1999) Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. *Hum Reprod*, 14: 3101-3106.
- Sato, Y., Fujiwara, H., Higuchi, T., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Maeda, M. and Fujii, S. (2002) Involvement of dipeptidyl peptidase IV in extravillous trophoblast invasion and differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 4287±4296.
- Seyhan A, Ata B, Urman B.(2008) TSRM Bilimsel çalışma grubu adına. IVF Uygulamalarında Ko Kültürler (co culture) ne Kadar Etkili - Meta Analiz Sonuçları, Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği. [http : // www.tsrn.org.tr / tr / doktorlara / downloads. html](http://www.tsrn.org.tr/tr/doktorlara/downloads.html)

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS et al. (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374:327-37.

Sharkey A. (1998): Cytokines and implantation, *Reviews of Reproduction*, 3, 52–61.

Shi, Y. L., Luo, X.Z., Zhu, X.Y, Hua, K.Q, Zhu, Y., Li, D.J. (2006) Effects of combined 17 β -estradiol with TCDD on secretion of chemokine IL-8 and expression of its receptor CXCR1 in endometriotic focus-associated cells in co-culture. *Human Reproduction* Vol.21, No.4 pp 870-879.

Shimomura Y., Ando H., Furugori K., Kajiyama H., Suzuki M., Iwase A., Mizutani S. and Kikkawa F. (2006) Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation, *Molecular Human Reproduction* Vol.12, No.8 pp. 491–495.

Shiozaki .H, Oka H Inoue M, Tamura S, Monden M.(1996) E –cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *77:1605-13.*

Sırmalı Ş. (2006) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ders Notları, 2006. <http://w20.uludag.edu.tr/~sahinas/dersnotlari.htm>

Srinivasan, K.R., Blesson, C.S., Fatima, I., Kitchlu, S., Jain, S.K., Mehrotra, P.K., Dwivedi, A. (2008) Expression of $\alpha\beta 3$ integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *General and Comparative Endocrinology*, accepted 26 october .

Sugihara K., Sugiyama D., Byrne J., Wolf D.P. , Lowitz K.P., Kobayashi Y., Kabir-Salmani M., Nadano D., Aoki D., Nozawa S., Nakayama J., Mustelin T., Ruoslahti E., Yamaguchi N., and Fukuda M.N. (2006) Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. *Cell Biology, PNAS*, 104 (10):3799-3804.

Sunder S, Lenton E. (2000) Endocrinology of the Peri- Implantation Period. *Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 14 (5): 789-800.

Sunfeldt K, Piontkewitz Y, Billing H, Hedin L (1997) E- cadherin – catenin complex in the rat ovary: cell specific expression during folliculogenesis and luteal formation. *Int J Cancer* 74:275-80.

Susan J.K. (2000) Molecular Interactions at the Maternal-Embryonic Interface During the Early Phase of Implantation. *Sem Reproductive Med*, 18 (3): 237-253.

Suzuki N, Nakayama J, Shih I-M, Aoki D., Nozawa S., Fukuda M.N. (1999) Expression of trophinin, tastin, and bystin by trophoblast and endometrial cells in human placenta. *Biol Reprod*, 60:621–627.

Suzuki N, Nadano D, Paria BC, Kupriyanov S, Sugihara K, Fukuda M.N. (2000) Trophinin expression in the mouse uterus coincides with implantation and is hormonally regulated but not induced by implanting blastocysts. *Endocrinology*, 141:4247–4254.

Suzuki et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:5027-5032.

Şahin H. (2007). Ektopik (dış) gebelik, abortus (missed, komplet veya inkomplet) ve terapötik küretaj olgularında endometriyal adhezyon moleküllerinin immunohistokimyasal yöntemle karşılaştırılması. Danışman: Ergür S. Uzmanlık Tezi. Danışman: Doç. Dr. Ali Rüştü Ergür, GATA.

Tabibzadeh S. (1992) Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 7: 876-882.

Takeichi M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator *Science* 251:1451-5.

Tan Y., Tan D., He M, Gu M., Wang Z., Zeng G., Duan E. (2005) A Model for Implantation: Co-culture of Blastocysts and Uterine Endometrium in mice. *Biol Reprod*, 72(3):556-61.

Tekelioğlu, M.(1995) İnsanm gelişmesi ve Üremesi (Hekimlik Embriyolojisi). Erkeđin ve kadının cinsiyet hücrelerinin gelişme ve olgunlaşmaları. DuMat Ofset Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti., Ankara ,s.24-50.

Van Mourik M. S.M, Macklon N.S. and Heijnen C.J. (2009) Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. Journal of Leukocyte Biology Volume 85, January.

Vigano P, Fusi F, Gaffuri B, Bonzi V, Ferrari A, Vignali M.(1998) Soluble intercellular adhesion molecule-1 in ovarian follicles: production by granulosa luteal cells and levels in follicular fluid. Fertil Steril 69:774-9.

Wever U.M, Damjanov A, Weiss J, Liotta LA, Damjanov I.(1986) Mouse endometrial stromal cell produce basement-membran components. Differentiation, 32:49-58.

Wijnhoven BPL, Dinjens WN, Pignatelli M. E. (2000) cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. Brithish J Surgery, 87:992- 005.

Yardımoğlu M. (1995) Folliküler atrezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1-2-3, 127-129.

Yoshimura Y, Shiokawa S, Nagamatsu S, Sawa H , Koyama N et al. (1995) Effect of beta 1 integrins in the process of implantation. Horm Res 44:36-41

Young B. and Heath J.W. Wheater's Functional Histology A text and Colour atlas. 4th ed. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone; 2000.p.341-371.

<http://bioweb.wku.edu/.../Images/Adherontypes.JPG>

<http://www.sanfordburnham.org/default.asp>. Michiko N. Fukuda Sanford-Burnham Medical Research Institute. 2010.

<http://www.tupbebek-genetik.com / icerik / laboratuar / embriyoloji/>

http://kugi.kribb.re.kr/.../BioCarta/h_integrinPathway/

www.biochemsoctrans.org/.../bst0321118f01.gif

5. ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- **Adı Soyadı** :ELİF GELENLİ
- **Doğum yeri ve tarihi** :BURSA 06.06.1985
- **Uyruğu** :T.C.
- **Medeni Durumu** :BEKAR
- **İletişim Adresi** :KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ A.D.
- **Telefonu** :0 262 3037309

2. Eğitimi

• ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2007-2010	Yüksek Lisans	Kocaeli Üniversitesi	Histoloji ve Embriyoloji A.D.
2003-2007	Lisans (Onur Dereceli)	Uludağ Üniversitesi	Biyoloji Bölümü
1999-2003	Lise	Bursa Gazi Anadolu Lisesi	Fen Bilimleri

- **Yabancı dili:** İNGİLİZCE

3. Unvanları

BİYOLOG

4. Mesleki Deneyimi

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	YER	BÖLÜM
2007- 2010	Yüksek Lisans Öğrencisi	Kocaeli Üniversitesi	Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji A.D.
2010- Halen	SBE Öğrenci Temsilcisi	Kocaeli Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
2006 Eylül-Kasım	Biyoloji Öğretmenliği Stajyer Öğrencisi	Çağfen Dershanesi	Biyoloji
2006 Temmuz-Eylül	Stajyer Öğrenci	Soranus Tüp Bebek Merkezi	Androloji Embriyoloji Biyokimya Lab.
2004 Temmuz-Eylül	Stajyer Öğrenci	Bursa Çekirge Devlet Hastanesi	Merkez Mikrobiyoloji ve Biyokimya Lab.

5. Bilimsel Etkinlikler

Gelenli E, Can E, Yazır Y, Yardımoğlu M, Keskin G. Comparison of effectiveness of dexamethasone, n-acetyl cysteine and piracetam compounds applied via intratympanic route after autotoxicity in hearing loss .Cell and Tissue Biology Research X. National Histology and Embriyology Congress(With Internatioanal Participants) T-12 Volume:2 No:1(S),May 2010 ISSN:1309 2375 (Sözlü sunum).

Yazır Y, Topdağ M, Gelenli E, Yardımoğlu M, Üstündağ E. The comparison of effectiveness of memantin, piracetam and dexamethasone treatments applied via intratympanic route against autotoxicity exposed cisplatin in rats. Cell and Tissue Biology Research X. National Histology and Embriyology Congress(With Internatioanal Participants) T-56Volume:2 No:1(S),May 2010 ISSN:1309 2375.

Pelin Coştur Bıyüksüz, Serdar Filiz, Birol Vural, Elif Gelenli, Süreyya Ceylan, Melda Yardımoğlu Yılmaz, Süheyla Gonca, Hakkı Dalçık. Kontrollü Ovaryen Stimülasyon Uygulanmış Sıçanlarda Sildenafil Sitratin Endometriyum Reseptivitesinde LİF ve Aktin Ekspresyonları Üzerine Etkisi. II. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi Bildiri ve Özet Kitabı. Ref. No:31;2009.

Filiz S, Gürsel SB, Bıyüksüz PC, Yörüker S, Gelenli E, Dalçık H The protective effect of various agents on radiotherapy induced small intestine injury: a histologic and immunohistochemical study. Cell and Tissue Biology Research Turkish Histology and Embryology Association 50 P-64 Volume 1/ 2008 Supplement.