

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**  
**Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof. Dr. Mehmet Çolakoğlu**

**ICSI-ET SİKLUSLARINDA ENDOMETRİUMA LOKAL HASAR**  
**AMACIYLA UYGULANAN BİYOPSİNİN İMPLANTASYON, GEBELİK**  
**VE CANLI DOĞUM ORANLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Zeynep Hafıza ÖZTÜRK İNAL**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı**  
**Doç. Dr. Hüseyin GÖRKEMLİ**

**KONYA**  
**ARALIK 2009**

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>6</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>47</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>52</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>58</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>67</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>68</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>69</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>70</b>

## GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir kontrasepsiyon (korunma) yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamaması durumudur. Üreme çağındaki çiftlerin % 10-15'i infertildir. Primer infertilite daha önce hiç gebelik oluşmamasını tanımlarken, sekonder infertilite daha önce gebelik oluşması ancak korunmasız ilişkiye rağmen yeni bir gebeliğin olmaması durumudur. Otuzlu yaşların sonundaki kadınlarda infertilite görülme oranı % 25'e ulaşırken, 40 yaşından sonra fertilitede azalma daha hızlı olur (1).

İnfertilite tedavisindeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler başarı oranlarının giderek artmasını sağlamıştır. Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT= Assisted Reproductive Technology, ART) insan üreme hücrelerinin (oosit ve sperm) vücut dışında fertilizasyonu ile embriyo elde edilmesini sağlayan yöntemlerin tümünü kapsar. Çiftlerin çocuk sahibi olabilme rüyalarını gerçekleştirmede gelişen bu teknolojiler önemli rol oynamaktadır.

Yardımcı üreme teknikleri; IUI (Intrauterin Insemination), IVF (In Vitro Fertilization), GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), ZIFT (Zygote Intrafallopian Transfer), PZD (Partial Zona Dissection), SUZI (Subzonal Insemination), TET (Tubal Embryo Transfer) ve POST (Peritoneal Oocyte and Sperm Transfer) gibi geliştirilmiş değişik yöntemleri içerir. İlk ve hala en sık kullanılan yöntem, IVF (In Vitro Fertilization) dir. Diğer yöntemler daha invaziv olup artık günümüzde kullanım alanları azalmaktadır. Ek olarak spermin elde edilme tekniği ve

sperm enjeksiyonu şimdi YÜT'nin bir başka komponentidir. Tek spermin oosit stoplazması içine enjeksiyonu, ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection ); testislerden sperm aspirasyonu, TESA; testislerden sperm ekstraksiyonu, TESE; mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu, MESA; yardımcı embriyo tutunma tekniği (assisted hatching) ve implantasyon öncesi genetik tanı (PGT) geliştirilen diğer teknolojilerdir.

IVF, eksojen gonadotropinler kullanılarak yapılan kontrollü ovaryan hiperstimulasyon (KOH) ile başlar. Sonrasında gelişen folliküller transvajinal ultrasonografi eşliğinde toplanır. Folliküllerden elde edilen oositler laboratuvar ortamında eşten alınan uygun spermiler ile fertilize edilir. İşlem sonucunda elde edilen embriyolar transservikal yoldan anne adayını uterusuna transfer edilir. Bugün itibariyle tüm dünyada yaklaşık 3 milyon çocuk yardımcı üreme teknikleri kullanılarak dünyaya gelmiştir (2).

Yardımcı üreme tekniklerinin tarihsel gelişimini inceleyecek olursak; ilk embriyo transferi çalışmaları 1890'larda yapılan tavşan deneyleriyle başlamıştır. 1949'dan itibaren çiftlik hayvanlarında embriyo transferi çalışmaları yapılmış, hayvanların genetik potansiyellerinin artırılması düşünülmüştür. Bugün, bu amaçla in vitro fertilizasyon dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermiyumun, fertilizasyon yeteneği için önce dişi genital organlarında kapasitasyon safhasını geçirmesi gerektiği anlaşıldıktan sonra tavşanlarda ilk in vitro fertilizasyon yapılmıştır. 1969'un sonlarında Dr. Edwards ve arkadaşları, insan oositleriyle ilk başarılı in vitro fertilizasyonu gerçekleştirdiklerini açıklamışlardır. İlk IVF gebeliği 1976 yılında fizyolog Dr. Edwards ve jinekolog Dr. Steptoe tarafından gerçekleştirilen gebeliktir. Ancak oluşan gebeliğin ektopik gebelik olması talihsizliktir. Nihayet yaklaşık 21 yıl önce, Cambridge'de 1978 yılında yine Dr. Edwards ve Dr. Steptoe tarafından in vitro fertilizasyon yöntemiyle intrauterin bir gebelik sağlanmış, Louise Brown adında sağlıklı bir bebek dünyaya gelmiştir. Zamanla IVF tedavisinin GIFT, ZIFT, TET, ICSI gibi çeşitli modifikasyonları ortaya çıkmış, uygun hastalarda kullanıma girmiştir. 1983'de Dr. Trounson ve arkadaşları tarafından ilk kez donör oosit ve dondurulmuş embriyo kullanımıyla gebelik ve sonucunda doğum elde edilmiş, 1984'de ilk GIFT bebeği (Asch ve ark.) ve 1986'da (Devroey ve ark.) ilk ZIFT bebeği dünyaya gelmiştir.

Prof.Dr. Refik Çapanoğlu ve ark. Ege Üniveristesi'nde 1988 yılında Türkiye'nin ilk tüp bebek merkezini açmaları ve çalışmalarının 18 Nisan 1989 tarihinde aynı merkezde Türkiye'nin ilk tüp bebeğinin dünyaya gelmesini sağlaması ile ülkemizde bu teknoloji hızla ilerlemiştir.

Tek hücreden organizmaya giden yolda karşımıza pek çok engel çıkmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalar, yardımcı üreme teknikleri ile oluşturulan gebeliklerin ve canlı doğumların oranlarını yükseltmeye yöneliktir. Tüm basamaklarda tekniğe uygun işlem yapılmasına rağmen gebelik elde edilemeyen ve nedeni açıklanamayan vakalar vardır. Ancak gelişen teknoloji bize az da olsa bazı şansların kapısını açmıştır. Yapılan her yeni çalışma hala karanlık birçok yüzü bulunan infertilite sistemini anlamamız için bizlere ışık tutmaktadır. Tüm çalışmalar bilinmeyi ortaya çıkarmaya ve açıklamaya yöneliktir. Bu alandaki her yeni çalışma implantasyon ve gebelik oranlarını arttırmayı amaçlar.

Biz de çalışmamızda; Intrastoplazmik sperm injeksiyonu – embriyo transferi (ICSI – ET) uygulanması planlanan hastalara kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) siklusundan bir önceki siklusa, endometrial biyopsi yardımıyla endometriumda lokal hasar oluşturulmasının implantasyon ve gebelik oranlarını artırmada etkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Çalışma grubundaki hastalara, ICSI- ET planlanan KOH siklusundan bir önceki siklusun luteal fazında bir hafta aralıklarla iki kez endometrial biyopsi uygulanarak endometriumda lokal hasar oluşturulmuştur. Araştırmamız Ocak 2008 – Mart 2009 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne başvuran hastalarda prospektif randomize kontrollü çalışma olarak yapılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Primordial germ hücreleri; vitellus kesesi, allantois ve barsak arka kısmı endoderminden kaynaklanmaktadır. Altı-sekizinci gestasyonel haftalarda germ hücreleri hızla mitozla çoğalarak ovarian farklılaşmayı başlatırlar. Onaltı-yirminci gebelik haftalarında yaklaşık 6-7 milyon oogonyuma ulaşılır. Bu noktadan sonra germ hücreleri menapoza dek sürekli olarak azalır. Onbir-onikinci haftada oogoniyalar 1. mayotik bölünme ile oositlere dönüşürler ve profazda beklerler. Tek bir ovum 2. mayotik bölünme ile oluşur. Birinci mayotik bölünme tam ovulasyondan önce, ikincisi ise sperm penetrasyonu esnasında oluşur. Fazla genetik materyal her mayotik bölünmede oluşan polar body (cisimcik) ile atılır (1,3).

İlk mayotik bölünme sonrası oosit oluşuktan sonra germ hücre sayısı, doğumda 1-2 milyona ve puberte başlangıcında 300-500 bine düşmektedir. Yaşamın geri kalan 35-40 yılında sadece 400-500 oosit gelişecek, geri kalanı atreziye uğrayacaktır. Otuzyediyedi-otuzsekiz yaşına dek folliküler kayıp oranı aynı kalacak menopoz öncesi 10-15 yıl ise kayıp oranı artacaktır (3). Menapozda ise binden az sayıda follikül kalacaktır.

İnfertilite; çiftin bir yılı aşan sürede düzenli ve korunmasız cinsel ilişkisine rağmen gebelik olmaması olarak tanımlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde çiftlerin % 15 oranında infertil oldukları bilinmektedir. Popülasyon demografisindeki değişiklikler biyolojik olarak daha az aktif olan ve yaşı ilerlemiş kadınların da gebe kalmaya çalışmasına yol açmaktadır.

Fertilitenin yaşla beraber azaldığı gerçeğinin artık çok iyi bilinmesi nedeniyle infertil çiftler tüm tedavi seçeneklerini denemektedirler.

- Kadınlarda eğitim ve kariyere yönelik çalışma isteğinin artması ve bununla ilişkili olarak çocuk doğurma yaşının ilerlemesi,
- Geç yapılan evlilikler ve boşanma sıklığının artması,
- Kontrasepsiyon teknikleri ve aile planlaması hizmetlerinin gelişmesi,
- İnfertiliteye neden olabilen cinsel yolla bulaşan hastalıkların artışı,
- Üreme fonksiyonlarında bozukluğa ve anormal ovulasyona neden olan obezitenin yaygınlaşması

fertilitenin popülasyonlar genelinde azalmasına yol açmıştır.

Kadın fertilesi ve yaşlanma arasındaki ilişki infertilite nedenleri arasında en iyi tanımlanmış olanıdır. Kontrasepsiyonun yasaklandığı doğal yaşamı seçen topluluklarda yapılmış çalışmalar yaş artışı ile fertilitenin azaldığını gösteren en iyi kanıtlardır (4). Normal bir çiftin ovulatuvar siklusta gebe kalma şansı % 30'dur.

- 3 ayda bu oran % 57,
- 6 ayda % 72,
- 1 yılda % 85,
- 2 yılda % 93'e çıkmaktadır (5).

Gözlemsel çalışmalardan ve kontrasepsiyon kullanmayan doğal popülasyonlardan elde edilen verilere göre ;

- 20-24 yaşlarında fertilitate en yüksek seviyesindedir,
- 25-29 yaş arası % 4-8 oranında fertilitate azalma başlar,
- 30-34 yaş arası % 15-19 oranında,
- 35-39 yaş arası % 26-46 oranında,
- 40 yaş sonrası ise % 95 oranında doğurganlık kapasitesi azalmaktadır (4,5).

Son 20 yılda infertilite tanısında ve tedavisinde pek çok yenilik olmuştur. In Vitro Fertilizasyon ve diğer yardımcı üreme tekniklerinin ortaya çıkışı ve uygulamaya konması tıp dünyasında yeni bir çağ olarak nitelendirilmiştir. Çeşitli iletişim organları sayesinde bu yeni tedaviler, çare arayan infertil çiftlere duyurulmuştur.

Yardımcı üreme teknikleri başlangıçta ağır tubal faktörü olan hastalara uygulansa da günümüzde her türlü fertilité probleminde kullanılabilir.

İnfertilite, toplumun % 10-15'ini etkilemektedir. İnfertilite nedenleri, toplumlar ve yaş grupları arasında az da olsa farklılıklar gösterir. İnfertil çiftlerin nedene yönelik gruplandırılması şu şekilde olmaktadır (6).

- % 15-20 ovulatuvar faktör,
- % 30-40 tubal faktör,
- % 45- 50 erkek faktörü,
- % 10 açıklanamayan infertilite.

Sadece kadın faktörü incelendiğinde, % 40 oranında ovulatuvar disfonksiyon, % 40 oranında tubal ve pelvik patolojiler, % 15-20 oranında ise açıklanamayan infertilite şeklindedir (6,7,8).

## **İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

### **Anamnez**

Kadında yaşın ilerlemesiyle over rezervi ve antral follikül sayısında azalma oluşur, overin gonadotropinlere verdiği kötü cevap nedeniyle tedavi başarısı olumsuz etkilenir. ART ile elde edilen başarı oranları yaş arttıkça azalmaktadır. Yaşlı kadınlarda genç yaştakilere göre elde edilen oosit sayısı ve gelişen embriyo sayısı az, implantasyon şansı düşüktür (8,9). Taze embriyo ve oositlerin kullanıldığı ART sikluslarında gebelik ve canlı doğum oranları 32 yaşından önce çok az değişiklik göstermekle birlikte bu yaştan sonra düzenli olarak azalır. Embriyo transferi başına canlı doğum oranları;

- 35 yaş altında % 41,1
- 35-37 yaşlarında % 35,1
- 38-40 yaşlarında % 25,4
- 41-42 yaşlarında % 14,5 olarak bildirilmiştir (9,10).

Bu nedenle hastanın yaşı bilinmeli ve gebelik beklentisinin yaşa bağlı olasılığı düşünölmelidir.



Yaşlanmanın uterus üzerine olumsuz etkisi yok denilebilir. Yaşla birlikte benign (iyi huylu) uterus patolojilerinde (leiomyom, endometrial polipler, adenomyozis) artış olmakla birlikte kadınlarda fertiliteye olumsuz etkisini gösteren çok az kanıt vardır (11,12,13,14).

İnfertilitenin süresi uzadıkça çiftin organik veya fonksiyonel problemleri olduğu düşünülerek değerlendirilir. Açıklanamayan infertilite gruplarında sıklıkla uzun infertilite zamanı vardır. Daha önce elde edilmiş bir gebelik varlığı, kadında ve erkekte o dönem içinde anatomik ve hormonal sistemin yeterliliğini gösteren bir bulgudur.

Menstruasyonun düzenli olması ovulasyonun normal olduğuna işaret eder. Düzensiz veya seyrek menstruasyon dönemleri, ovulatuvar bozukluk olarak değerlendirilir. Dismenore, disparoni, fokal hassasiyet ve kul-de-sac nodularitesi peritoneal patolojileri ile endometriozisi düşündürür.

Geçirilmiş operasyon ve/veya pelvik inflamatuvar hastalık, septik abortus, rüptüre apandisit, geçirilmiş ektopik gebelik, abdominal myomektomi veya adneksiyal cerrahi öyküleri tubal veya peritoneal patolojilerin olabileceğini düşündürür.

Ovulatuvar problemlere yol açabilecek tiroid hastalıkları, diabetes mellitus gibi sistemik hastalıklar ve galaktore, hirsutismus gibi semptomlara neden olabilecek endokrin bozukluklar sorgulanmalıdır. Daha önce gebelik oluşup oluşmadığı değerlendirilir. Sekonder infertilitede tedavi daha kolay ve prognoz daha iyidir. Daha önceki infertilite tedavileri ve sonuçları, uygulanan ilaçlar ve bu ilaçlara olan over yanıtı değerlendirilir. Sigara ve alkol kullanımı üreme organ fizyolojisini olumsuz etkilemektedir. Bunların sorgulanması ovulatuvar problemlere yaklaşım açısından önemlidir.

### **Fizik Muayene**

Tiroid muayenesinde saptanacak patolojiler (tiroid bezinde genişleme, nodül, hassasiyet) veya memede sekresyon (galaktore) tespit edilmesi endokrin problemler açısından uyarıcı olur (13). Hirsutismus varlığı ve derecesi hiperandrojenizm takibi açısından önem taşır (12).

### **Jinekolojik Muayene**

Jinekolojik muayenede saptanacak organik veya anatomik bozukluklar infertilitenin açıklanmasında rol oynayabilir. Rutin jinekolojik muayeneye ek olarak servikal osdan uterin kaviteye geçiş, internal osdan fundusa kadar olan mesafenin belirlenmesi uterus hakkında

bilgi edinilmesini sağlar. Vajinal enfeksiyon varlığı ve servikal erezyonlar jinekolojik muayene esnasında değerlendirilir. Pap smear testi ile serviks, premalign lezyonları açısından araştırılmalıdır. Hastanın infertilite tedavisi planlanırken tespit edilen vajinal enfeksiyonlar tedavi edilmelidir. Klamidyal enfeksiyonların, yardımcı üreme tekniklerinde başarı şansını düşürdüğü ve erken gebelik kaybı riskini arttırdığı çalışmalarla gösterilmiştir (15,16).

### **Ultrasonografi**

İnfertilite değerlendirilmesinde transvajinal ultrasonografi, uterus ve overlerin en yakın mesafeden görüntülenmesi için kullanılır. Uterus boyutları, pozisyonu, kontur düzeni ve myometriumun homojenitesi, eğer varsa myomatöz yapıların endometrium kavitesi ile ilişkisi ve boyutları incelenir. Endometrium kalınlığı, yapısı, siklusun fazı ile uyumu, intrakaviter patoloji (endometrial polip, submuköz myom) varlığı değerlendirilir (17,18). Her iki adneksiyal alan, patoloji açısından görüntülenir. Overlerin yerleşimi, antral folliküllerin sayısı, kistik veya solid oluşumlar değerlendirilir. Erken proliferatif fazda yapılan transvajinal ultrasonografi ile overlerde gözlenen antral follikül sayısı, overlerin gonadotropinler ile uyarıldığında vereceği cevabı belirlemektedir. Her iki overde toplam 15 ve daha üzeri antral follikül izlenirse overlerin cevabının iyi olacağı öngürülür. Her iki overde toplam 5 veya daha az antral follikül izlendiği durumda ise gonadotropin uyarısına over yanıtı oldukça kısıtlı kalmaktadır (19). Pelvisin ultrasonografik incelenmesinde patoloji tespiti halinde, histereskopi ve laparoskop gibi cerrahi işlemler gerekebilir.

### **Laboratuvar incelemeleri**

Hipotalamus-hipofiz-over aksının fonksiyonlarının değerlendirilmesi, over rezervinin taranması amacıyla menstruel kanamanın 2.-3. gününde Folliküler Stimülan Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH), östradiol (E<sub>2</sub>) ve inhibin B seviyeleri belirlenir. Bazal serum FSH seviyelerinin >15-20 IU/l seviyesinde bulunması fertilitenin azalmasıyla ilişkilidir (20). FSH seviyelerinin bir kez bile yüksek tespit edilmesi başarıyı azaltmaktadır. 2. gün serum E<sub>2</sub> değerlerinin >50 pg/ml olması ovulasyon indüksiyonunda kötü prognozla ilişkilidir. Yüksek E<sub>2</sub> seviyeleri, artmış FSH sonucudur. Artmış E<sub>2</sub> düzeyinin ise FSH'ı yalancı şekilde baskılayabileceği akılda tutulmalıdır. Bu nedenle E<sub>2</sub> ve FSH birlikte değerlendirilmelidir. İnhibin B overdeki granuloza hücrelerince menstruasyonun folliküler fazında üretilir ve FSH üretimini baskılar. FSH'nın dolaşımında artması azalmış inhibin B seviyesi ile ilişkilidir. Siklusun 3. gününde inhibin B > 45 pg/ml olması iyi prognoz belirtisidir (20,21).

Ayrıca prolaktin, Tiroid Stimulan Hormon (TSH), serbest tiroksin ( $fT_4$ ) gibi aksın çalışmasına etkisi olabilecek hormon düzeyleri değerlendirilir. Antimüllerian Hormon (AMH) düzeyi menstruel siklus zamanından bağımsız olarak antral follikül sayısı hakkında bilgi verebilir. Hirsutismus saptanan olgularda Dihidroepiandrostenedion-sülfat (DHEA-S), serbest testosteron, 17-OH progesteron, androstenedion düzeyleri incelenir (20).

Hematolojik testlerden kan grubu belirlenmeli ve tam kan sayımı yapılmalıdır. Mevcut enfeksiyon ve bağışıklığın önceden tanımlanması için; HbsAg, Anti-Hbs, Anti-HCV, Anti-HIV, Rubella IgG (ve/veya IgM), Toksoplazma IgG (ve/veya IgM) gibi serolojik testler yapılmalıdır (20).

### **Histerosalpingografi ( HSG )**

Uterin kavite içerisine serviksten bir kateter ile kontrast madde verilerek X-ışınları yardımıyla uterin kavite ve tubaların görüntülenmesine dayanan infertilite araştırmasında temel tanı yöntemidir. İnfertiliteye neden olabilecek uterin kavitenin konjenital anomalilerini tespit etmede ve organik patolojilerin tanımlanmasında kullanılabilir. Müllerian anomaliler, intrakaviter kitle varlığı (submüköz ya da intrakaviter myom, polip), intrauterin sineşi ve adezyonların varlığı infertilitenin nedenini ortaya koyabilir. Tüplerin açık ya da tıkalı oluşu, blokajın yeri değerlendirilmektedir. İşlem menstruasyon bitiminden sonraki 2-5. günlerde yapılmalıdır. Gebelik şüphesi, aktif vajinal kanama, pelvik enfeksiyon varlığında yapılması kontrendikedir.

İnfertil vakaların % 30-50'sinde fallop tüpleri tek ya da iki taraflı tıkalı tespit edilmektedir (20). HSG çekiminde floroskopi altında her iki fallop tüpünden kontrast madde geçişinin gözlenmesi ve kontrast maddenin fimbrial çıkış sonrası dağılımı, tubal faktörün değerlendirilmesinde önem taşımaktadır. Pelviste belli bölgelerde kontrast maddenin göllenmesi adezyonları düşündürülebilir. İnfertil hastalardaki tubal tıkanıklık varlığı tedavi şeklinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Laparoskopi ile korelasyonu % 60-70 oranındadır (22).

### **Histerosonografi ( Salin İnfüzyon Sonografisi )**

Uterin kaviteye ait patolojilerin non-invaziv olarak görüntülenmesi yöntemidir. Uterin kavite içerisine ince kateter yardımıyla steril serum fizyolojik verilerek kavite duvarlarının birbirinden ayrılması sağlanır. Ultrasonografi eşliğinde kavitedeki ekojeniteler (endometrial polip, submüköz myom, sineşiler, uterin anomaliler) değerlendirilir. İşlem menstruasyon

bitiminde folliküler fazda yapılmalıdır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgularda kavitenin değerlendirilmesi önerilmektedir (23).

### **Histeroskopi**

Submüköz myom, endometrial polip, adezyon, septum gibi intrauterin anomaliler infertil çiftlerde % 10-62 oranında saptanmaktadır. Bu patolojiler, endometrial reseptiviteyi ve implantasyonu olumsuz etkilemektedir. Kavitedeki patolojilerden şüphelenildiğinde kavitenin net değerlendirilerek teşhisinde ve teşhis edilen patolojilerin tedavisinde altın standarttır. Endoskopik cerrahi, direkt olarak intrauterin patolojinin boyutunu, şeklini ve yerleşim yerini göstermektedir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı veya erken gebelik kayıpları olan olgularda patolojinin değerlendirilmesini ve çözümünü sağlayan bir yöntemdir (24).

### **Laparoskopi**

Servikal yoldan verilen metilen mavisinin tubalardan geçişinin değerlendirilmesinin yanı sıra, myomlar, adezyon, tubal hasar, endometriozis gibi pelvik patolojilerin tanısında, uterus, overler, tüplerle ilişkili diğer anomalilerin tanınması ve aynı zamanda tedavisine olanak sağlayan bir yöntemdir. Uterus, ön ve arka cul-de sac, ovarian yüzeyler, ovarian fossalar ve tüpler gözlemlenir. Tubal faktörlerin değerlendirilmesinde laparoskopi kesin tanımlayıcı girişimdir. Servikal yoldan verilen metilen mavisini ile tubaların açık veya tıkalı olup olmadığı gözlenir. İnfertiliteyi etkileyen ve HSG ile tespit edilemeyen hafif derecede distal tubal hastalıklar (fimbrial tıkanıklık, fimosis), pelvik veya adneksiyal adezyonlar ve endometriozis gibi patolojilerin tanısı ve tedavi olanaklarını da sağlar. Ancak invaziv bir yöntem olması nedeniyle infertil çiftlerin değerlendirilmesinde ilk tercih tanı yöntemi olmamalıdır (25).

### **Over rezervinin değerlendirilmesi**

**FSH:** Over rezervi, fertilize olma kapasitesinde oosit üretebilme gücüdür. Erken folliküler fazdaki (siklusun 3. günü) serum FSH konsantrasyonu, en basit ve en sık uygulanan ovaryan rezerv ölçüm yöntemidir (26, 27). FSH değeri ve FSH/LH oranı yükseldikçe IVF için maksimum E<sub>2</sub> düzeyi, toplanan oosit sayısı, gebelik ve canlı doğum olasılığı azalmaktadır (26, 27, 28). Birçok laboratuvar 3. gün serum FSH değerini 10-15 IU/L üzerinde anormal kabul etmektedir. FSH değerleri sikluslar arasında dalgalanma gösterebilir (28, 29). FSH'nın en az bir kere yüksek saptanması zayıf over rezervi yönünden anlamlı kabul edilir (30).

**E<sub>2</sub> (Östradiol):** Erken folliküler fazda östradiol düzeyi de over rezervi hakkında bilgi verir. E<sub>2</sub> seviyesinin <45 pg/ml olması beklenir. FSH gibi 3. günde E<sub>2</sub> düzeyinin yüksek olması (80 pg/ml üzeri) düşük cevabı öngörür (31). Erken E<sub>2</sub> artışı aynı zamanda FSH değerini baskılayarak artmış değerleri maskeleyip over rezervi sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açabilir. Bu nedenle 3. gün her iki değer yüksek olması over yanıtının kötü olacağını göstergesidir. Önceki siklustan kalan persiste kistik bir yapı E<sub>2</sub>'nin yüksek seviyede ölçülmesine neden olabilir (32,33).

**İnhibin-B:** Granüloza hücrelerinden salgılanan İnhibin-B'nin FSH salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. İlerleyen yaş ve azalan over rezervi ile paralel olarak inhibin-B seviyesi azalır. 45 pg/ml altında saptanan olgularda gebelik oranlarının düşük, tedavi iptal riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir (31,34).

**AMH:** Antimüllerian Hormon ( Müllerian İnhibiting Faktör ), dimerik bir glikoproteindir. Erkekte fetal seks farklılaşması döneminde sertoli hücrelerinde üretilir ve müllerian kanalların regesyona neden olur (35). Ağırlığı 72 kDa olup disülfid bağlarıyla bağlanmış iki monomerdendir oluşur. AMH; inhibin ve aktivin glikoproteinlerinin dahil olduğu Transforming Growth Faktör-β ailesindedir. AMH'un büyüme sırasında, preantral ve erken antral folliküllerden salındığı gösterilmiştir (36,37).

Kadınlarda 6 mm'den küçük antral folliküller AMH salgılar. Over aktivitesi üzerine düzenleyici etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda ART sikluslarında elde edilen oosit sayıları ile serum AMH düzeyleri orantılı bulunmuştur. Over rezervi belirlemede yeni kullanıma giren ancak rutin uygulamaya henüz girememiş bir parametredir (38,39).

**Klomifen sitrat tarama testi:** CCCT (Clomiphene Citrate Challenge Test/Klomifen Sitrat Tarama Testi) ilk olarak 1987'de Navot ve ark. tarafından 35 yaş ve üzeri kadınlarda over rezervini değerlendirme yöntemi olarak tanımlanmıştır

Menstruasyonun 3. günü FSH ve E<sub>2</sub> ölçümü yapılır. Takiben 5-9. günleri arasında 100 mg/gün klomifen sitrat verilir. FSH ve E<sub>2</sub> ölçümü 10. günde tekrarlanır. Klomifen sitrat ile follikül gelişiminin uyarılmasına cevap olarak follikülden E<sub>2</sub> salgılanması beklenir. Artan E<sub>2</sub>'nin, FSH'yı baskılayarak artışını engellemesi gerekmektedir. Onuncu günde FSH'nın bazal değerlere göre artması veya E<sub>2</sub> değerinde anlamlı yükseliş olmaması over rezervinin düşük olduğu şeklinde değerlendirilir. Üçüncü gün FSH değeri normalden yüksek ve anormal klomifen sitrat testi sonucu, over rezervinin azaldığını düşündürür (40).

GnRH analogu stimulasyon testi (GAST): Over rezervi iyi olgularda, GnRH analogu uygulamasını takiben 4-6 gün içinde 'flare etki' olarak bilinen FSH ve LH artışına yanıt olarak serum E<sub>2</sub> düzeyinde artma beklenir. GAST testinin over rezervi belirlemede diğer testlere üstünlüğü bulunamamıştır. Uygulamadaki zorluk ve pahalı olması nedeniyle pratik kullanımda sıklıkla yer almamaktadır (41).

**EFORT (Exogenous FSH Ovarian Reserve Test/ Eksojen FSH Ovaryan Rezerv Testi):** IVF sikluslarında iyi ve düşük cevaplı hastaların belirlenmesi için bir tarama testi olarak geliştirilmiştir. Siklusun 3. günü serum FSH ve E<sub>2</sub> konsantrasyonları ölçüldükten sonra, 300 IU FSH enjeksiyonu yapılır. Enjeksiyondan 24 saat sonra E<sub>2</sub> düzeylerindeki değişiklik incelenerek değerlendirilir. E<sub>2</sub> değerinde % 20 ve üzeri artış, cevabın iyi olduğunu gösterir (42).

Ultrasonografik over ölçümleri: Over fonksiyonlarının gerilemeye başlaması ile birlikte, erken folliküler fazda ultrasonografik olarak tanımlanabilen 2-10 mm arasındaki antral folliküllerin sayısındaki azalma, FSH konsantrasyonlarındaki artıştan daha önce ortaya çıkabilir. Tomas ve ark. ovaryan stimülasyon öncesi follikül sayısı ile over volümünün korele olduğunu bildirmişlerdir (43). Ultrasonografi ile antral folliküllerin sayımı, IVF programlarında toplanacak oositlerin sayısının tahmininde yardımcı olabilir. Her iki overde toplam 15 ve üzeri antral follikül varsa bu overler uyarıya iyi cevap vermekte, her iki overde toplam 5 veya daha az follikül varsa over cevabı kötü olmaktadır (44).

### **Sperm yeterliliğinin değerlendirilmesi**

Kötü semen kalitesi infertil çiftlerin % 20'sinde infertilitenin tek nedenidir. % 50-60 kadarında da nedenlerden birisidir. En az 4 hafta ara ile 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yöntemi ile elde edilen iki ayrı spermiogram incelenmelidir. İnfertil erkeklerin % 25-40 kadarında herhangi bir neden gösterilememektedir. % 6.2 infertil erkekte kromozomal anomaliler görülmektedir. Sperm sayısı <10 milyon/ ml olan subgruplarda bu oran % 11'e çıkmaktadır. Varikosel, infertil erkeklerde en sık tespit edilen bulgudur. Spermatik venlerde valvüler yetmezlik veya yokluğu halinde oluşur, % 90 sol testiküler vendedir. İnfertil erkeklerin % 40-50'sinde görülmektedir. Semen kalitesini bozar (45,46). Normal değerleri belirlemede Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterleri kullanılır ( Tablo 1,46,47 ).

**Tablo 1. Semen analizi referans değerleri (WHO)**

Hacim	1,5-5,0 ml
pH	> 7.2
Viskosite	<3 (0-4 arasında)
Sperm konsantrasyonu	>20 milyon /mL
Total sperm sayısı	>40 milyon /ejakülat
Motilite yüzdesi	>% 50
İleri hareket	>2 (0-4 arası )
Normal morfoloji	> % 50 normal % 30 normal > % 14 normal ( Kruger )
Yuvarlak hücre	<5 milyon/mL
Sperm aglütinasyonu	<2 ( 0-3 arasında )

Sınırdaki semen anormalliğinde IUI için sperm hazırlanması anormalliği düzeltebilir ancak minimum 10 milyon motil sperm olması gerekir. İlk IVF çalışmalarında oositin, 2-6 milyon sperm ile inseminasyonu yapıyordu. Ciddi oligospermide (Tablo 2) bu sayı sınırlayıcı idi. Gelişen tekniklerle çok ciddi erkek infertilitesinin ICSI yöntemiyle tedavi edilebileceği gösterilmiştir (48).

Faz mikroskopu altında Makler sayım kamerasına 5 µl semen konarak x20 büyütme altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayılır ve  $10^6$  ile çarpılarak mikrolitredeki sperm sayısı belirlenir. Normal sperm konsantrasyonu  $>20 \times 10^6 / \text{ml}$  ve totalde  $>40 \times 10^6 \text{ ml}$ 'dir. Semen analizi normal sınırlarda olan erkeklerde endokrinolojik bozukluklar çok nadirdir. Ejekülasyon olmaması (aspermi) veya ejakülat hacminin azlığı; retrograd ejakülasyonu, ejakülatuar kanal tıkanıklığını, hipogonadizmi veya konjenital bilateral vas deferens agenezisini akla getirir (49).

**Tablo 2. Sperm terminolojisi**

Normospermi	Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
Oligospermi	Sperm konsantrasyonunun $<20 \times 10^6/\text{ml}$ olması
Astenozospermi	İleri progresif sperm sayısının (A ve B kategorisi) $<\% 50$ olması veya A kategorisinde hareketin $<\% 25$ olması
Teratozospermi	Normal baş morfolojili sperm oranının $<\% 30$ olması
Oligoastenoteratospermi	Her üç değişkenin bozukluğu
Azospermi	Ejekülatta spermatozoa olmaması
Aspermi	Hiç ejakülat elde edilememesi

Sperm morfolojisi, sperm fonksiyonunu gösteren en iyi parametredir. WHO kriterlerine göre normal değer  $>\% 30$  iken, Kruger strict kriterlerine göre normal değer  $>\% 14$  olmalıdır (Tablo 1). Teratozospermi (Tablo 2) ICSI için bir endikasyondur.

**Tablo 3. Spermilerin motilitesi**

<b>+ 4 veya A</b>	<b>Hızlı doğrusal hareket</b>
<b>+3 veya B</b>	<b>Yavaş doğrusal hareket</b>
<b>+2 veya C</b>	<b>Yerinde hareket</b>
<b>+1 veya D</b>	<b>Hareketsiz</b>

Motil spermilerin toplam sperm sayısına oranı, yüzde olarak motiliteyi verir. Total progresif motil spermier (TPMS), ileri hareket eden spermiereri kapsar. Normal sperm konsantrasyonunun  $>\%50$  'si motil ve bu değerin  $\% 25$ 'i progresif (+4, +3) olmalıdır (Tablo 3). Konsepsiyon ihtimali motilitenin  $\% 60$ 'a yaklaşmasıyla artar (49).

Ejekulattan çok az veya hiç sperm elde edilemediği zaman diğer sperm elde etme teknikleri IVF veya ICSI için kullanılır.

### **Mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu ( MESA)**



Konjenital bilateral vas deferens yokluğu veya düzeltilemeyen tıkanıklıkları olan olgularda mikrocerrahi yolla sperm elde etme yöntemidir.

MESA yönteminde; lokal veya genel anestezi uygulandıktan sonra skrotum üzerine küçük insizyon yapılır, tunika vajinalisler açılarak epididimisler ortaya konur. Operasyon mikroskopu ile 8-15 büyütme altında mikrocerrahi yapmaya uygun makas yardımıyla epididimal tunika açılır, tıkalı epididimisin proksimal kısmındaki en fazla motil sperm taşıyan dilate tübüllere ulaşılır. Tübül içeriği aspire edilir. Elde edilen sperm değerlendrilir, immotil veya motiliteleri düşük ise proksimalden tekrar aspirasyon işlemi yapılır. Uygun sperm elde edilince hemostaz sağlanarak anatomiye uygun şekilde dokular kapatılır (50).

### **Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve aspirasyonu (TESA)**

Obstrüktif olmayan azospermide veya epididimal sperm aspirasyonu başarısız olan olgularda açık mikrocerrahi ile dondurma işlemi için perkutan biyopsi veya testis aspirasyonu ile sperm elde edilen yöntemlerdir.

TESE yönteminde; lokal anestezi uygulandıktan sonra önce skrotum sonra tunika vajinalis açılır. Tunika albuginea üzerine yapılan 2-3 mm'lik kesiden sıkılarak dışarı çıkartılan testis dokusu ince doku makası ile kesilerek pirinç tanesi büyüklüğünde parça elde edilir ve değerlendirilmesi için 1 ml HEPES'li yıkama mediumunun içine konur. Eğer sperm bulunamaz ise işleme testisin diğer bölümlerinden parça alınarak devam edilir. Sperm bulununca hemostaz yapılarak dokular anatomik yapılara uygun şekilde kapatılır (51).

TESA yönteminde; lokal anestezi uygulandıktan sonra testis dokusu bir elin iki parmağı arasında sıkıştırıldıktan sonra içine HEPES'li medium çekilmiş insulin enjektörü takılan 19-21 G'luk kelebek iğnesi ile testis içine girilir. Aspirasyon işlemi yapılır. Elde edilen materyal sperm varlığı yönünden incelenir (51,52).

### **İNFERTİLİTE NEDENLERİ**

Fertilite, üreme kapasitesine sahip olmaktır. Fekundabilite; bir menstruel siklusta gebe kalabilme olasılığı (0.22/ay) ve fekundite; bir menstruel siklusta canlı doğum elde edilebilme yeteneği (0.15-0.18 ay) olarak tanımlanmıştır. Yıllık % 85 gebelik oranı vardır. Çiftlerin yaklaşık % 10-15'i infertilite tanısı almaktadır. Gebelik, sağlıklı oosit ve sperm üretimi, üreme kanallarında gametlerin bir araya gelmesi, oluşan embriyonun uterin kaviteye ulaşarak endometriuma yerleşmesi sonucu gerçekleşir. Uzun süreli infertilitesi olan çiftlerde genelde

çok sayıda ve ağır patolojiler vardır. Aşağıdaki basamaklardan biri veya birkaçındaki problem infertiliteye neden olacaktır (52,53).

- Sperm, ovulasyon dönemlerinde servikte depolanmalı, fallop tüplerine ilerlemeli, oosit dölleme kapasitesine sahip olmalıdır (erkek faktörü).
- Düzenli matür oosit ovulasyonu olmalıdır (ovaryan faktör).
- Serviks spermi tutmalı, olgunlaştırmalı ve fallop tüplerine geçişi sağlamalıdır (servikal faktör).
- Fallop tüpleri oositi yakalamalı, sperm ve oluşan embriyonun transportunu sağlamalıdır (tubal faktör).
- Uterus ve endometrium oluşan embriyo için implantasyona hazır olmalıdır (uterin faktör).

## **ANATOMİK BOZUKLUKLARA BAĞIMLI İNFERTİLİTE**

### **Uterin Sebepler**

Konjenital ya da edinsel olup, tüm infertilite nedenlerinin % 2 - 5'ini oluşturmaktadır. Konjenital defektler; uterus, fallop tüpleri, serviks ve üst vajenin oluşumunu sağlayan müllerian kanalların komplet yokluğu ( Rokitansky – Küstner - Hauser Sendromu ), arkuat uterus, uterus septatus, vajinal septum gibi anomaliler olabilir. Özellikle sekonder infertilitede dilatasyon ve küretaj, zor doğum, intrauterin araç, geçirilmiş cerrahi sonrası endometrit, adezyon veya sineşi ( Asherman Sendromu ) ile endometrial kavitenin parsiyel ya da total tıkanıklığı oluşabilir. İntamural ve submüköz myomlar kavite basısı oluşturarak implantasyon bozukluğuna ve obstetrik komplikasyonlara neden olmaktadır (53, 54).

### **Servikal sebepler**

Servikal faktör ile ilişkili infertilite % 5 - 10 oranındadır. Serviks, sperm transportu ve kapasitasyonunda önemli görev alır. Servikal mukus ovulasyondan 24 - 48 saat önce değişerek, daha ince, sulu, asellüler, elastik, alkali hal alarak sperm transportunu kolaylaştırır. Sperm mukus etkileşimindeki anormallikler infertilitede servikal faktör olarak değerlendirilir (52, 53, 54).

### **Endometrial sebepler**

Endometrium, menstruel siklus boyunca hormonal sekresyonlara yanıt olarak değişir, embriyonun implantasyonu için hazırlanır. Endometriumun, progesteron yetmezliğine bağlı olarak luteal fazının desteklenmemesi sonucu implantasyon problemleri oluşur. Endometrial reseptivite açısından endometrial proteinlerin salınımındaki defekt, anormal integrin/ adezyon molekülleri, T hücre ve natural killer aktiviteleri, embriyotoksik faktörlerin sekresyonu, uterin perfüzyon anormallikleri endometrial sebepler arasında sayılabilir (55, 56).

### **Tubal Sebepler**

İnfertil çiftlerin % 30'unda tubal veya peritoneal faktörler tespit edilir. Proksimal ve distal tubal tıkanıklıklar, hidrosalpinks, pelvik adezyonlar, hafif - ileri endometriozis, önceki tubal cerrahi, pelvik inflamatuvar hastalık gibi nedenler tubal ve peritoneal faktörler arasındadır. Tubal durum, HSG veya laparoskopi ile değerlendirilir.

Distal tubal tıkanıklıklarda cerrahi başarı % 10 - 30 arasında değişmektedir. Bu oran IVF başarısından daha azdır. Ektopik gebelik oranı daha yüksektir. Tubal sterilizasyon yapılmış olgularda mikrocerrahi ile tekrar tubal ağızlaştırma mümkün olsa da kötü cerrahi prognoza sahip olup, cerrahi istemeyenlerde IVF cerrahi tedaviye alternatiftir (57).

Tespit edilen hidrosalpinkste tedavi seçenekleri drenaj, distal tubal fenestrasyon ile birlikte veya tek başına proksimal tubal ligasyon ve salpenjektomidir (58). Hidrosalpinksli hastalarda IVF - ET öncesi salpenjektominin gebelik ve doğum oranlarını arttırdığı randomize kontrollü çalışmalarla gösterilmiştir (59).

Periadneksiyal adezyonlar genelde infertilite ile ilişkilidir, adezyolizis sonrası gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir (60). Cerrahi sonrası spontan gebeliklerin çoğu 6-12. ayda olmaktadır, daha uzun beklemenin faydası yoktur. Özellikle kadın yaşı ileriye ve başka infertilite faktörleri varsa IVF tedavisine geç kalınmamalıdır.

Endometriozis etkin oosit tutulumunu, uygun oosit gelişimini veya erken embriyogenezi önleyerek, bozulmuş adneksiyal anatomi ve azalmış endometrial reseptivite ile kendini gösteren infertilite nedenidir. İleri evre endometriozisde konservatif cerrahiye takiben IVF uygun tedavidir. Hastalarda yaş ve eşlik eden infertilite nedenleri düşünülerek tedavi planlanır (61).

## **ERKEK FAKTÖRÜNE BAĞIMLI İNFERTİLİTE**

Erkek infertilitesi genelde sperm üretiminde azlık, sperm motilitesinin yeterli olmaması, sperm morfolojisinde anormallikler veya bu faktörlerin kombinasyonu şeklindedir. İnfertil çiftlerin % 30'unda tek nedendir. Kötü semen nedeni, tıbbi veya cerrahi düzeltilebilir bir bozukluk ise tedavi edilebilir, hafif ama önemli semen bozukluklarında intrauterin inseminasyon yapılabilir. Tedavisi mümkün değil ise, epididimden veya testislerden elde edilen spermler (MESA, TESA, TESE) ile IVF veya ICSI uygulaması seçenek olabilir.

IUI için en iyi sonuçlar total motil sperm sayısı > 10 milyon, normal morfoloji > % 14 ise oluşur. Bir milyondan az total motil spermde veya % 4 den az morfolojide nadiren gebelik sağlanır (62,63).

## **AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE**

Tüm değerlendirmelere rağmen kadın ve erkek için yapılan infertilite taramalarında herhangi bir neden saptanamamış gruptur. % 10-30 oranında görülür. Bu grupta tedavi seçenekleri bekleme tedavisi, klomifen sitrat, kontrollü ovaryan hiperstimulasyon, klomifen veya kontrollü ovaryan hiperstimülasyon ile birlikte intrauterin inseminasyon ve IVF olabilir. İlk basamak tedavide 3-6 siklus klomifen sitrat + IUI, ikinci basamakta gonadotropinler ile KOH + IUI, son seçenek IVF önerilmektedir (64,65).

Üç yıldan sonra spontan gebelik şansı düşüktür. Hastanın yaşı ileri ve over rezervi düşük ise, klomifen sitrat + IUI 3-4 siklus denenmiş ancak sonuç alınamamış ise IVF ile tedaviye devam edilmesi zaman kazanılması açısından değerlidir (66).

## **OVULATUAR BOZUKLUKLARA BAĞIMLI İNFERTİLİTE**

21-35 günde düzenli menstruasyonu olan kadınların çoğunda ovulasyon gerçekleşmektedir. Anovulasyon veya ovulasyon disfonksiyonu, menstruel siklus sıklığını ve süresini etkilemektedir. Oligomenorenin en sık sebebi polikistik over sendromu ( PKOS ) olup üreme çağındaki kadınların % 14'ünde bulunarak infertiliteye sık neden olabilmektedir. Anovulasyon ise amenore ile sonuçlanmaktadır. Primer amenore genelde gonad gelişim defektleri, Turner Sendromu (45,XOs) ile ilişkili olabilir. Sekonder amenore, en az 6 ay süre ile anovulasyon sonucunda menstruasyonun olmamasıdır. Ciddi endokrin disfonksiyonu yapan tiroid, adrenal, pituiter (hiperprolaktinemi) bezlerin hastalıkları neden olabilir. Ancak en sık prematür over yetmezliği ile karşılaşılmaktadır (67).

Ovulasyon varlığı için mid-luteal serum progesteron düzeyine bakılabilir. Folliküler fazda <1 ng/ml'dir. Beklenen menstruasyondan 7 gün önce 3 ng/ml düzeylerinde olması ovulasyon göstergesidir. 10 ng/ml düzeyi luteal faz eksikliğini gösterir, korpus luteumun progesteron ürettiğini gösterir (68,69).

Folliküler fazda yapılan dominant follikülün büyüme takibi, rüptür öncesi 18-25 mm boyutlarına dek izlenebilir. Follikülün takiplerde kaybolması ve douglas boşluğunda sıvı varlığı ovulasyonu gösterir (70,71,72). 48-50 saat süren kısa zamanlı LH artışı tespiti ile ovulasyon öngörülebilir. Ancak pratikte rutin kullanımında değildir. Progesteronun termojenik etkisinden yararlanarak vücut ısısı artışı takibiyle ovulasyon zamanı tespit edilebilir. 0.4-0.8 °C artış izlenir. Isı artışı 10 gün sürer (73). Siklusun 21-24. günlerinde yapılan endometrial biyopside sekretuar endometriumun bulunması ovulasyonu destekler (74).

Anovulasyon nedeniyle korpus luteum oluşmadığı ve progesteron üretimi gerçekleşmediği için anovulatar kadınlarda endometrium devamlı folliküler fazdadır, artmış östrojen uyarısıyla sürekli proliferasyon göstermektedir. Luteal faz yetmezliği olarak bilinen progesteron üretim defekti, endometriumu sekretuar faza getiremediği için implantasyona uygun ortam sağlayamaz, ovulatar disfonksiyon bağımlı infertilitedir (75).

Ovulasyon indüksiyonu, cerrahi yaklaşım ve IVF anovulasyon nedenli infertiliteye yaklaşım tedavileridir. Klasik ovulasyon indüksiyonu ile bu grupta 2 yılda % 71 oranında kümülatif gebelik elde edilebilir. Klomifen sitrat ilk seçenek, gonadotropinler ise ikinci seçenek ilaçlardır. Yaşı ileri hastalarda IVF ilk seçenek olarak düşünülmelidir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), anovulatar olguları endojen östrojen, endojen prolaktin ve endojen gonadotropin düzeylerine göre sınıflandırmaktadır (Tablo 3, 76) .

**Tablo 4. Anovulatuvar hastalıkların sınıflandırılması (WHO sınıflaması)**

<b>Grup I= Hipogonadotropik hipogonadizm</b>	<b>Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon</b>
<b>Grup II= Normogonadotropik hipogonadizm</b>	<b>Östrojenik ovulatuvar disfonksiyon (PKOS)</b>
<b>Grup III= Hipergonadotropik hipogonadizm</b>	<b>Over yetmezliği</b>
<b>Hiperprolaktinematik anovulasyon</b>	

#### **WHO Grup I= Hipogonadotropik hipogonadizm**

Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon söz konusu olduğu için bir pompa yardımıyla pulsatil gonadotropin releasing hormon (GnRH) uygulaması ile fizyolojik dozlarda gonadotropin salgısını uyararak veya menopozal gonadotropinler (HMG) ile ovulasyon sağlanır. Gebelik oranları HMG ile siklus başına % 25-30 civarındadır. Yine bu tip hastalara rekombinant FSH (recFSH) ve rekombinant LH (recLH) kombine stimülasyon protokolleri uygulandığında follikül gelişimi sağlandığı bildirilmiştir. Ovulasyon indüksiyonundan önce bir-iki siklus östrojen-progesteron uygulaması ile endometrium ve servikal bezlerde atrofi giderilerek gonadotropinlere iyi yanıt vermesi sağlanabilir. Kronik düşük doz step-up protokolü uygulanır. Luteal faz desteği yapılır (77).

#### **WHO Grup II= Normogonadotropik hipogonadizm**

Polikistik over hastaları bu grubun çoğunluğunu oluşturmaktadır. PKOS olgularının çoğunda vücut kitle indeksi artmıştır. Bu artış anovulasyonu beraberinde getirir. Hastalarda irregüler menstruel sikluslar (35-90 gün), disfonksiyonel uterin kanama (menoraji, metroraji, oligomenore, amenore), hiperandrojenizm bulguları, hirsutismus ve obezite mevcuttur. Azalmış fertilité, artmış gebelik kayıpları vardır. Ultrasonografik incelemede over korteksi altında periferik dizilimli küçük folliküller (<10 mm) izlenir. FSH/LH oranının tersine dönmesi ve adrenal, tiroid, prolaktin hormonlarında yükselme saptanabilir. Bu olgularda

ovulasyon sağlanması için kilo kaybetmeleri, düzenli egzersiz yapmaları önerilmesi gereken ilk yöntem olmalıdır (78,79).

### **Klomifen sitrat**

Normal tiroid fonksiyonlu, normal prolaktin seviyeli, galaktorezi olmayan anovulatuvar infertil olgularda ovulasyon sağlanması için ilk tercih edilen ilaçtır. Bu olgular serum östrojen düzeyleri 40 pg/ml'den yüksek, normal menstrual cevap veren WHO II tipi olgulardır.

Klomifen sitrat zayıf etkili sentetik östrojendir. İlk olarak 1956 yılında sentezlenmiştir. Oral yolla kullanılır. Ovulasyon induksiyonunda kullanılan dozlarda hipotalamus ve hipofizdeki östrojen reseptörlerine bağlanarak antiöstrojenik etki gösterir. Klomifen sitrat östrojen reseptörlerine saatler yerine haftalarca bağlandığından, östrojen reseptörlerinde down regülasyon oluşturur. Hipotalamus ve hipofiz dolaşımdaki östrojeni algılayamayacağından, GnRH amplitüdü artar, sonuçta hipofizden daha fazla FSH salgılanır (80,81).

Menstruasyonun başlangıcından sonra 3-5. günde başlanarak 50-100 mg/gün dozlarında 5 gün kullanılır. Tedavi bitimini izleyen 5-10. günler arasında dominant follikül gelişimi takip edilir. Dominant follikül gelişiyor ancak ovulasyon olmuyor ise hCG ile ovulasyon tetiklenebilir. Başlangıç dozu follikül gelişimi için yetersiz ise diğer siklusta doz 50 mg arttırılır. Maksimum doz 250 mg/gün'dür. Ancak 150 mg/gün dozundan yüksek dozlarda gebelik oranlarında artış gösterilememiştir (82,83).

Genellikle ilaç kullanımı iyi tolere edilir. Sıcak basması, meme hassasiyeti, bulantı-kusma, görme semptomları, baş ağrısı oluşabilir ancak geri dönüşümlüdür. Malignite şüphesi, karaciğer fonksiyon bozukluğu, over kisti varlığında kullanımı kontrendikedir.

Vakaların % 75-80'inde ovulasyon sağlanırken, bunların % 35'inde gebelik sağlanabilmektedir. Klomifen sitratla 6 siklus doz artışına rağmen ovulasyon ve/veya gebelik sağlanamaması durumunda klomifen sitrat direncinden bahsedilir. Klomifen direnci anovulatuvar kadınlarda % 20-25 oranında gözlenir (84). 3-6 siklus gebelik elde edilemez ise diğer tedavi yöntemlerini değerlendirmek gerekir.

### **Aromataz inhibitörleri (Letrazol)**

WHO Grup II olgularında tercih edilebilecek diğer ilaç grubudur. Aromataz, Sitokrom p450 bağımlı enzimdir. Androstenedion ve testosteronun östrojenlere dönüşümünde hız belirleyici adımı katalize eder. Selektif aromataz inhibitörleri letrazol ve anastrozol, menapozda meme kanseri tedavisinde östrojen yapımını baskılamak amacıyla kullanılırlar.

İlaç, aromataz enzimini inhibe ederek dokulardaki östrojen biyosentezini azaltır. Klomifen sitrat, östrojenin santral etkisini azaltıp FSH salgısını artırırken aromataz inhibitörleri bu etkiyi periferik östrojen sentezini azaltarak yaparlar. Antiöstrojenik etkisi klomifen sitrata göre daha azdır. Klomifen sitrata dirençli olgularda klinik deneyim kısıtlı olsa da kullanılabilir. Siklusun 3-7. günlerinde 2,5 mg/gün doz uygulamasıyla yapılan çalışmada letrozol ile östrojen ve progesteron düzeylerinin, klomifen sitrat uygulamasına göre daha düşük, follikül sayısının daha az olduğu görülmüştür (85).

KOH'da FSH dozunu azaltmak, düşük over yanıtı hastalarda sonuçları iyileştirmek, ovarian hiperstimülasyon sendromu (OHSS) riskini azaltmak, endojen erken LH artışını önlemek amaçlı kullanılabilir.

İnsan teratojenitesine ait bilgi olmamakla beraber sıçanlarda yapılan çalışmalarda intrauterin ölüm ve fetal anomaliler bildirilmiştir (86). Bu nedenle kullanım güvenliği için daha çok klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **İnsüline duyarlılığı arttırıcı ajanlar**

İnsülin direnci ve hiperinsülinemi, polikistik over sendromunun önemli bir özelliğidir. WHO grup II anovulasyonda kullanılan oral antidiabetik ajanlardan metformin, troglitazon, rosiglitazon, pioglitazon periferik insülin duyarlılığını arttırırlar.

PKOS'nun büyük kısmında metformin kullanımını ovulasyonu sağlayabilir ve ilk kuşak tedavi tercihidir. 1500-1700 mg /gün dozu önerilmektedir. Klomifene dirençli hastalarla yapılan çalışmada klomifen + metformin ile klomifen + plasebo tedavileri karşılaştırılmış, ovulasyonun klomifen + metformin grubunda 9.34 kat arttığı bildirilmiştir (87).

Metformin tedavisi bulantı, kusma, abdominal kramp ve diare gibi yan etkiler oluşturabilir. Doza bağımlı ve zamanla azalan yan etkiler olduğu için toleransı arttırmak amacıyla ilaca düşük dozda başlanıp haftalık dozun istenilen düzeye yükseltilmesi en uygun yaklaşımdır.

### **Gonadotropinler ile ovulasyon induksiyonu**

Eksojen gonadotropinler, 1960'lı yıllarda, ilk kez insan hipofiz bezinden FSH ve LH ekstrakte edilerek hazırlandı. Daha sonra postmenapozal kadınların idrarından elde edilmeye başlandı (88,89,90).

Günümüzde 4 farklı gonadotropin preparatı üretilmektedir;



1 - İnsan menopozal gonadotropini (Menotropinler, HMG)

2- Üriner saf FSH (Ürofollitropin,u-p-FSH)

3- Yüksek saflıkta üriner FSH (u-HP-FSH)

4- Rekombinant FSH (rec-FSH)

**Menotropinler:** Otuz yılı aşkın bir süredir infertilite tedavisinde kullanılan eksojen gonadotropindir. Postmenopozal kadın idrarının, sefaroza içeren ortamdan süzülmesiyle elde edilir. Menotropinler içerisinde çeşitli üriner proteinler (UP) vardır ve oransal olarak bir ampül hMG içerisinde >% 95 UP mevcuttur. Bir HMG ampülünde 75 IU FSH, 75 IU LH vardır ve intramusküler (İM) olarak uygulanır.

**Ürofollitropinler:** Postmenopozal kadın idrarı anti-hCG antikoru içeren ortamdan geçirilerek, LH oranının azaltılmasıyla elde edilir. UP'ler açısından, HMG'ye göre daha saf olup, % 90 oranında UP içerir. Bir ampül saf FSH, 75 IU FSH aktivitesi, < %1 LH aktivitesi içerir. Saf FSH da IM olarak uygulanır.

**Yüksek saflıkta üriner FSH:** Postmenopozal kadın idrarının monoklonal antikolar kullanılarak LH ve hCG'den ayrıştırılmasıyla elde edilir. Yüksek saflıkta üriner FSH, <0.001 LH aktivitesi ve <% 1 UP içermektedir. Yüksek oranda saflaştırılmış ve protein içeriği çok azaltılmış olmasından dolayı cilt altına da uygulanabilir.

**Rekombinant FSH:** 1996 yılından itibaren klinik kullanıma giren rekombinant FSH, insan FSH alfa ve beta subünit geninin, çin hamster over hücrelerine transferi sayesinde ve rekombinant teknoloji ile üretilmektedir. Rekombinant FSH, HMG ve saf- FSH'ya göre çok yüksek spesifik aktiviteye sahip olup, LH aktivitesi ve UP içermez (91).

WHO grup I ( Hipogonadotropik hipogonadizm ) olgularında, klomifen sitrat ve metformin ile ovulasyonun sağlanamadığı kronik anovulasyon olgularında, açıklanamayan infertilite olgularında bir sonraki tedavi basamağı gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonudur.

#### **FSH eşik doz – Pencere kavramı**

Eksojen gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonu uygulamasında eşik doz-pencere kavramı, mono ve multifoliküler büyümeye neden olan faktörler bilinmelidir. İlk kez 1966'da Tounsend ve ark. follikül gelişimini sağlayan FSH dozu ile OHSS ve çoğul gebeliğe neden olan FSH dozu arasındaki farkın çok az olduğunu bildirmiştir (92). Daha sonra Brown ve ark. eksojen gonadotropin tedavisinde folliküllerin belli bir FSH eşik düzeyi olduğunu, bu dozun altında çok uzun süre indüksiyon yapılsa bile follikül gelişiminin sağlanamadığını, dozun % 10-30 arasında artırılmasıyla eşik dozun aşıldığını, follikül gelişiminin sağlanabildiğini ve bu

dozun çok üzerine çıkılması halinde ise fazla sayıda follikülün uyarıldığını bildirdiler (93). Brown'un çalışmalarında FSH eşik dozunun değişik faktörlere bağlı olduğu ve bireysel farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu faktörler; endojen FSH salınımı, ilacı uygulama yolu, emilim oranı, dağılım hacmi, eksojen gonadotropinlerin farklılıkları ve şişmanlıktır. Aynı olguda bile farklı sikluslarda, farklı eşik dozun olabileceği tespit edilmiştir. Eşik doz fazla geçilirse bile, eşik doza ulaşıldıktan sonra, bu dozda uzun süre devam edilirse yine birden fazla follikül gelişim sürecine girecek ve sonuçta multifoliküler gelişim ve bunun olumsuz sonuçları ortaya çıkacaktır.

Foliküllere eşik seviye üstünde FSH'nın uzun süreli etkisini önlemek için bu aralığın dar tutulması gerekir. Folliküler gelişimin sağlandığı bu aralığa pencere periyodu (Window concept) olarak adlandırılır (94,95,96).

### **Geleneksel (Konvansiyonel) protokol**

Eksojen gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonunda ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu nedenle bu ajanların kullanıma girdiği 1960'lı yıllardan itibaren değişik tedavi rejimleri geliştirilmiştir. Ovulasyon indüksiyonu; kullanılan ilaç dozu, serum E<sub>2</sub> düzeyi ve ultrasonografi ile kontrol edilmeye çalışılmıştır. Rabau 1967'de basamaklı artım protokolünü önermiş ve istenilen cevap alınmadığı zaman ilaç dozunu 1 ampul/gün şeklinde artırmıştı (97). Daha sonra 5-7 günde bir 1 ampul artırılan geleneksel protokol çoğu klinikte rutin kullanıma girmiştir ve halen birçok klinikte bu yöntem yüksek komplikasyon oranına rağmen uygulanmaktadır.

Tedaviye spontan veya progesteron (oral medroksiprogesteron asetat-MPA, 10 mg/gün 10 gün) ile indüklenmiş menstruasyon kanamasının 3-5. günleri başlanır. USG'de over kisti ekarte edildikten sonra, follikül uyarımına 150 IU/ gün dozunda başlanır. Uygulama günün aynı saatlerinde yapılır. Hasta, serum E<sub>2</sub> düzeyleri ve ultrasonografi ile periyodik olarak takip edilerek, indüksiyonun 5-7. günü ilaç dozunun artırılmasına veya tedavinin aynı dozda devamına karar verilir. Kontroller 7. günden itibaren 1-3 günlük aralıklarla yapılır. 16-18 mm lik preovulatuvar follikül tespit edildiğinde 10.000 IU hCG ile ovulasyon tetiklenir. hCG uygulamasını takiben 1-3. günlerde koitus önerilir.

Ovulasyonu değerlendirmek için hCG gününden 7-9 gün sonra kanda progesteron düzeyi, gebeliği değerlendirmek için ise hCG gününden 14-16 gün sonra, kanda  $\beta$ -hCG düzeyi ölçülür.

Geleneksel protokolle, yüksek doz eksojen gonadotropin kullanılması nedeniyle komplikasyonlar daha yüksek oranda görülür. Ovulasyon oranları % 50-80, kümülatif gebelik

oranları % 20-30 arasında değişirken, çoğul gebelik % 23-28, OHSS % 10-20 oranlarına varabilmektedir (98,99).

### **Kronik düşük doz basamaklı artım (Kronik low dose step-up) protokolü**

Polson ilk kez FSH eşik doz-eşik düzey kavramını esas alarak, rec-FSH'ı cilt altından, 75 IU/gün dozunda folliküler yanıt alınana kadar, maksimum 15 gün uyguladı (100). 12 mm ve üzerinde folikül sağlanamaması halinde dozu yarım ampul artırdı. Yine yanıt alınamazsa, haftada bir yarım ampul (37,5 IU) artışlar yaptı. Folliküler gelişimin sağlandığı dozda, follikül 16 mm çapa ulaşınca kadar devam etti. Folikül 16 mm çapa ulaştığında ovulasyonu tetiklemek için hCG uyguladı.

Kronik düşük doz step-up protokolünde, ovulasyon indüksiyonuna spontan menstruel kanamanın veya 10 mg/gün dozunda oral MPA'nın 10 günlük kullanımı sonrası gerçekleşen çekilme kanamasının 3-5. günlerinde 75 IU/gün dozunda uygulamaya başlanır. Tedavinin 7. gününde ultrasonografik inceleme yapılır. 10 mm veya daha üstünde follikül yoksa aynı dozda 14. güne kadar devam edilir. Hala yeterli follikül gelişimi izlenemezse doz 37,5 IU/gün artırılır. Follikül gelişimi izleninceye kadar bir hafta aralıklarla bu doz artımı tekrarlanır (en fazla 35 güne kadar). Follikül gelişiminin (10 mm veya daha üstü) izlendiği dozda, dominant follikül 17 mm veya daha üstü boyuta ulaşınca kadar devam edilir. Ovulasyonu tetiklemek için 10 bin IU hCG IM uygulanır. Siklusun daha sonraki takibi geleneksel protokolda olduğu gibi yapılır. Başlangıç dozuna aşırı cevap geliştiği durumlarda, başlangıç dozu 37,5 IU/gün azaltılır. Başlangıç dozuna 14 gün içinde cevap alınamayan siklusun sonrasındaki siklusda, başlangıç dozu 37,5 IU / gün artırılır (101,102,103).

Polson'un (100) çalışması ve daha sonraki çalışmalarda, özellikle PKOS olgularında, bu protokolle ovulasyon indüksiyonu yapıldığında, gonadotropin formu ve uygulama yolundan bağımsız olarak, monofolliküler gelişim oranında artış, çoğul gebelik ve OHSS oranında azalma saptanmıştır. hCG uygulama gününde bakılan serum LH, progesteron ve E<sub>2</sub> düzeylerinin daha düşük olduğu ve aylık gebelik oranlarının arttığı saptanmıştır (102, 104,105).

### **Step-down (basamaklı azaltım) protokolü**

Gerek geleneksel gerekse kronik düşük doz step-up protokolde, ovarian yanıtın ortaya çıkmasından itibaren, hCG'nin uygulanacağı güne kadar, uygulanan FSH dozunda değişiklik yapılmamaktadır. Geç folliküler dönemde dominant follikülün büyümesi FSH'ya daha az bağımlıdır. Basamaklı artım protokolleri, bu dönemde serum FSH konsantrasyonunu artırarak daha çok follikül gelişmesine neden olabilir (101,106,107).

Normal menstrüel sikluslarda, perimenstrüel dönemde başlayıp erken folliküler dönemde devam eden FSH artışı gözlenir. Geç folliküler dönemde ise FSH konsantrasyonu düşer. Step-down protokolün prensibi, bu FSH değişikliklerinin eksojen yoldan taklit edilmesidir. Stimülasyon başlangıcında, serum FSH konsantrasyonunun sınırlı bir süre eşik düzey üzerinde tutulmasıyla, gelişim sürecine giren follikül sayısında azalma sağlanmaktadır (107).

Geleneksel protokol ve kronik düşük doz step-up protokolde değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda protokollerde fazla modifikasyon yapılmamasına rağmen, basamaklı azaltım protokolünde değişik araştırmacılar bazı modifikasyonlar yapmışlardır. Mizunuma ve ark. (106), indüksiyona günde 225 IU ile başlayıp 2 gün verdikten sonra günlük dozu 75 IU'ya düşürmüşlerdir. 75 IU ile follikül gelişimi sağlanamadığında, günlük dozu 150 IU'ye çıkmışlardır. Andah ve ark. (101) 2 gün, günde 225 IU dozu uyguladıktan sonra, 3. günde günlük dozu 150 IU' ye düşürüp 9 mm lik folikül gözleninceye kadar bu dozda devam etmişler, daha sonra günlük dozu 75 IU' ya indirmişlerdir. Durnerin ve ark. (108), folikül 12 mm oluncaya kadar, günde 300 IU dozunu uygulayıp, daha sonra günlük dozu 150 IU'ya indirmişlerdir. Santbrink ve ark. (109) başlangıç dozu uygulamasını, hastaların vücut kitle indeksine (VKİ) göre ayarlamışlar; VKİ 19-23 kg/m<sup>2</sup> olanlara 112,5 IU, 23-28 kg/m<sup>2</sup> olanlara 150 IU, >28 kg/m<sup>2</sup> olanlara 187.5 IU dozunda uygulama yapmışlardır. 9 mm'den büyük follikül tespit edildiğinde doz 3 günlük aralarla 37,5 IU/gün dozunda azaltılmıştır. Bu modifikasyonlar basamaklı azaltım protokolünün temel mantığını etkilememektedir.

### **Klomifen sitrat ve gonadotropin ile ardışık protokol**

Klomifen sitrat kullanımına dirençli ve açıklanamayan infertilite tanısı olan hastalarda kullanılabilir. Menstruasyonun başlangıcından sonra 3-5. günde başlanarak 50-100 mg/gün dozlarında 5 gün kullanılan standart klomifen sitrat tedavisini takiben en son gün düşük doz gonadotropin (75 IU FSH veya HMG) başlanır. Follikül gelişimi hCG uygulaması kriterlerine ulaşına dek takip edilir.

### **WHO Grup III=Hipergonadotropik hipogonadizm**

Endojen gonadotropin düzeyi over rezervi azalmış (primordial follikül sayısı azalmış) olgularda artar. Vakit kaybedilmeden yardımla üreme teknolojilerine başvurulması gerekir. Gebelik şansı oldukça düşüktür.

**Hiperprolaktinematik anovulasyon:** % 15-20 oranında oligomenoreik kadında hiperprolaktinemi mevcuttur. İnfertiliteye neden olması GnRH salgısında azalmaya yol açarak

hipogonadizm oluşturması şeklindeğir. Vakaların çoğunda prolaktin salgısının supresyonu ile hipogonadizm tablosu geri döner. % 40–50’sinde neden prolaktinomalardır. % 30’unda neden tespit edilemez. % 3-5’inde primer hipotiroidi mevcuttur. Ayırıcı tanı için serum TSH düzeyi ölçülmelidir. Serum prolaktini üst sınırı 30-40 ng /ml dir. Genelde amenore serum prolaktin düzeyleri 100 ng/ml üzerinde ise gözlenir. Prolaktinoma bu düzeyin üzerinde sıklıkla tespit edilir. Galaktore % 30-40 vakada mevcuttur (110). Hiperprolaktinematik olgunun amenoresi veya infertilitesi varsa prolaktin düzeyinin normale dönmesi sağlanmalıdır.

### **Dopamin agonisti protokolü**

Hiperprolaktinemi nedeniyle anovulasyon tedavisinde kullanılır. Bromokriptin ve kabergolin kullanılan dopamin agonistleridir. Prolaktin seviyeleri normale gelince pulsatil GnRH salgısı başlar ve ovulasyon normale döner. Bromokriptin kullanımına 1,25–2,5 mg dozundan başlanır. Doz kademeli arttırılır. Tedavi başlandıktan kısa süre içinde prolaktin düzeyleri düşer ve sabit kalır. Sikluslar tedavi başladıktan 6-8 hafta içinde % 70-90 normale döner (111). Kabergolinin düşük dozlarda serum prolaktinini normale getirdiğini gösteren çalışmalar vardır.

### **YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ (YÜT)**

Yardımcı üreme teknikleri, overden ovulasyonun sağlanmasını veya oositlerin elde edilmesini, ejakülatan ya da cerrahi yollarla alınan spermelerin oositler ile bir araya getirilmesini, eğer laboratuvar ortamında embriyolar elde edilmiş ise uterin kaviteye transferini sağlayan bir tedavi sürecidir.

İnfertil çiftlerin infertilite nedenlerine uygun seçilecek YÜT tedavileri sonucu elde edilen gebelik oranları belirtilmiştir (Tablo 4, 112).

**Tablo 5. İnfertil çiftlerin ortalama siklus başına gebelik oranları**

Tedavi uygulanmamış	% 1,3–1,4
İntrauterin inseminasyon (IUI)	% 3,8
Klomifen sitrat	% 5,6
Klomifen sitrat + IUI	% 8,3
Gonadotropinler	% 7,7
Gonadotropinler + IUI	% 17,1
IVF	% 20,7

### **İntrauterin İnseminasyon (IUI)**

İntrauterin inseminasyon infertilite tedavisinde yıllardır yaygın biçimde kullanılan bir metoddur. IUI, spermatozoanın direkt olarak uterus kavitesine aktarılması demektir (113). Düşük sperm sayısı, zayıf motilite, zayıf penetrasyon yeteneği ve servikal immünite bozukluklarında daha fazla motil spermın fertilizasyon sahasına ulaşmasını sağlar. IUI, değişik endikasyonlarla uygulanmakta ve farklı gebelik oranları elde edilmektedir. Normal koitus sonrası kadın genital yollarında sperm sayısının  $10^5$ - $10^6$  oranında azaldığı belirtilmektedir (114). İnfertil çiftlerde IUI uygulandığında, sadece ovulasyon zamanlaması yapılarak gerçekleştirilen koitlere göre daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (115). Bu başarıda ovulasyonun daha iyi zamanlanmış olmasının yanı sıra daha fazla spermın oosit yakınına aktarılmasının da rolü olduğu söylenebilir (116). IUI başarısının over hiperstimulasyonu ile birlikte uygulandığında arttığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (117,118,119).

### **IVF öncesi değerlendirme**

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonda (KOH) overlerden mümkün olduğunca çok sayıda ve iyi kalitede oosit elde edilmesi amaçlanmaktadır. İnvitro fertilizasyon (IVF) için en ideal stimülasyon rejimi, minimal yan etkiye sahip, siklus iptal oranları en düşük, ilaç maliyeti en az, monitörizasyonu kolay ve sonucunda tekil gebeliği sağlayabilecek şekilde olmalıdır.

Over kapasitesi IVF planlanan her kadında değerlendirilmelidir. Üçüncü gün FSH düzeyi başlanacak uygun gonadotropin dozunu belirlemek için önemlidir. Transvajinal ultrasonografi ile overler incelenerek antral follikül sayısı belirlenir. Enfeksiyöz hastalıkların taranması ve tedavisi gereklidir. Yalancı (mock) embriyo transferi, uterin kavitenin derinliğini ve en başarılı atravmatik embriyo transferini yapmak için denenebilir. İmplantasyonu etkileyecek submukoz myom, endometrial polip, sineşi tanısı için uterin kavite ultrasonografi, HSG, sonohisterografi veya ofis histeroskopi ile değerlendirilebilir.

## **KOH SEÇENEKLERİ**

### **Doğal siklus**

İlk IVF gebeliği, uyarılmamış doğal siklustan toplanan oosit ile elde edilmiştir. Ancak doğal siklusta bir oosit ve bir embriyo oluştuğu için siklus başına gebelik elde edilme şansı düşüktür.

### **Klomifen sitrat**

3. gün başlanan 100 mg klomifen sitrat 5-8 gün kullanılır, normal ovulatuar kadında 2 veya fazla follikül geliştirir. Düşük maliyet, az monitörizasyon gerekliliği yüzünden dost IVF tedavi rejimi gibi görünmektedir.

### **Klomifen sitrat ve eksojen gonadotropin ile ardışık tedavi**

Beş gün, 100 mg/gün klomifen sitrat tedavisine gonadotropin eklenmesi tek başına klomifen tedavisine göre daha başarılıdır.

### **Uzun etkili GnRH agonistleri ile yapılan down regülasyon sonrasında eksojen gonadotropin tedavisi (long protokoller)**

DeneySEL ve klinik çalışmalarda GnRH agonistlerinin (GnRH-a) tekrarlayan in vivo kullanımının gonadotropinler üzerinde bifazik salınım yaptığı bulunmuştur. İlk olarak FSH ve LH da ani salınım (flare up etki) olur, daha sonra GnRH reseptörü down regülasyonu ile hipofizer desensitizasyon aşaması gelişir. Gonadotropin sentezindeki azalma GnRH-a kullanımı oldukça devam eder. Desensitizasyonun şiddet ve süresi en azından LH için doza bağlıdır. Yine doz ve formülasyona bağlı olarak ilaç bırakıldıktan sonra da endojen GnRH'a refrakter bir period oluşur. GnRH-a'nin bu özellikleri iki tedavi protokolünde kullanılmaktadır (120,121).

Bir önceki siklusun mid-luteal döneminde başlanan GnRH analogu ile hipofizer down regülasyon oluşturulur. Overlerin baskılanmasını takiben gonadotropin uyarısı ile follikül gelişimi sağlanır. Böylece senkron follikül gelişimi uyarılırken, LH'nin erken ve kontrolsüz yükselişi engellenir (122).

Genellikle adet 21. günü başlanır, en az 14 gün süreyle GnRH analogu uygulanır. Takip eden menstruasyonun 1-3. günlerinde yapılan ultrasonografi kontrolünde 10 mm den büyük follikül yoksa ve E<sub>2</sub> düzeyi 50 pg/ml altında ise hipofizer desensitizasyonun

tamamlandığı düşünülür, GnRH analoguna ara vermeden kanamanın 3. günü tedaviye gonadotropin eklenir. 14 gün analog kullanımına rağmen hormonal baskılanma sağlanamaz ise kullanım süresi, E<sub>2</sub> düzeyi 50 pg/ml altına düşünceye dek uzatılır.

Tedavi sürecinde serum E<sub>2</sub> düzeyi, gonadotropin eklendikten 3-5 gün sonra yükselmeye başlar ve gonadotropin dozunun over cevabı için yeterli olup olmadığının göstergesidir. Tedavinin 5-6. gününde ölçülen 100 pg/ml seviyesi dozun yetersiz olduğunu düşündürür, doz artışı yapılmalıdır. Üç gün aralıklarla E<sub>2</sub> düzeyi (her bir 14 mm boyutundaki follikül için 150-200 pg / ml) ve ultrasonografi ile follikül büyümesi takip edilir. Genelde hedef en az 2 tane 17-18 mm çapında ve 14-16 mm çapında birkaç tane follikül elde etmektir. Son folliküler maturasyon için 5.000-10.000 IU hCG İ.M. uygulaması yapılır. Benzer etki için rekombinant hCG yaklaşık 250 µg dozunda geliştirilmiştir ve şu anda kullanımdadır (123).

En iyi gebelik sonuçlarının endometrial kalınlık 8-9 mm ve trilaminar (üç katlı) görünüm oluştuğunda elde edildiği bilinmektedir. hCG günü transvajinal ultrasonografi ile ölçülen kalınlık 6-7 mm altında ise sonuçların olumsuz olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (124). Aşırı endometrial kalınlık (14 mm üzeri) varlığı da kötü prognozla ilişkilidir.

Kullanımdaki GnRH agonistleri ;

- Leuprolid asetat: en sık kullanılan formdur. Cilt altı enjeksiyon şeklinde 1.0 mg/gün dozunda, 10-14 gün süresince menstruasyon başlayana dek uygulanır, kullanıma ara verilmeden gonadotropin tedavisi başlangıcı ile dozu günlük 0.5 mg'a düşürülür.
- Nafarelin asetat: intranasal uygulanır.
- Buserelin asetat: ciltaltı veya intranasal kullanılır.
- Triptorelin asetat: ciltaltı uygulanır.

### **Uzun dönem GnRH-a protokolü**

Önceki siklusun luteal fazında ve erken folliküler fazda GnRH- a verilmesi ile hem hipofiz hem de over desensitizasyonu elde edilir. GnRH- a enjeksiyonuna hCG verilene dek devam edilir. Randomize çalışmaların metaanalizinde GnRH- a'nin IVF iptal oranını düşürdüğü, oosit sayısını ve klinik gebelik oranlarını artırdığı bulunmuştur. Kısa ve uzun dönem protokolleri karşılaştırıldığında değişken sonuçlar elde edilmekle beraber metaanaliz çalışmalarında anlamlı fark olmadığı bildirilmektedir (125). Hipofizer desensitizasyon parametreleri ( hız, şiddet, devam süresi ) kullanılan analog, siklusta ilk kullanım gününe,



kullanım süresi ve kullanılan formülasyona göre değişir (120). Standart, minidoz ve ultra minidoz için önerilen dozlar aşağıda gösterilmiştir (tablo 5).

**Tablo 6. GnRH analogu çeşitleri ve standart, minidoz ve ultra minidoz için önerilen dozlar**

GnRH analogu	Standart doz	Mikrodoz	Ultra mikrodoz
Leuprolide asetat	2-1 mg	1-0,5 mg	0,5-0,25 mg
Nafarelin asetat	1200-600 µg	800-400 µg	400-200 µg
Buserelin asetat	900-450 µg	600-300 µg	

### **Kısa dönem GnRH-a protokolü**

Bu protokolde GnRH-a erken folliküler fazda verilmeye başlanır. GnRH-a'nın flare up etkisinden folliküler gelişim için yararlanır, daha sonra da günlük kullanımla hipofizer desensitizasyon etkisinden yararlanır. Bu protokolde kısa dönem GnRH-a'nın endojen LH yükselmesini engellediği varsayılarak 3 günlük (ultra-kısa protokol) ve 7 günlük kullanımı ile oosit toplama zamanını belirlemek gibi ayarlamalar da yapılmıştır (126,127).

Standart kısa protokol, over rezervinin kısıtlı olduğu (poor responder) olgularda yapılır. GnRH analogu (1.0 mg/gün) adet 2-4. günü verilir daha sonra dozu 0,5 mg /gün azaltılır. Gonadotropine mensin 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır. Follikül gelişimi takip edilerek hCG uygulama kriterlerine ulaşıncaya kadar tedaviye devam edilir.

Mikrodoz flare-up protokolünde ise oral kontraseptif kullanımını takiben mensin 3. gününde mikrodoz leuprolid (günde 2 kez 40 µg) tedavisine başlanır ve gonadotropine mensin 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır. Follikül gelişimi takip edilerek hCG uygulama kriterlerine ulaşıncaya kadar tedaviye devam edilir. Serum FSH değeri artmış, zayıf over cevaplı hastalar için iyi bir protokoldür. Yapılan çalışmalarda kısa ve uzun GnRH agonist tedavilerinin benzer iptal ve gebelik oranları bildirilmiştir (128).

uFSH ve HMG'yi karşılaştıran 2 metaanalizde, uFSH tek başına kullanıldığında over cevabı açısından daha iyi sonuç vermiş ancak GnRH agonisti kullanılan sikluslarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (129). recFSH ve HMG kullanımları için, GnRH agonisti ile down regulasyon yapılan siklusların karşılaştırmasında, gebelik oranları arasında fark bulunamamıştır (130).

GnRH agonistlerinin kronik uygulama gerekliliği olması, flare-up etkileri sonucu over kistleri gelişebilmesi veya uzun süreli kullanıma bağlı desensitizasyon sonucu over tükenmişlik sendromu oluşabilmesi dezavantajlarıdır.

GnRH analogu kullanımında flare-up etkisine bağlı bazı hastalarda gelişen follikül kistlerinin varlığını bazı araştırmacılar kötü ovaryan cevap, azalmış oosit ve embriyo sayısı, daha düşük IVF başarısı ile ilişkili olduğunu savunmakta olsa da aksini düşünen alışmacılarda vardır (131).

### **GnRH antagonisti kullanımı**

Önce uyaran sonra inhibe eden GnRH analoglarının aksine GnRH antagonistleri doz bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke eder, hızlıca gonadotropin salgısını inhibe eder.

Agonistlere göre avantajları;

- Agonistlere göre tedavi süresi daha kısadır.
- Kullanımdaki amaç LH pikini engellemek olduğundan folliküler gelişimin geç döneminde (gonadotropin tedavisinin 5-7 günlerinde) kullanılır. Böylece E<sub>2</sub> seviyesi artışı engellenmez (132,133).
- Agonist tedavisindeki gibi over cevabı uzun süreli baskılanmadığından kullanılan gonadotropin dozu ve süresi azalır.
- Follikül kisti flare etki olmadığı için gelişmez.
- OHSS riski daha azdır (133).

GnRH'ın sentetik analogları olan bu ilaçlar pituiter GnRH reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanırlar ancak GnRH reseptör çapraz bağlanmasını ve dolayısı ile kalsiyum aracılı gonadotropin salınımını yapamazlar. Böylece LH salgılanması üzerinde ilk flare up etkisi olmadan güçlü, kısa sürede ve reversibl supresyon yaparlar; desensitizasyon periodu gerektirmezler (134,135). Agonistlerle karşılaştırıldığında antagonistlerin etkisi doza bağlı olup etki mekanizması endojen GnRH ile antagonist arasındaki dengeye bağlıdır (136). şimdiye dek 3 jenerasyon antagonist kullanılmıştır. İlk ikisi histamin salınımı yaptıklarından geçici sistemik ödem ve enjeksiyon bölgesinde inflamasyon (1. jenerasyon) ya da sadece lokal reaksiyona (2.jenerasyon) neden olmaktadırlar. Üçüncü jenerasyonun histamin salınım etkisi az olup, antiovulatar etkisi 2. jenerasyona eşdeğerdir. Üçüncü jenerasyon antagonistlerden üzerinde en çok alışılanları cetrotelix [Cetrotide (Serono)] ve ganirelix [Antagon veya Orgalutron (Organon)] tir.

GnRH antagonistleri ile ilgili iki tedavi rejimi mevcuttur:

### **Multiple doz GnRH antagonisti kullanımı**

Gonadotropin tedavisine başlandıktan yaklaşık 5-6 gün sonra en büyük follikül 13-14 mm çapa ulaştığında, E<sub>2</sub> seviyesi 500 pg/ml üzerinde ise 0.25 mg/gün dozunda ciltaltı enjeksiyonu şeklinde yapılır. 96 saat LH pikini geciktirecek cetrorelixin 3.0 mg lık tek enjeksiyon formu, günlük kullanım kadar rahat doz ayarlamasına izin vermez. Folliküler maturasyon, hCG gününe kadar gonadotropin dozuna ek, günlük antagonist dozu uygulanarak takip edilir. Antagonist dozu bazı hastalarda LH düzeyinde aşırı baskılanma yaratacağı için tedaviye HMG ile devam edilmesini öneren çalışmalar vardır (137). Orta folliküler fazdan (siklusun 5 ya da 6. günü) başlayarak hCG gününe kadar düşük dozda günlük GnRH antagonisti enjeksiyonları yapılır (138). Antagonist verilmesinden sonra ganirelix için 4, cetrorelix için 6 saat içinde pituitar supresyon tamamen etkin olup, LH seviyesi % 74 oranında düşerek <1 - 2 IU/l seviyesine iner (136). Ganirelix ve cetrorelixle yapılan çalışmalarda bu etki için 0,25 mg'ın yeterli olduğu bulunmuştur (139). GnRH antagonistini önde giden follikül boyutuna göre başlamanın, sabit günde başlamak kadar etkili olduğunu ve bu yöntemle daha az antagonist kullanıldığını belirten çalışmalar mevcuttur (140).

### **Tek doz GnRH antagonisti kullanımı**

Normoovuluar kadınlarda tek ve büyük doz antagonistin geç folliküler dönemde kullanımının spontan LH artışını ertelediği bulundu (138). Cetrorelixle 3-5 mg doz ile LH artışı 6-17 gün, LH yükselmesinin başında uygulanırsa 3 gün LH artışı engellenebilir (141). Buna göre antagonist 8. günde ya da over cevabı hızlı ise daha önce kullanılır. Baskılama etkisini üç günden daha fazla uzatmak gerektiğinde ikinci büyük doz ya da günlük 0,25 mg lık dozlar verilebilir (142). Geç folliküler fazda uygulanan GnRH antagonistinin ovülasyona kadar olan oosit gelişimini engellemediği görülmüştür (141).

GnRH antagonistleri ile GnRH-a uzun protokolle karşılaştırmalı çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır. En azından çok merkezli çalışmalarda over follikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve gebelik oranları agonist protokolüne göre daha az bulunmuştur (143). Folliküler gelişim açısından bakıldığında agonist siklusa göre antagonist sikluslarda folliküllerin başlangıçta hızlı büyüdüğü ve östrodiol seviyesinin daha çabuk arttığı görülmüştür (136). Antagonist protokolünün kısa olması nedeni ile hasta uyumunun ve 3. jenerasyon antagonistlerin klinik toleransının yüksek olması antagonist protokolünün avantajlarıdır. Ayrıca kullanılan eksojen gonadotropin miktarının, OHSS sıklığının ve toplam maliyetin az olması da ek avantajlarıdır.

## **Over hiperstimulasyon sendromu (OHSS)**

OHSS, eksojen gonadotropin tedavisinin en ciddi komplikasyonudur. IVF-ET sikluslarının % 1-10'unda görülür. hCG uygulamasından sonraki 3-7. günler arasında görülen erken OHSS, ovulasyon öncesi stimülasyona aşırı cevaptır, hCG'nin akut etkisine bağlı gelişir. hCG enjeksiyonundan 12-17 gün sonra gelişen geç OHSS ise gebelikle oluşan endojen hCG nedeniyle ve daha şiddetli seyir gösterebilir. Ovulasyon indüksiyonu sonucu gelişen çok sayıdaki follikül ve korpus luteum tarafından vasküler endotelial growth faktör (VEGF) salınımıyla damar geçirgenliğinde artış olmakta, proteinden zengin sıvının damar dışına çıkmasıyla periton, plevrada sıvı artışı, ödem, hiperkonsantrasyon, hipovolemi, anüri, hipotansiyon ve ARDS gelişebilmektedir (144).

Tedavi sürecinde oluşabilecek aşırı over cevabı (yaygın ovarian genişleme, 3000 pg/ml den fazla E<sub>2</sub> düzeyi, follikül boyutlarında artış) halinde OHSS'yi engelleyebilmek için yapılabilecekler;

- Siklus iptali
- Coasting (1-3 gün gonadotropine ara verilir, GnRH analoguna devam edilir, E<sub>2</sub> seviyesi normale gelince hCG ile folliküler maturasyon sağlanır)
- Erken tek taraflı follikül aspirasyonu (oositler toplanır, fertilize edilir, embriyolar dondurulur)
- Düşük hCG dozu kullanılması; E<sub>2</sub> düzeyi >3000 pg/ml ve >5000 pg/ml ise sırayla 5000 ve 3300 IU uygulanmalıdır (145).
- hCG yerine 5000 IU veya 15.000 IU rekombinant LH kullanılması
- hCG enjeksiyonu sonrasında yüksek moleküler ağırlıklı solusyonların kullanımı (human serum albumini, HAES)
- Luteal fazda yüksek doz İ.M. progesteron kullanılması

## **Tedavide Monitörizasyon**

Folliküler gelişimi takip, hCG zamanını tespit etmek, hiperstimülasyondan korunmak amaçlanır. Serum E<sub>2</sub> düzeyi ölçülerek, ultrasonografi ile folliküller görüntülenerek uygulanan dozun yeterli olup olmadığı değerlendirilir.

Serum E<sub>2</sub> düzeyi her zaman follikül büyümesi ile korele değildir. Ancak 3 günden fazla plato yapması zayıf sonuçla ilişkilidir. En iyi sonuçlar 500-1500 pg/ml arasında elde edilir, serum E<sub>2</sub> düzeyi 200 pg /ml altında ise genellikle gebelik oluşmaz (146).

Ultrasonografi ile indüksiyon boyunca folliküler büyüme takip edilir. Folliküllerin 1-3 mm / gün hızında büyümeleri beklenir. Folliküler ölçüm, içten içe birbirine dik eksendeki iki ölçümün toplanarak ortalamasının alınmasıyla elde edilir. Matür follikül ölçümü için değer 18-19 mm olmalıdır. En büyük follikül 18-19 mm ve ardından takip eden en az 3 adet 16-18 mm'lik follikül varlığında 10.000 IU hCG uygulamasına karar verilir. Siklus süresince endometrium artan E<sub>2</sub> seviyesiyle kalınlaşır. Ultrasonografi ile takip edilen bu kalınlığın gebelik sonuçları ile anlamlı birlikteliği vardır. 7 mm'nin altındaki kalınlıklarda gebelik oranı düşüktür.

Folliküler gelişim takip edilirken gonadotropin tedavisine kötü yanıt veren olgularda (3 veya daha az oosit elde edilen, E<sub>2</sub> seviyesi 500 pg/ml altında olanlar ) yapılabilecekler ;

- Uzun protokolde yüksek dozla başlanması (450 IU üzerindeki dozlar ek yarar getirmez)
- GnRH agonist dozunun düşürülmesi, gonadotropin başlanıp agonistin kesilmesi
- Klomifen sitrat ve gonadotropinler ile ardışık stimülasyon uygulaması
- Uzun süreli GnRH analogu yerine GnRH antagonisti kullanılması
- Kısa dönem GnRH analogu kullanımı (mikrodoz flare –up)

### **Follikül Aspirasyonu**

hCG enjeksiyonunu takiben 34-36 saat sonra follikül aspirasyonu (oocyte pick-up, OPU) gerçekleştirilir. Transvajinal ultrasonografi eşliğinde intravenöz sedasyon veya her iki lateral fornikslere yapılacak lokal anestezi ile toplanması standart işlemdir (147). Profilaktik antibiyotik tedavisi verilebilir ancak enfeksiyon riski düşüktür. Vajen steril serum fizyolojik ile yıkanarak temizlenir. Yaralanmayı önlemek için mesanenin boş olduğundan emin olunmalıdır. Aspirasyon iğnesi takılı transvajinal prob steril kılıf içine sarılmalıdır. 16-17 G'luk iğne yardımıyla, en uygun vakum basıncında (100-200 mmHg) ultrasonografi eşliğinde folliküllere girilerek sıvı ve oositler toplanır. 10 mm'den büyük folliküllerin toplanması için birkaç kez overe girilmesi yeterli olur.

Boş follikül sendromu, yeterli follikül boyut gelişimine rağmen aspire edilen folliküllerden oosit elde edilememesi durumudur. hCG enjeksiyonunun yapılmadığını veya

etkisiz olduğunu düşündürür. Tek overden oosit çıkmaması halinde siklusu kurtarmak için hCG dozu tekrar edilerek 36 saat sonra diğer overdeki follüküller aspire edilmelidir (148).

Oosit toplama işleminin komplikasyon oranı oldukça düşüktür. En sık iğnenin geçtiği lateral fornikslerden kanama oluşur. Tamponlama ile durur. Nadiren komşu organ (barsak, mesane, damar) yaralanmaları oluşabilir. Özellikle endometriomaların içine girip aspire edilirse vajinal flora kistin içine taşınabileceği için abse oluşumu görülebilir (149).

Oosit toplama işlemi sona erdikten sonra korona-kumulus kompleksine göre oositlerin maturasyonu değerlendirilir (tablo 6, 150). Bu değerlendirmede elde edilen oositi çevreleyen korona-kumulus kompleksinin genişliği ve parlaklığı esas alınır.

**Tablo 7. Oosit maturasyonunun değerlendirilmesi**

Grade I (immatür profaz)	Polar body yok, germinal vezikül koyu, kompakt kumulus mevcuttur
Grade II (metafaz I)	Polar body var, germinal vezikül yoktur. Kumulus geniş, oosit açık renktir.
Grade III (metafaz II)	Polar body var, ooplasm düzgündür. Kumulus geniş görünümlüdür.
Grade IV (postmatür)	Kumulus yığın halinde veya yok, polar body var, ooplasm koyu görünümlüdür.
Grade V (atretik)	Kumulus yok, polar body nukleus dejenere görünümlü vakuol mevcuttur

Mikroenjeksiyon işlemi öncesinde oositlerin etrafındaki korona-kumulus hücrelerinin temizlenmesi (denudation) gerekir. Bu amaçla hyaluronidaz solusyonu ve cam Pasteur pipetler kullanılır. Kullanılan hyaluronidaz (HYASE-10X) kumulus ve korona hücrelerini oositin etrafından enzimatik yolla uzaklaştırır. 30 sn den uzun olmayacak şekilde işleme tabii tutulurlar ve sonrasında yıkama mediumu içeren temiz dropletlere alınırlar. Polar cisimciğin varlığı (MII) veya yokluğu (MI) ya da germinal vezikül (GV) varlığı açısından değerlendirilirler. Matür (MII) oositler mikroenjeksiyon işlemi için önceden hazırlanmış kültür mediumu içeren dropletlere alınırken, immatür oositler (MI ve GV) maturasyonlarını tamamlamaları için yine kültür mediumunda inkübatörde bekletilebilirler.

## **Fertilizasyon-Mikroenjeksiyon işlemi**

Folikül aspirasyonu sonrasında tüplere alınan folikül sıvısı içeriği laboratuvar şartlarında inverted mikroskop ile incelenir. Bulunan oositler 37°C sıcaklıkta, %5-6 karbondioksit oranında inkübatöre kültür sıvısı içinde kaldırılırlar. Olgun oosit (metafaz II) ilk polar cisimciği atmış, mayoz II de istirahat halindedir. Metafaz I deki oositin (immatür oosit) polar cisimciği yoktur, germinal vezikülü ve nukleolusu soluktur. Olgun oositler en yüksek fertilizasyon oranlarına sahiptir(150). Folikül aspirasyonunun yapıldığı gün genelde erkekten de masturbasyon yöntemiyle sperm alınır. Canlı sperm yoksa uygun cerrahi işlemler (TESA,TESE,MESA v.b.) ile sperm elde edilmeye çalışılır.

Standart IVF için ileri hareketli sperm sayısı (oosit başına 20 milyon sperm) önemlidir. Sperm hazırlanarak fertilizasyon işlemi yapılır. Tek sperm hücrelerinin mikropipet yardımıyla oosit sitoplazmasına yerleştirilmesi işlemine intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) denir. ICSI ile ilk denemeler 1962 yılında deniz dikenini gametleriyle yapıldı. Bunu izleyen yıllarda 1976 da Uehara ve Yanagimachi'nin çalışmalarıyla hamster oositlerinde fertilizasyon ve tavşanlarda embriyo gelişimi ve doğum gerçekleştirildi. 1992 yılında Belçika'da Brussel Free University 'de Palermo ve arkadaşları tarafından şiddetli erkek infertilitesi olgularında ejakulat spermlerin kullanıldığı ICSI uygulamaları gebelikler ve doğumlar ile sonuçlandı. Böylece sperm parametrelerinin ileri derecede kötü olduğu erkeklerde ICSI kullanımı ile yeni bir atılım gerçekleştirilmiştir.

Mikroenjeksiyon işlemi öncesinde oositlerin etrafındaki korono-kumulus hücreleri temizlenir(denudation). Bu amaçla hyalüronidaz solüsyonu ve cam Pasteur pipetler kullanılır. Enzimden temizlenen oosit içerisine hareketli ve morfolojisi normal sperm seçilerek mikroenjeksiyon yapılır.

IVF ve ICSI işleminden birgün sonra fertilizasyon açısından oositler incelenir. Kesin olarak ayrı 2 pronükleus varlığı fertilizasyonu gösterir. Embriyolar fertilize olanlar ve olmayanlar olarak ayrıştırılarak farklı medium ortamlarında gelişimleri takip edilir. Sonrasında embriyolar bölünerek blastomer sayıları artar.

Embriyolar blastomer sayısı, blastomer büyüklüğü, blastomer nukleusları, blastomer morfolojisi, fragmentasyon varlığı ve yüzdesi kriterlerine göre inverted mikroskopta değerlendirilir. Embriyo değerlendirilmesinde en önemli kriter embriyo blastomer sayısı ve

fragmantasyon oranlarıdır (Tablo 7, 150). Embriyoların transferine karar verilirken gradeleri belirlenir % 50 den az fragmante ve klivajda olan embriyolar tercih edilir.

**Tablo 8. Genel embriyo değerlendirmesi**

Grade I	Blastomerleri eşit değil, fragmantasyon fazla (>% 50)
Grade II	Blastomerleri eşit değil, fragmantasyon fazla (%25-50)
Grade III	Eşit büyüklükte blastomer, az fragmantasyon var (<% 25)
Grade IV	Eşit büyüklükte düzenli blastomer, fragmantasyon yok

### **Embriyo Transferi**

Embriyolar pronukleer fazdan blastokist aşamasına kadar herhangi bir dönemde transfer edilebilsede sıklıkla 2. veya 3. gün (6-8 hücreli) grade 3-4 embriyoların transferi tercih edilir. İleri dönemdeki embriyo (blastokist) transferinin amacı implantasyon oranlarını arttırmak ve daha iyi gelişen, viable olan embriyoların seçilebilmesi içindir. Eğer 2. gün embriyo transferi yapılmayacak ise sonraki evre için hazırlanmış özel mediumlara aktararak inkübatörde embriyoların gelişimleri takip edilir. Diğer embriyolar dondurulabilir veya donör inseminasyonunda kullanılabilir veya blastokist aşamasına kadar kültür ortamında bırakılabilir. Blastokist aşamasında da (5-6. gün) transfer yapılabilir.

Litotomi pozisyonunda dolu mesane ile, transabdominal ultrasonografi eşliğinde kateterin serviksten geçişi izlenerek, embriyoların atravmatik, hızlı biçimde uterusu yerleştirilmesi amaçlanır. Mukus, kan ve uterin kontraksiyonların tetiklenmesinden kaçınılır. Deneme transferinin önceden yapılması, yumuşak kataterlerin seçilmesi sonuçları olumlu yönde etkilemektedir. Uterin kontraksiyonları önlemek için embriyolar fundusun yaklaşık 1-2 cm altına bırakılır (151).

Standart IVF sikluslerinde doğum oranı ortalama % 22,3, ektopik gebelik oranı % 3 heterotopik gebelik oranı ise % 1 dir. Klinik gebeliklerin % 20 si abortusla sonuçlanır. Çoğul gebelik oranı % 35 dir ve oranlar merkezler arasında farklılık gösterebilir.

Transfer sonrası 12. günde kanda  $\beta$ hCG ölçümü yapılır. Pozitif ise 2 gün sonra sağlıklı katlanarak artışı takip edilir, 15 gün içerisinde gebelik kesesi görüntülenmesi için ultrasonografi yapılır.



## **Luteal Faz Desteği**

Uterin reseptivite implantasyon anındaki endometriumun hormonal ortamına bağımlıdır. Endometrial hücresleri prolifer eden, progesteron reseptörlerini arttıran östrojenin ve stromal tabakanın desidualizasyonunu, endometrial glandların sekresyonunu sağlayan progesteronun embriyo implantasyonu öncesi optimal endometrial maturasyon için ortamda bulunması gerekmektedir.

Doğal sikluslarda ovulasyondan yaklaşık 4 gün sonra tepe noktasına ulaşan steroid hormonlar 1 hafta bu seviyede kalır ve menstrual periotdan 5 gün önce düşmeye başlar. Uyarılmış sikluslarda luteal faz hormon üretimi multiple korpus luteum varlığından dolayı suprafizyolojiktir, ancak daha kısa sürelidir. Stimule edilmiş IVF sikluslarında oosit toplanmasından sonraki ilk haftada steroid üretimi yeterli görülmektedir. Ancak, KOH sikluslarında GnRH'nin kullanılması ile korpus luteum fonksiyonunun anormal olduğu görülmüş ve luteal faz desteğinin önemi açığa çıkmıştır. Progesteron olduğu kadar östrojen de direkt olarak luteinizasyonu sağlamasa da progesteron reseptörü yenilenmesinde gerekli olduğu için önemlidir. Bu nedenle korpus luteumdan hem östrojen hemde progesteron salınımı üzerindeki uyarıcı etkisinden dolayı hCG kullanımı ileri sürülmüştür. Teorik olarak korpus luteum devamlılığını sağladığı için GnRH-a sikluslarında hCG'nin progesterondan daha etkili olması beklenir. Ancak yapılan klinik çalışmalara göre GnRH-a kısa ya da uzun protokollerinde, tek başına veya östrojenle kombine i.m. progesteron ya da vajinal yolla verilen progesterona göre hCG nin üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır (152).

Kontrollü ovaryan hiperstimulasyonu sırasında kullanılan GnRH analogları ve antagonist tedavileri endojen LH üzerinde devam eden baskı oluşturur. Follikül aspirasyonu sonrasında oluşan korpus luteumlar bu nedenle LH uyarısı olmadığı için progesteron üretmezler. Luteal faz desteğinde progesteronlar, östrojenler ve hCG kullanılan ilaçlardır. Progesteron ve östrojen direkt hormonal etki gösterirken hCG korpus luteumdan bu hormonların salgılanması için verilir.

Endometriumu implantasyona hazırlamak ve oluşacak erken dönemdeki gebeliği desteklemek için progesteron takviyesine ihtiyaç vardır.

Progesteron formları :

- Oral tablet (günlük 300-800 mg)
- Vajinal jel % 8 (günlük 90 mg)
- Vajinal tablet (günlük 100-600 mg)

- İntramusküler enjeksiyon (günlük 25-50 mg)

Folikül aspirasyonunun ertesi günü luteal faz desteği için progesteron formları veya hCG (3 günde bir 1.500-2.000 IU dozunda) kullanılabilir. Oral progesteron kullanımının, vajinal (200 mg günde 3 kez) veya İ.M.(25 mg günde 1 veya 2 kez) kullanıma göre yeterli oranda progesteron düzeyi sağlayamadığı bilinmektedir (153). hCG, korpus luteumu indükler, progesteron, östrojen düzeylerini artırır. Etkinliği progesterona üstün değildir ve OHSS riskini de arttırmaktadır (154).

İntramusküler progesteron vajinal yolla karşılaştırıldığında klinik gebelik oranı ve doğum oranı açısından daha etkili olduğu ve tüm tedavi formlarına göre oral progesteronun en etkisiz olduğu görülmüştür. İ.m. ya da vajinal progesterona 2-6 mg oral östrojen eklenmesiyle implantasyon oranının arttığı tespit edilmiştir (153). Kas içi yapılan progesteron lokal reaksiyonlara, abselere neden olabilmektedir, ancak en yüksek kan düzeyini sağlar (155). Metaanaliz sonuçlarına göre, gebelikler karşılaştırıldığında intramusküler uygulama, vajinal forma göre daha üstündür (156).

Luteal faz desteğine gebeliğin 10-12. haftasına kadar devam edilmesi önerilir. Bu dönemden sonra progesteron salgısı plasenta tarafından yapılır.

## **YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ LABORATUARINDA KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI ve KİMYASAL MADDELER**

Semen hazırlığı, oosit toplanması, inseminasyon, mikromanupulasyon işlemleri, embriyo transferi gibi işlemler için çeşitli solüsyonlar ve kültür ortamları mevcuttur. Bu ürünler laboratuvar ortamında hazırlanabilmekte veya firmalarca hazır üretilmiş formları kullanılmaktadır.

Doğal ortamda fertilizasyon ve embriyo gelişim aşamalarının bir kısmı fallop tüplerinin çeşitli bölümlerinde olmaktadır. Oosit ampulla kısmında fertilize olarak mitoz ile bölünüp morula aşaması boyunca fallop tüplerinde ilerler, uterusu ulaştığında blastokist şeklindedir. Tubal ortamı oluşturan tüplerin endotel hücreleri menstruel siklus boyunca hormonal değişikliklere yanıt vermektedir. Eğer bu sistem in vitro ortamda taklit edilecek ise perfüzyon sistemi ilişkili komplike bir kültür sistemi gereklidir. Böyle bir sistem ko-kültür yöntemiyle sağlanabilir ancak henüz hücresel ihtiyaçlara optimal cevap verebilen ko-kültür sistemi mevcut değildir.

## **Kültür Ortamlarının Yapısı**

YÜT de kullanılan kültür ortamları, sperm ve oosit gibi üreme hücrelerinin ve daha sonra embriyonun bulunduğu doğal ortamlara benzer solüsyonlardan oluşmaktadır. Çeşitli maddelerin belirli oranda sudaki çözeltileridir. 1960 'lı yıllarda Krebs ve Ringer tarafından geliştirilen basit kültür ortamları (simple culture media) temel yapısı bikarbonat tampon sistemi içerisinde  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  gibi iyonlardan oluşmaktadır. Eklenen protein (serum veya albumin) hem embriyoların gelişimi için hem de cam pipetlere ve kültür ortamına embriyoların yapışmasını önlemek için gereklidir. Glukoz, pürivat, laktat enerji kaynağı olarak ilave edilmektedir. Bu ilk ve nispeten basit mediumlara örnek Earle's balanced salt solution, HTF, P1, M16, T6 bazı örneklerdir.

Kompleks yapıdaki kültür ortamları (complex culture media) basit kültür ortamlarındaki maddelere ek olarak aminoasitler, vitaminler, iz elementler, nükleik asit sentezi için gerekli maddeler ve bazı yağ asitlerini içermektedir. Ham's F10, F12, M199, alfa MEM, B2, IVF-50, M3 v.b. kompleks yapıdaki kültür ortamlarından bazılarıdır. Ancak geliştirilen her iki medium tipide embriyonun blastokist aşamasına erişmesinde yeterli desteği sağlayamamakta, erken klivaj aşamasında embriyonun gelişimini bozabilmektedir. Bu nedenle embriyoların gereksinimlerine göre ardışık kültür ortamları günümüzde tercih edilmektedir.

Optimal kültür ortamının bulundurması gereken çeşitli elementlerden biri olan su medium içeriğinin % 99'unu oluşturur. Karbon filtresinden geçtikten sonra reverse osmosis ve ultrafiltrasyona uğramış deiyonize, distile, steril suyun kullanılması tercih edilmelidir. Asidite önemli olan diğer bir parametredir. Ortamın pH sı yaklaşık 7.4 olmalıdır. Bu değer kan pH sı ile aynı olmakla birlikte bu asidite fertilizasyon ve embriyo gelişimi için uygun kabul edilmektedir. Doğal fertilizasyonda oositin ilerlediği yolda foliküler sıvıdan başlayarak fallop tüpleri, uterin kavite gibi bölgelerde çeşitli pH değerleri mevcuttur. Foliküler sıvı da pH 7,3, fertilizasyonun gerçekleştiği fallop tüplerinde pH 7,6, implantasyonun oluşacağı uterin kavitede pH 6,8 düzeyindedir. Tüm bu safhalarda oositin pH'sı değişmeden kalır. Hücreyi pH değişikliklerinden korumak açısından kültür ortamlarının tampon içermesi gerekmektedir. Bu amaçla sık kullanılan sistem  $\text{HCO}_3^-$ (bikarbonat)/ $\text{CO}_2$  tampon sistemidir. Mediumlar içerdikleri  $\text{HCO}_3^-$  nedeniyle hava ile temas ettiklerinde kısa sürede pH yükselmesine neden olurlar. Bu nedenle  $\text{CO}_2$  oranını % 5' te tutmak amacıyla işlem öncesinde kültür ortamlarının yaklaşık 16 saat süreyle % 5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübatörde bekletilmesi gerekir. İnkübatör dışında yapılacak

işlemlerde gaz değişiminin yaratacağı olumsuzlukları önlemek için yağ altında çalışılmalı ve HEPES (hidroksietilpiperazinethansülfonik asit) solüsyonları kullanılmalıdır. Mediumun osmolaritesinin kan plazmasındaki gibi 285 mOsm olması uygundur. Herhangibir kültür ortamını tuz solüsyonları oluşturmaktadır. Kan plazmasının mineral içeriğine benzer hazırlanmaktadır. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> gibi iyonlar belli konsantrasyonlarda bulunmalıdır.

Kültür ortamında protein bulunması gereklidir. Sabit nitrojen kaynağı yaratmanın yanında su, cam, plastik maddelerle geçebilen, embriyonun gelişimini olumsuz etkileyecek toksik metal iyonları için de bağlayıcı görev yapar. Proteinler embriyoların cam pipetlere ve kültür kaplarına yapışmalarını engeller. Serum veya albumin eklenmesi yararlıdır. Saf olması nedeniyle human serum albumini eklenmesi tercih edilir.

Birçok çalışma oosit ve embriyonun enerji kaynaklarının laktat, piruvat, glukoz olduğunu ortaya koymuştur. Klivaj aşamasında glukoz embriyoya zararlı iken blastokist aşamasında glukoz ileri derecede ihtiyaç oluşur. 8 hücreli evreye dek piruvat tercih edilirken sonrasında glukoz enerji kaynağı olmalıdır. Kültür ortamlarına fallop tüplerinde ve uterin kavitedeki sıvıya benzer şekilde aminoasitler, vitaminler, iz elementler, büyüme faktörleri eklenebilmektedir.

Çeşitli firmalarca üretilen kalite testleri yapılmış, kullanıma hazır kültür ortamları vardır. Günümüzde geliştirilmiş ardışık kültür solüsyonları birçok YÜT laboratuvarında kullanılmaktadır. Bu solüsyonlar embriyo gelişiminin 3. gününe kadar 1. step medium, 3-5. gününe kadar 2. step medium şeklinde hazırlanmışlardır. Bunların bazıları Earle's solüsyonu, HAM's F10 ve 12 (Medi-Cult ürünleri gibi), bazılarıda HTF içeren mediumlar (Scandinavian IVF Science ürünleri gibi). Bu ürünlerin belirli raf ömrü olması, ulaşımda soğuk zincir gerektirmeleri, pahalı olmaları dezavantajlarıdır.

## İMPLANTASYON

IVF/ICSI-ET; kadın infertilitesi ve erkek sterilitesi tedavisinde önemli metodlardan biridir, ancak başarı oranı sadece % 30 civarındadır. İnsan reproduktivitesinde klinik gebelik oranlarının nasıl geliştirileceği en önemli sorulardan birisidir. IVF prosedüründe embriyo implantasyon basamağı kompleks ve çok evreli bir süreçtir ki IVF başarısızlığına neden olabilir (157). Endometrium; epitelyal, stromal, endotelyal hücreleri ve lökositleri ihtiva eden farklı hücresel kompartmanı ile kompleks bir dokudur. Ayrıca menstrüel siklus esnasında

morfolojik, biyokimyasal ve moleküler alanda seri değişikliklerin olduğu dinamik bir dokudur. Endometrium, gebeliğin oluşabilmesi için ovarian steroidler olan östrojen ve progesteronun etkisiyle implantasyon penceresi olarak tanımlanan bir aralıkta embriyonun apozisyonuna, adezyonuna ve epitelyal hücrelerin arasına trofoblast invazyonuna reseptif hale gelir. Diğer yandan IVF-ET sikluslarında iyi kalitede (şekil ve hücre sayısı bakımından iyi durumda olan) embriyolar kullanılsa bile implantasyon başarısızlığa uğrayabilir. Bu nedenle başarılı bir implantasyon için IVF prosedüründe başarıyı sınırlandıran bir basamak olan reseptif endometriumun geliştirilmesi önem arzeder. alışmalar implantasyon yeteneğini tahmin ettirebilecek biyolojik markerları tanımlamak ve endometriumun gelişmesine müdahale etmeye yöneliktir (158,159,160,161,162,163,164). Ancak klinik tanı ya da araştırmalar için midsekretuar endometrium elde edilmesi güçtür. İmplantasyon başarısızlığı, iyi morfolojideki embriyoların normal bir uterusu tekrarlanan transferlerine rağmen başarılı bir implantasyon ve gebelik oluşamamasıdır. İmplantasyon oranlarını artırmak amacıyla birkaç yaklaşım ortaya konulmuştur. Bu yaklaşımlar; mekanik, kimyasal ya da laser metodu ile embriyonun zona pellusidasının inceltilmesi (assiste hatching gibi), (165), blastokistin adhezivitesini artırmak için fibrin sealat ve hyaluronik asit gibi çeşitli tipte medyumların kullanılması (166,167) ve zigotun fallop tüpüne laparoskopik olarak yerleştirildiği ZIFT tekniği ile implantasyon çevresinin değiştirilmesi (168) olarak sıralanabilir. Tüm bu prosedürlerin implantasyon oranlarını ve gebelik sonuçlarını geliştirmedeki gerçek etkisi tartışmalı olarak kalmıştır (169). Sonuçta başarılı bir implantasyon sadece embriyo kalitesine bağlı değildir ve endometrial reseptiviteyle de ilişkilidir. Bu nedenle embriyo transferinin gerçek zamanlaması etrafında endometrial reseptiviteye odaklanıldı.

Reseptif endometrium formasyonu, östrojen ve progesteron seks steroidleri vasıtası ile indüklenen morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri kapsar. Östrojen proliferatif faz olarak adlandırılan menstrüel siklusun ilk yarısında sekrete edilir. Progesteron siklusun sekretuar fazındaki predominant seks steroididir ki; yüksek miktarlarda sitokin ve büyüme faktörlerini sekrete eden büyük glandların formasyonu ile karakterizedir. İnsanlarda menstrüel siklusun midsekretuar fazında (19.-23. günler) uterus reseptif hale gelir. Bu aralık LH pikinden sonra 7-10 gün sürer ve implantasyon penceresi olarak bilinir (170). İmplantasyon penceresi esnasındaki morfolojik değişiklikler, fibroblast benzeri endometrial hücrelerin daha büyük ve yuvarlak desidual hücrelere dönüşümünü (desidualizasyon) ve lümen epitelinde mikrovillus ve büyük apikal çıkıntılarını (pinopod) ortaya çıkmasını içerir (171,172). Paralel olarak farklı sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, transkripsiyon faktörlerinin ve prostaglandinlerin

ekspresyonunun modülasyonu yer alır. İnsan endometrial hücrelerinde midsekretuar faz esnasında özellikle IL-11 ve LIF ekspresyonunun artışı gözlemlendi (173,174). Bu çizgiye göre in vitro çalışmalar IL-11 yolu üzerinden PGE2 ve relaksinin kültür edilmiş insan stromal hücrelerinde progesteronun indüklediği desidualizasyonu genişleterek hareket ettiğini destekler (175). Gap junction proteini olan Cx43'ün endometrial ekspresyonu, başarılı bir implantasyon için olası bir parametredir (176). Diğer yandan implantasyon penceresi esnasında hoxc10, hoxc 11, hoxd 10 ve hoxd 11 gibi HOX küme genlerinde azalma gözlemlendi ki bu transkripsiyonel baskılayıcıların implantasyon için endometriumun hazırlanmasına engel olabileceğini destekler (177).

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

Ocak 2008–Mart 2009 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine infertilite nedeniyle başvuran ve daha önceden bir ya da daha fazla başarısız IVF siklusu geçirmiş hastalar, ICSI-ET (intrasitoplazmik sperm injeksiyonu–embriyo transferi) yapılması amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek, aydınlatılmış onamları alınmıştır. Çalışmamız fakültemiz etik kurulu onayını da almıştır.

Çalışmaya alınan hastaların hepsine uzun protokol (GnRH analogu ile down regülasyon) agonist tedavisi sonrası recFSH ve/veya HMG kullanılarak kontrollü ovarian hiperstimülasyonu uygulanmıştır. Kontrol grubundaki (Grup 1) hastalara kontrollü ovarian hiperstimülasyon ardından ICSI- ET uygulanırken çalışma grubundaki (Grup 2) hastalara ise, ICSI-ET planlanan KOH siklusundan bir önceki siklusun luteal fazında bir hafta aralıklarla iki kez endometrial biyopsi uygulanarak endometriumda lokal hasar oluşturulmuştur.

Çalışmaya alınma kriterleri :

- Yaş >24 , <38 (yirmi dört yaş üstü-otuz sekiz yaş altı) olanlar,
- Vücut kitle indeksi (BMI) 18-29 arasında olanlar,

- Primer ya da sekonder infertilite nedeniyle başvuran tubal faktör, ovulatuvar faktör veya erkek faktörü tespit edilerek ICSI için tedavi endikasyonu bulunanlar,
  - Açıklanamayan infertilite grubunda olanlar,
  - Erkek infertilitesi, tubal faktör ya da ovulatuvar faktör nedenli infertilitesi olanlar,
  - Daha önceden bir ya da daha fazla başarısız IVF siklusu geçirmiş hastalar,
  - Over rezervi normal tahmin edilenler, menstruasyonun 3. günü yapılan transvajinal ultrasonografide antral folikül sayısı 5 - 10 olan hastalar ,
  - Menstruasyonun 3. günü bazal FSH değeri <15, E<sub>2</sub> değeri <80 pg/ml olanlar,
  - Prolaktin seviyesi ve tiroid fonksiyon testleri normal olanlar
- çalışmaya kabul edildi.

#### Çalışmaya alınmama kriterleri:

- İleri yaş (yaş>38) olanlar,
  - Klinik olarak anlamlı sistemik veya endokrinolojik hastalığı olanlar (diabetes mellitus, Cushing hastalığı, tiroid fonksiyon bozukluğu, hiperprolaktinemi... ),
  - Otoimmün seroloji profili olanlar ya da trombofiliye eğilimi olanlar,
  - Histerosalpingografi, sonohisterografi veya ofis histeroskopi ile daha önce uterin kavitede submükoz myom, polip, septum, sineşi gibi yer kaplayan lezyon tespit edilenler,
  - Geçirilmiş over ya da uterus cerrahisi anamnezi verenler,
  - Daha önceki sikluslarında over cevabı kötü olanlar (poor responder)
  - Endometriozis ve/veya endometrioma olanlar,
  - Ultrasonografide hidrosalpinks tesbit edilenler,
  - Yeterince matür oosit elde edilemeyenler,
  - Kontrollü ovulasyon indüksiyonu esnasında erken dönemde aşırı yükselen E<sub>2</sub> (E<sub>2</sub> >3000 pg/ml) varlığında ovaryan hiperstimulasyon sendromunu (OHSS) önlemek amacıyla siklus iptali yapılan hastalar
- çalışma dışı bırakıldı.



## **Hastaların Değerlendirilmesi**

Seçilen hastalar ile ilk görüşmede yaş tespiti yapıldı, obstetrik ve jinekolojik geçmişleri sorgulandı. Fizik muayeneleri ve rutin jinekolojik muayeneleri yapıldı. Kan basıncı, boy, ağırlık, vücut kitle indeksi hesaplamaları kaydedildi. Tedavi öncesi açlık kan şekeri, üre, kreatinin, SGOT, SGPT, elektrolitler, tiroid fonksiyon testleri gibi biyokimyasal taramalar yapıldı. Bazal FSH, LH, E<sub>2</sub>, prolaktin değerleri ölçüldü (Beckman ,Coulter kiti ile).

Erken folliküler fazda ultrasonografi yardımıyla pelvik alan patolojileri değerlendirildi. Uterus boyutları, endometrium kalınlığı, over boyutları, follikül sayısı ve çapları ölçüldü. Bu işlemde General Electric Alfa Logic 200 ve Logic 400 markalı ultrasonografi cihazları ve 5 MHz vajinal prob kullanıldı.

Değerlendirme sonrasında çalışma kriterlerine göre seçilen hastalar randomize olarak gruplandırıldı. Hepsine uzun protokol (GnRH analogu ile down regülasyon) agonist tedavisi sonrası r-FSH ve/veya HMG kullanılarak kontrollü ovaryan hiperstimulasyonu uygulandı.

## **Tedavi Protokolü**

Tedaviye seçilen hastalara menstrüel siklusun 21. gününde subkutan 1 mg /gün dozunda Leuprolide asetat (Lucrin; Abbott, Fransa) uygulaması başlandı. Hastaların tümü bu siklusta hormonal olmayan kontraseptif yöntemlerinden biriyle korundu.

Kontrol grubundaki (Grup 1) hastalara standart olarak GnRH analogu ile down regülasyon yapılırken çalışma grubundaki (Grup 2) hastalara ise, analog tedavisine başlanmasıyla birlikte bir hafta aralıklarla iki kez endometrial biyopsi uygulanarak endometriumda lokal hasar oluşturuldu. Endometrial biyopsi, biyopsi kateteri (Pipelle; de Cornier, Prodimed, Neuilly-en-Thelle, Fransa) ile yapıldı. Endometrial biyopsi, enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla steril şartlarda yapıldı ve işlemden önce hastalara tek doz proflaktik antibiyotik verildi. Uterin rüptür gibi herhangi bir komplikasyonun gelişmemesi için biyopsi kateteri nazıkce uygulandı. Kateter, servikal ostan geçirilip uterin kavite içersinde döndürülerek 3-4 kez uygulandı.

Takip eden menstruasyonun 2-3. gününde veya menstruasyonu olmayan hastalar için en az 14 gün süreyle GnRH analogunun uygulanması sonrasında serum östrojen (E<sub>2</sub>) düzeyinin 50 pg/ml altında, endometrial kalınlık <5mm, transvajinal ultrasonografide aktif follikül izlenmemesi kriterleri sağlanan hastalar, down regülasyon olarak kabul edilerek

menstruasyonun 2-3. gününde hastaya uyarlanmış uygun dozda gonadotropin tedavisi [recFSH; Puregon (Organon), Gonal F (Serono), u-FSH/HMG; Merional (IBSA), Menagon (Ferring)] başlandı. Başlangıç dozu belirlenirken her olgu için tahmini over cevabı göz önüne alındı. Ortalama 225 IU/gün dozunda subkutan/I.M. gonadotropin uygulaması başlatılırken GnRH analoguna (Leuprolide asetat; Lucrin, Abbott) ara verilmeden 0.5 mg/ gün dozuna azaltılarak hCG gününe dek tedaviye devam edildi. Stimulasyonun 5-6. gününden itibaren transvajinal ultrasonografi ile folliküllerin sayı ve boyutları, endometrium kalınlığı ve serum östrojen (E<sub>2</sub>) düzeyleri kaydedildi. Over cevabına göre doz artırılarak veya azaltılarak ayarlandı. İki-üç gün aralıklarla follikül gelişimi transvajinal ultrasonografi ve serum östrojen (E<sub>2</sub>) seviyeleri ile takip edildi. Önde giden follikül 18-20 mm olduğunda veya folliküllerden ikisi 17 mm olduğunda üriner hCG 10.000 IU (Pregnyl amp; Organon, Türkiye) I.M. uygulanarak ovulasyon tetiklendi.

Folikül aspirasyonu ile oosit toplama işlemi, hCG uygulamasını takip eden 35-37. saat aralığında yapıldı. Vajen steril serum fizyolojik sıvısı ile yıkandıktan sonra her iki lateral fornixe lokal anestetik madde enjeksiyonu uygulandı. Aspirasyon iğnesi takılı transvajinal prob steril kılıf içine sarıldı. 16-17 G' luk iğne yardımıyla, en uygun vakum basıncında (100-200 mmHg) transvajinal ultrasonografi eşliğinde 17-22 mm boyutundaki tüm folliküllere girilerek sıvı, kumulus hücreleri ve oositler toplandı.

Semen örnekleri masturbasyon yöntemiyle, genelde 2-4 günlük cinsel perhiz sonrasında, follikül aspirasyonunun yapılacağı gün işlemden birkaç saat önce toplandı. Her iki grupta da eşit olarak 3'er, toplam 6 hastanın spermleri TESA/TESE yöntemiyle elde edildi.

Oosit toplanması işlemini takiben uygun ve yeterli sayıda oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulandı. Döllenen oositlerin, kültür dishi içersinde uygun laboratuvar koşulları altında (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem, 37° C sıcaklıkta) gelişmesi takip edildi. Takip eden 18. saatte fertilizasyon oranları, 24.-48.-72. saatte embriyo gelişimi değerlendirildi. Oosit toplanmasından sonraki 2.-3. veya 4. günde, en yüksek skora sahip kalitede maksimum 3 adet (Sağlık Bakanlığının sınırladığı sayıda) embriyo seçilerek intrauterin kaviteye ultrasonografi eşliğinde transfer edildi. Transfer katateri olarak Wallace 23 mm soft kateter (Smiths, İngiltere) kullanıldı. Çalışmamızda follikül aspirasyonu ve embriyo transfer işlemleri aynı hekim tarafından gerçekleştirildi.

Tüm hastalara luteal faz desteği folliküllerin aspire edildiği gün akşamı başlandı. İnvajinal mikronize progesteron 3\*200 mg (Progestan yumuşak kapsül; Koçak ilaç,

Türkiye), intramüsküler progesteron 25 mg/gün (Progestan in oil), 5 gün süreyle prednol tablet 16 mg/ gün p.o. (Mustafa Nevzat, Türkiye) ve gebelik sonucu belli olana dek Estraderm TTS 100 (Novartis Pharma, Basel, İsviçre) ile 100 microgram/ gün aşırı değiştirilerek kullanımı önerildi.

12-14 gün sonra serumda  $\beta$ hCG bakıldı ve  $>10$  microIU/ml ise pozitif kabul edildi.  $\beta$ hCG pozitifliği saptanan hastalar haftalık USG takibine alındı. Endometrial kavitede tesbit edilen gestasyonel kese sayısı kaydedildi. Kardiak aktivite saptanan vakalar klinik gebelik olarak, 12. gebelik haftasını dolduranlar ise devam eden gebelik olarak kabul edildi. Gebelik oluştuğu takdirde vajinal progesterona 10. gebelik haftasına dek devam edildi.

### **Gruplar arasında karşılaştırılan parametreler**

Her iki grup arasındaki parametreleri karşılaştırmada elde edilen kriterlere uygun olarak student's T Testi , chi- kare testi ve Mann Witney –U testleri kullanıldı.  $p<0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ve Grup 2 arasında; yaş, infertilite nedeni, başarısız IVF siklus sayısı, önceden transfer edilen embriyo sayısı, indüksiyon gün süresi, indüksiyon için kullanılan toplam gonadotropin dozu, hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri, folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrason ile ölçülen endometrium kalınlıkları, toplanan MII oosit sayıları, fertilizasyon oranı, fertilize olan embriyolardan transfere uygun kalitede gelişen embriyo sayısının oranı, transfer edilen embriyo sayıları, embriyoların transfer edildiği gün, transfer edilen embriyoların kalitesi (grade), implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

## BULGULAR

Grup 1(kontrol grubu) 50, Grup 2 (çalışma grubu) 50 hasta çalışma kriterlerine uygun bulundu. Hastalar randomize edilerek çalışmaya dahil edildi. Analog tedavisine başlanmasıyla birlikte bir hafta aralıklarla iki kez endometrial biyopsi uygulanarak endometriumda lokal hasar oluşturulan grup çalışma grubu olarak belirlendi. Kontrol grubunda ise endometrial biyopsi uygulanmadı ve rutin ICSI işlemleri ve embriyo transferi gerçekleştirildi.

Her iki grup için uygulanan ovulasyon induksiyonuna yanıt ile ilgili parametreler Tablo 8’de belirtilmiştir. Yaş, infertilite nedeni, başarısız IVF siklus sayısı, önceden transfer edilen embriyo sayısı, indüksiyon gün süresi, indüksiyon için kullanılan toplam gonadotropin dozu (IU), hCG günü ölçülen serum E<sub>2</sub> değerleri (pg/ml), follikül aspirasyonu günü transvajinal ultrason ile ölçülen endometrium kalınlıkları (mm), siklus başına toplanan ortalama MII oosit sayıları, fertilizasyon oranı, fertilize olan embriyolardan transfere uygun kalitede gelişen embriyo sayısının oranı, transfer edilen embriyo sayıları, embriyoların transfer edildiği gün, transfer edilen embriyoların kalitesi (grade) açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.

Hastaların yaş aralığı 24-38 idi. Grup 1 de ortalama yaş değeri  $30,8 \pm 4,5$ , Grup 2 de  $29,6 \pm 3,8$  olup gruplar arasında yaş açısından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0,05$ ).

**Tablo 9. Kontrol ve Çalışma gruplarının ovaryan hiperstimülasyonu parametreleri**

ÖZELLİKLER		KONTROL GRUBU (Grup 1) ort.±SD n=50	ÇALIŞMA GRUBU (Grup 2) ort.±SD n=50	İSTATİSTİKSEL DEĞERİ (P)
Yaş ortalaması		30,8 ± 4,5	29,6 ± 3,8	<i>P</i> > 0.05
İnfertilite nedeni	Açıklanamayan infertilite	14 (%28)	10 ( %20)	<i>P</i> > 0.05
	Tubal Faktör	9 (%18)	11 (%22)	<i>P</i> > 0.05
	Ovulatuvar Faktör	12 (%24)	13 (%26)	<i>P</i> > 0.05
	Erkek Faktörü	15(%30)	16 (%32)	<i>P</i> > 0.05
Başarısız IVF siklus sayısı:	1	38 (% 76)	31 (% 62)	<i>P</i> > 0.05
	2	9 (% 18 )	16 (% 32)	<i>P</i> > 0.05
	3	3 (% 6)	3 (% 6 )	<i>P</i> > 0.05
Önceden transfer edilen embriyo sayısı		2,68	2,42	<i>P</i> >0.05
İndüksiyon süresi (gün)		10,52 ± 1,1	10,48 ± 1,0	<i>P</i> > 0.05
Toplam gonadotropin miktarı (IU) (recFSH+HMG)		3087,7 ± 498,2	3075 ± 461,9	<i>P</i> > 0.05
hCG günü serum E <sub>2</sub> (pg/ml)		2003,3 ± 410,9	2025,9 ± 414,2	<i>P</i> > 0.05
hCG günü endometrial kalınlık (mm)		10,3 ± 1,4	10,8 ± 1,6	<i>P</i> > 0.05
Siklus başına ortalama MII oosit sayıları		8,4 ± 1,8	8,5 ± 1,6	<i>P</i> > 0.05

(Ortalamalar için eşitlik testi, bağımsız örnekler için T testi, p değeri >0.05 istatistiksel anlamsız, p değeri <0.05 istatistiksel anlamlı )

İnfertilite nedenlerine bakıldığında; açıklanamayan infertilite tanısı alan hasta sayısı ve yüzdeleri Grup1’de 14 (% 28) ve Grup 2’de 10 (% 20) iken tubal faktör tanısı alan hasta sayısı ve yüzdeleri Grup1’de 9 (% 18) ve Grup 2’de 11 (% 22), ovulatuvar faktör tanısı alan hasta sayısı ve yüzdeleri Grup1’de 12 (% 24) ve Grup 2’de 13 (% 26), erkek faktörü tanısı alan hasta sayısı ve yüzdeleri Grup1’de 15 (% 30) ve Grup 2’de 16 (% 32) idi. Her iki grup arasında anlamlı farklılık tesbit edilmemiştir ( $P>0,05$ ).

Hastaların önceden geçirdikleri başarısız IVF siklus sayıları ve oranları her iki grup için benzerdi. Hastaların en az 1, en çok 3 başarısız IVF siklusu geçirdiği tespit edilmiştir. Grup 1’de toplam 1 başarısız IVF siklusu geçiren hasta sayısı 38 (% 76) iken Grup 2’de 31 (% 62); Grup 1’de toplam 2 başarısız IVF siklusu geçiren hasta sayısı 9 (% 18) iken Grup 2’de 16 (% 32); Grup 1’de toplam 3 başarısız IVF siklusu geçiren hasta sayısı 3 (% 6) iken Grup 2’de 3 (% 6) olarak gözlenmiştir. Her iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $P>0,05$ ).

Hastaların daha önceden geçirdikleri başarısız IVF sikluslarında transfer edilen toplam embriyo sayıları karşılaştırıldığında, Grup 1 ve Grup 2 için sırasıyla 134 ve 121; ortalama embriyo sayıları ise sırasıyla 2,68 ve 2,42 olarak tesbit edilmiştir. Her iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $P>0,05$ ).

İndüksiyon süreleri her iki grup için benzerdi. En uzun 13 gün en kısa 9 gün ovulasyon indüksiyon zamanı kaydedildi. Grup 1 ve Grup 2 için ortalama indüksiyon süreleri sırasıyla  $10,52 \pm 1,1$  gün ve  $10,48 \pm 1,0$  gün olarak bulundu. Her iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu ( $P>0,05$ ).

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu uygulamasında tüm indüksiyon süresince toplam kullanılan gonadotropin (recFSH ve/veya HMG) doz aralığı Grup 1 ve Grup 2 için 1650-3850 IU olarak hesaplandı. Toplam ortalama kullanılan dozlar ise sırasıyla Grup 1 ve 2 için  $3087,7 \pm 498,2$  IU ve  $3075 \pm 461,9$  IU idi. Her iki grupta kullanılan toplam gonadotropin dozları açısından anlamlı farklılık bulunamadı ( $P>0,05$ ).

Grup 1’de hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri en düşük 1314 pg/ ml, en yüksek 3200 pg/ ml idi. Grup 2 için en düşük serum  $E_2$  değeri 1302 pg/ml, en yüksek serum  $E_2$  değeri 3200 pg/ ml olarak tespit edildi. Her iki grubun ortalama serum  $E_2$  değerleri sırasıyla Grup 1

ve Grup 2 için  $2003,3 \pm 410,9$  pg/ml ve  $2025,9 \pm 414,2$  pg/ml olarak bulundu. hCG günü ölçülen serum E<sub>2</sub> değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $P > 0,05$ ).

Folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrasonografi yardımıyla işlem başlamadan önce ölçülen endometrium kalınlıkları Grup 1 için 7,5-13,5 mm aralığında, Grup 2 için 7,3-13,5 mm aralığında ölçüldü. Ortalama değerler Grup 1 ve Grup 2 için sırasıyla  $10,3 \pm 1,4$  mm ve  $10,8 \pm 1,6$  mm olup her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilememiştir ( $P > 0,05$ ).

Grup 1’de toplanan oositler içinde metafaz II (M II) safhasındaki oosit sayısı toplam 424, siklus başına ortalama  $8,48 \pm 1,8$ , Grup 2’de M II oosit sayısı toplam 429, siklus başına  $8,58 \pm 1,6$  olarak hesaplandı. Her iki grup arasında elde edilen M II oosit sayıları açısından anlamlı fark yoktu ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 10. Kontrol ve Çalışma gruplarının ICSI işlemi sonrası parametreleri**

<b>ÖZELLİKLER</b>	<b>KONTROL GRUBU (Grup 1)</b> (%) veya ort.±SD n=50	<b>ÇALIŞMA GRUBU (Grup 2)</b> (%) veya ort.±SD n=50	<b>İSTATİSTİKSEL DEĞERİ (P)</b>
Fertilizasyon oranı (%)	% 55.88	% 54.08	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
Transfere uygun kalitede gelişen embriyo sayısı oranı	% 43.96	% 44.04	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
Transfer edilen ortalama embriyo sayısı	2,82	2,76	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
Ortalama transfer günü	2,8	2,8	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
Transfer edilen embriyo kalitesi (grade)	3.77	3.67	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
İmplantasyon oranı	% 30.88	% 34.67	<b><i>P &gt; 0.05</i></b>
Klinik gebelik oranı	17 (% 34)	30 (% 60)	<b><i>P &lt; 0.05</i></b>
Canlı doğum oranı	12 (% 24)	22 (% 44 )	<b><i>P &lt; 0.05</i></b>

(Ortalamalar için eşitlik testi, bağımsız örnekler için T testi ,p değeri > 0.05 istatistiksel anlamsız, p değeri < 0.05 istatistiksel anlamlı )

Fertilizasyon oranları ( 18-21. saatlerde tespit edilen ) karşılaştırıldığında, her iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ( $P > 0.05$ ). Ortalama değer Grup 1’de % 55.88, Grup 2’de % 54.08 olarak hesaplandı.

ICSI işlemi yapılan ve fertilize olan embriyolar transfer günü değerlendirildiğinde, transfere uygun kalitede gelişen embriyo sayısının oranı Grup 1’de % 43.96, Grup 2’de % 44.04 idi. Her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi ( $P > 0.05$ ).

Gelişen embriyolar arasından en iyi kalitedekiler seçilerek yapılan embriyo transferlerinde, Grup 1 için ortalama 2,82, Grup 2 için ortalama 2,76 embriyo transfer edildi. Her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi ( $p > 0.05$ ).

Embriyolar ICSI işleminden sonraki 2- 3 veya 4. günde transfer edildi. Grup 1 ve Grup 2 için ortalama transfer günü aynı olup 2,8. gün embriyo transfer işlemi yapılmıştır ( $p > 0.05$ ).

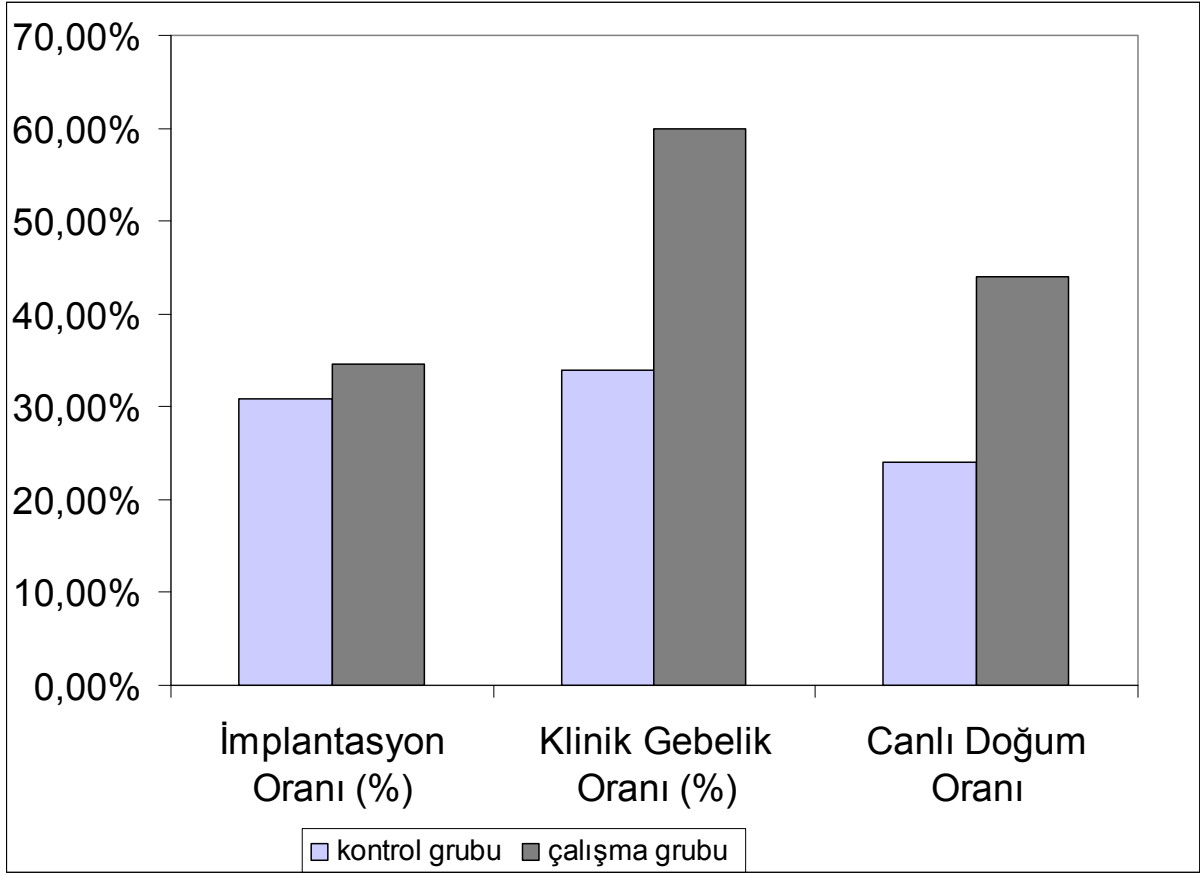
Transfer edilen embriyoların kalitesi (grade) değerlendirildiğinde Grup 1 için  $3.77 \pm 0,3$ ; Grup 2 için  $3.67 \pm 0,5$  olarak hesaplanmıştır, iki grup arasında ortalama transfer edilen embriyoların kalitesi açısından anlamlı fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Transferden 12-14 gün sonra serumda  $\beta$ hCG bakılarak  $>10$  microIU/ml ise biyokimyasal gebelik pozitif kabul edildi.  $\beta$ hCG pozitifliği saptanan hastalar haftalık USG takibine alındı. Endometrial kavitede tesbit edilen gestasyonel kese sayısı kaydedilerek transfer edilen embriyoların ne kadarının implante olduğu hesaplandı. İmplantasyon oranları Grup 1’de % 30.88, Grup 2’de % 34.67 idi. Her iki grup arasında implantasyon oranları açısından istatistiksel farklılık saptanmadı ( $p > 0.05$ ). Ancak Grup 2’deki % 34.67 implantasyon oranı klinik olarak anlamlı değerlendirildi (Grafik 1).

USG’de kardiyak aktivite saptanarak klinik gebelik pozitif kabul edilen hasta sayısı Grup 1’de 17 (% 34), Grup 2’de 30 (% 60) hasta idi. Klinik gebelik oranları karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p = 0.009$ ) (Grafik 1).

Canlı doğum oranları karşılaştırıldığında hasta sayısı Grup 1’de 12 (% 24), Grup 2’de 22 (% 44) hasta idi. Canlı doğum oranları karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p = 0.03$ ) (Grafik 1).





**Grafik 1. İmplantasyon, Klinik gebelik ve Canlı doğum oranları**

## TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda endometrial örnekleme yardımıyla oluşturulan endometrial hasarın implantasyon ve gebelik oranlarına olan etkisini araştırdık. Hastalar çalışmaya alınmadan önce intrauterin patoloji (intrauterin adezyon, submüköz myom. gibi) varlığı, otoimmün seroloji profili, trombofiliye eğilim ve genetik yönünden araştırmalar yapıldı. Tüm araştırmalar sonucunda herhangi bir patolojik delil elde edilemeyen,  $\leq 38$  yaş, BMI 18-29 kg/m<sup>2</sup> olan hastalar çalışmaya alındı. Poor responder hastalar (hCG gününde <4 follikül saptanan), sistemik hastalığı olanlar, endometrioma ya da USG'de hidrosalpinks tespit edilen hastalar implantasyon başarısını etkileyebileceğinden çalışma dışında bırakıldı. Sonuçta oldukça homojen bir hasta grubu elde edilmeye çalışıldı. Öyle ki oluşturulan hasta grubu randomize olarak çalışma ve kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra yaş, infertilite nedeni, başarısız IVF siklus sayısı ve önceden transfer edilen embriyo sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi.

Önceden yapılan endometrial hasarın implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırıldığı çalışmalarla kıyaslandığında Barash ve ark. ile Raziel ve ark. bizim çalışmamızda olduğu gibi tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaları çalışmaya alırken; Li ve ark. ile Zhou ve ark. ise USG'de endometriumda irregüler eko saptanan hastaları çalışmalarına dahil etmişlerdir.

Endometrial hasar, bizim çalışmamızda IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 21. ve 28. günlerde toplam 2 kez uygulanırken, Barash ve ark. IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 8, 12, 21 ve 26. günlerde toplam 4 kez, Raziel ve ark. IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 21 ve 26. günlerde toplam 2 kez, Li ve ark. embriyo transferinden 2 hafta önce, Zhou ve ark. ise KOH siklusunda embriyo transferinden önce endometrial hasar oluşturdular (178,179,180,181). Barash ve ark. ile Zhou ve ark. endometrium hasarını takiben endometriumun yenilenebilmesi için antibiyotik ve hemostatik ilaç kullanırken, biz ise çalışmamızda sadece tek doz proflaktik antibiyotik kullandık ve herhangi bir enfeksiyona rastlamadık. Endometriuma uygulanan hasar çok fazla derin

olmadığı için endometriyumun reseptivitesini artırmıştır. Hayvan çalışmalarında luteal fazda endometriuma travma ile indüklenen desidualizasyonun yararlı etkileri gösterildiği için bizim çalışmamızda da zamanlama için luteal faz seçilmiştir. Ancak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgulara endometrial hasarlanmanın optimal kaç kere yapılacağı ve en iyi zamanlanmanın ne zaman olması gerektiği konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Endometriyumun çizilerek hasarlanması ve implantasyonun gelişmesi ile ilgili hayvan çalışmalarında gösterilen desidualizasyon ve ardından da uterus reseptivitesinin artması eski bir kanıt olarak temel alınmıştır. Loeb, kobay uterusunu çizmekle gebelikteki desidual hücrelere benzer endometrial hücrelerinde hızlı büyümenin provake edildiğini rapor etmiştir (182).

Fare ya da rat uterusunun içine yağ injeksiyonu ile desidualizasyonun indüklendiğinin gösterildiği gibi endometriuma yapılan hasar da desidualizasyonu indükleyebilir (183).

Ratlardaki deneylerde travmaya cevap olarak uterus tarafından sekrete edilen histaminin muhtemelen alkalı olabileceği ifade edilmiştir (184). Lokal hasarla indüklenen desidual cevabın antihistaminik tedavi ile ratlarda engellenebileceği bunu desteklemiştir (185).

Endometriyum reseptivitesini artıran bir diğer mekanizma olarak endometrial örnekleme ile oluşturulan 'yara iyileşme' etkisinden bahsedilebilir. Yara iyileşme sürecinde sekrete edilen sitokin ve büyüme faktörleri uterin reseptivite üzerine ek olarak uygun bir etki gösterebilir ve böylece blastokistin implantasyonu ve gebelik sağlanabilir (184). İnterlökin-6, interlökin-11, leukaemia inhibitör faktör (LIF), heparin binding epitelyal growth faktör-like growth factor ve amphiregulin gibi birçok sitokin ve büyüme faktörlerinin parakrin ve otokrin sistem içerisinde implantasyon sürecine iştirak ettikleri bulunmuştur (183,186). Endometriuma hasar amacıyla yapılan lokal operasyon, embriyo implantasyonu için yararlı olacak bu regülasyon faktörlerinin ekspresyonunu indükleyebilir (187,188).

Endometriyumun proliferatif fazında uygulanan lokal hasar desidualizasyonu uyarabilir ve implantasyon oranlarını artırabilir (182).

Sonuncu mekanizma ise, geriye doğru gelişim hipotezidir. IVF tedavisi esnasında uygulanan KOH embriyo implantasyonunu negatif olarak etkileyebilir (189,190). Mirkin ve ark. doğal sikluslarla karşılaştırıldığında KOH sikluslarının histolojik ilerleme, pinopod matürasyonunun ilerlemesi ve steroid reseptör down regülasyonunu içeren farklı yapısal ve

fonksiyonel değişikliklerle sonuçlandığını rapor etmişlerdir (191). KOH sikluslarında yüksek konsantrasyonda seks steroidleriyle tedavi edilen hastaların endometriumunda histolojik gelişme ve pinopod matürasyonu daha hızlı ilerleyebilir. Zhou ve ark. KOH siklusu esnasında endometriumu uygulanan hasarın oluşturulan yaradan dolayı endometrial gelişimin geri kalmasına yol açtığını savunmuşlardır. Böylece endometrial gelişimin embriyo gelişimi ile daha denk olabileceğini ve reseptivitenin artabileceğini belirttiler (180). Bu hipotezi desteklemek için endometrial biyopsi materyalinin immünohistokimya, histolojik gözlem, pinopodlar için elektron mikroskopu ile tarama ve moleküler biyolojik çalışmalar gibi daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Lokal hasar, embriyo implantasyonu için endometriumun hazırlanmasında gerekli çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir.

Zhou ve ark. KOH siklusunda embriyo transferinden önce endometrial hasar oluşturdular ve 10. gün endometriumundan gen ekspresyon profilini analiz ettiler. Gebe olan ve olmayan 10 hastanın endometrial biyopsi materyalleri karşılaştırılarak toplam 218 genin mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptadılar. Gebelerde gebe kalamayanlara göre 41 genin up regüle, 177 genin ise down regüle olduğunu gösterdiler. Regülasyonu olan genler moleküler fonksiyonlarına göre 10 gruba ayrıldığında; iyon bağlayan 14 gen, protein bağlayan 12 gen, nükleik asit bağlayan 11 gen, nükleotid bağlayan 7 gen, transferaz aktivitesi gösteren 5 gen, hidrolaz aktivitesi gösteren 5 gen, reseptör aktivitesi gösteren 4 gen, GTPaz regülatör aktivitesi gösteren 3 gen, kanal ya da porlardan taşıyıcı aktivitesi gösteren 3 gen, transkripsiyon faktör aktivitesi gösteren 3 gen, oksidoredüktaz aktivitesi gösteren 3 gen ve iyon taşıyıcı aktivitesi gösteren 3 gen tespit etmişlerdir. Biyolojik fonksiyonlarına göre ise genlerin; % 71.15'i hücrel fizyolojik süreçte, % 42.31'i metabolizmada, % 25'i hücre alışverişinde, % 21.15'i hücrel sürecin regülasyonunda, % 21.15'i lokalizasyonda, % 19.23'ü fizyolojik sürecin regülasyonunda, % 9.62'si biyolojik sürecin down regülasyonunda, % 9.62'si sistemin gelişiminde, % 9.62'si organizmal fizyolojik süreçte, % 9.62'si stres cevabında, % 5.77'si hücre farklılaşmasında, % 5.77'si duyumsal kavrayışta ve % 5.77'si ise abiyotik uyarıya cevapta rol oynar (180).

10.gün endometriumunda implantasyon sürecinde önemli olduğu gösterilen gebelerde regüle olan genlerden en dikkat çekenleri; 2.61 kat up regülasyona (artışa) uğrayan LN $\alpha$ 4 (Laminin alfa 4) geni ve 15.95 kat up regülasyona uğrayan MMP 1 (matriks metalloproteinaz 1) geni ile 4.92 kat down regülasyona (azalışa) uğrayan ITG $\alpha$ 6 (İntegrin alfa 6) genidir (180).

Lamininler, adezyon, migrasyon, proliferasyon, farklılaşma ve hücre survivini içeren hücre fonksiyonların çeşitliliğini düzenlemede temel membranın major parçasıdır (192,193). İntegrinler hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks adezyonunda rol oynayan heterodimerik glikoproteinlerdir.

LN $\alpha$ 4 subuniti, kan damarlarında hücre membranının temel komponentidir ve son veriler  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 ve  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin heterodimerlerinin LN $\alpha$ 4 için hücre yüzeyi adezyon reseptörleri olarak fonksiyon gösterebildiğini belirtmektedir (193).

Takeyama ve ark. ITG $\alpha$ 6 subunit ekspresyonunun gastrointestinal stromal tümörler ile ilişkili olduğunu rapor ettiler (194). Önceki çalışmalar integrinlerin lamininlerle etkileşimde olduğunu ve embriyo implantasyon sürecinde anahtar rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte LN $\alpha$ 4'ün kesin fonksiyonu bilinmemektedir.

Zhou ve ark. LN $\alpha$ 4 ve ITG $\alpha$ 6 ekspresyonlarının farklı up regülasyon ve down regülasyonunu gösterdiler ki, bu sonuç her iki genin de farklı yollardan endometrium gelişiminde önemli rolü olduğunu desteklemektedir (180).

MMP ailesi, embriyonik gelişme, üreme ve doku remodellingi gibi ekstrasellüler matriksin normal fizyolojik süreçte bozulmasında rol oynar. Çoğu MMP inaktif proprotein olarak salgılanır ve ekstrasellüler proteinazlar ile ayrılarak aktive olurlar. MMP 1 geni interstisyel kollojeni yıkan enzimin sekresyonunu kodlar. Hurskainen ve ark. trofoblast invazyon sürecinde tek başına rol oynayan anahtar enzimlerden biri ya da diğer proteinazların hücre yüzey aktivatörü olabileceğini belirttiler.

Kalma ve ark. lokal hasarla indüklenen endometrial reseptivite içinde genleri tanımlamak için biyopsi uygulanan ve uygulanmayan hastalarda mikroarray teknolojisi kullanarak endometriumu karşılaştırdılar. Bir sonraki siklusta IVF tedavisi alacak endometrial biyopsi uygulanan hastalarda 183 genin ekspresyonunun 2-10 kat arttığını, 39 genin ise ekspresyonunun azaldığını gösterdiler (195).

En göze çarpan ve up regülasyona uğrayan, memeli mesanesinde apikal yüzeyi güçlendiren ve sağlamlaştıran dört glikoprotein ailesinin bir üyesi olan uroplakin Ib (UPIb) transmembranal proteindir. UPIa, UPIb, UPII ve UPIII memeli mesanesinde asimetrik membran inşa eden 4 glikoproteindir (196,197). Asimetrik membran birimi normal mesane epitelyum fizyolojisinde önemli rol oynar. Üriner epitelin apikal yüzeyini örten plaklar

oluşturur (198,199). Asimetrik membran biriminde plakları oluşturan UPIa/UPII ve UPIb/UPIII kompleksleridir (200). Bu plaklar mesane distansiyonu esnasında hücreleri parçalanmaktan koruyarak üriner epiteli stabilize eder ve geçirgenlik bariyerini şekillendirir (201,202). UPIb/UPIII kompleksi *Xenopus* yumurtası gibi memeli olmayanlarda da eksprese edilir. Bu sistemde UPIb/UPIII kompleksi sperm-yumurta membran etkileşiminde ve ardından da fertilizasyonda fosfolipaz c'yi aktive eden tirozin kinaz yolu üzerinden yumurta aktivasyonunda rol oynar (203,204). Bu, son zamanlarda komplekste UPIII ile etkileşimle gangliosid GM1 yolu aracılığıyla yumurta aktivasyonu ile desteklenmiştir (205). UPIII, spermin indüklediği yumurta aktivasyonunda önemli olan, karboksi ucu stoplazmik sekansında tirozin fosforilasyon bölgesine de sahiptir (203,204). Kalma ve ark. insan endometriumunda UPIII ekspresyon artışını saptamadılar ve implantasyon için endometriumun hazırlanmasındaki yolakta rolü olmadığını düşündüler (195). UPIII'ün membrandaki lokalizasyonu tamamen UPIb ile dimerizasyonuna bağlıdır (205). Oysa UPIb endoplazmik retikulumdan çıkabilir ve plazma membranına monomer olarak göç eder (206). UPIb'nin bu özel niteliği, glandüler epitelin apikal membranında lokalizasyonuna müsaade etmektedir.

UPIb, tüm üroplakin ailesinin endometriumdan eksprese edilen tek üyesidir. UPIb proteininin glandüler epitelin sekretuar veziküllerinde yerleşimi, endometrial glandlardaki aktivitesini destekleyebilir. Kalma ve ark. ilk kanıt olarak insan endometriumundan UPIb ekspresyonunu, sonra da biyopsi tedavisinden sonra UPIb ekspresyonunda artışı ve bu artışın sürdüğünü hatta izleyen menstrüel siklusta hala yüksek kaldığını gösterdiler. UPIb mRNA seviyelerinin yüksekliği, spontan menstrüel siklusun implantasyon penceresi döneminde (21-24 günler), buna ilaveten biyopsi tedavisini izleyen siklusun 20-21. günlerinde saptanmıştır. İmmünohistokimyasal analizlerde siklusun proliferatif fazından sekretuar fazına değin artış gösteren UPIb endometrial gland epitelinde gösterilmiştir (195).

Biyopsi tedavisi alan hastaların endometrial örneklerinde fosfolipaz A2 (PLA2), adipoz diferensiasyon ilgili protein (ADFP), müsin1 transmembran (MUC1), lizozomal ilişkili membran proteini (LAMP2) diğer artışı gösterilen genlerdir (195). Bu genlerdeki proliferatif fazdan sekretuar faza doğru değişiklikler önceki çalışmalarda DNA mikroarray analizi kullanılarak rapor edilmiştir (207,208).

MUC1'in endometriumdaki seviyeleri, yüksek kan progesteron seviyesine cevaben sekretuar faz esnasında artar (209). MUC1, endometrial reseptivitenin kazanılmasında ve

implantasyonun regülasyonunda merkezi rol oynamaktadır (210,211). MUC1, erken gebelik esnasında da salgılanmaya devam eder ve fagositotik mekanizma üzerinden sinsityotrofoblast vasıtasıyla alınır (212).

Bundan başka farelerde yapılan deneylerde PLA2'nin yokluğu prostoglandinlerin olmamasına neden olarak implantasyonun ertelenmesini ve yavrulamada azalmayı göstermiştir (208).

Zhou ve ark. ile Kalma ve ark. endometriuma uygulanan lokal hasar ile gen ekspresyonu ve gebelik sonuçları arasında ilişki olup olmadığını araştırdılar. Bu bilgiler IVF-ET sonuçlarını tahmin etmede insan endometriumundaki gen ekspresyon profilinin gelecekteki değerlendirmesinde zemin teşkil edebilir.

Tüm bu sonuçlar lokal hasarın embriyo implantasyonu için endometriumun hazırlanmasında gerekli çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek endometrial reseptiviteyi artırdığını desteklemektedir. Yüksek kalitede embriyo transferlerinin yapıldığı IVF başarısızlığı olan hastalarda endometrial reseptivite ile ilgili genlerin spontan yoldan ekspresyonunun artışında bir sorun olabilir. Böyle olgularda endometriuma uygulanan lokal hasar endometrial cevabı kolaylaştırabilir.

Yapılan çalışmalardaki endometrial hasar oluşturulan hastaların ortalama yaşları; Barash ve ark.da  $33.8 \pm 5.8$ , Li ve ark.da  $31.15 \pm 4.23$ , Raziell ve ark. da  $33.1 \pm 4.9$ , Zhou ve ark.da  $31.6 \pm 3.72$  ve bizim yaptığımız çalışmada ise  $29,6 \pm 3,8$  şeklinde idi.

Başarısız siklus sayısı Barash ve ark.da  $4.0 \pm 2.0$  (1-10 aralığında), Raziell ve ark.da  $7.0 \pm 1.9$  (4-11 aralığında) iken bizim çalışmamızda ise 1.44 idi.

Önceden transfer edilen toplam embriyo sayısı; Raziell ve ark.da ortalama 22 (13- 42 aralığında) iken Barash ve ark.da buna yönelik bir veriye rastlanmadı, bizim çalışmamızda ise hastaların sadece en son geçirdikleri başarısız IVF siklusundaki embriyo sayıları kaydedilebildi ve kontrol ve çalışma gruplarında sırasıyla toplam 134 ve 121 embriyo sayıları ile her iki grup oldukça benzer olarak gözlemlendi.

Toplam indüksiyon süresi Barash ve ark.da  $10.1 \pm 2.1$  gün, Li ve ark.da  $10.15 \pm 2.16$  gün, Raziell ve ark.da  $11.0 \pm 1.6$  gün, Zhou ve ark.da  $11.98 \pm 1.98$  gün iken bizim çalışmamızda da  $10,48 \pm 1,0$  gün ile benzer sonuçlar kaydedildi.

HCG günü ölçülen serum E<sub>2</sub> değerleri Barash ve ark. da 6415±2805 pmol/L, Li ve ark. da 5673±2726 pmol/L ve Raziel ve ark. da 2072±1093 pg/ml iken bizim çalışmamızda ise 2025,9 ± 414,2 pg/ ml ile benzer sonuçlar elde edildi.

Folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrasonografi yardımıyla işlem başlamadan önce ölçülen endometrium kalınlıkları kontrol ve çalışma gruplarında sırası ile 10,3±1,4 mm ve 10,8±1,6mm olup her iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmezken, Barash ve ark. ile Raziel ve ark. da endometrium kalınlık ölçümü ile ilgili bir veriye rastlanılmadı.

Toplanan oosit sayısı; Barash ve ark. da 10.4±5.3, Li ve ark. da 9.96±4.37, Zhou ve ark. da 9.58±4.50, Raziel ve ark. da 11.5±5.5 iken bizim çalışmamızda ise 8,58±1,6 olarak hesaplandı.

Bizim çalışmamızda Raziel ve ark. da olduğu gibi tüm hastalara ICSI prosedürü uygulanırken, Barash ve ark., Li ve ark. ile Zhou ve ark. ise konvensiyonel inseminasyon ya da ICSI ya da ikisini birlikte uyguladılar.

Ortalama transfer edilen embriyo sayılarına bakıldığında Barash ve ark. da 3.4±1.0, Raziel ve ark. da 3.3±0.9, Zhou ve ark. da 2.25±0.51 iken yaptığımız çalışmada transfer edilen embriyo sayıları 1-3 arasında olup 2.76 idi.

Barash ve ark. embriyoların % 58'ini 6- 8 hücreli, % 15'ini blastokist şeklinde transfer ederken % 27 oranında da çift transfer rapor ettiler. Bizim çalışmamızda ise eşit büyüklükte düzenli blastomere sahip ve fragmentasyon olmayan embriyolar grade 4 olarak değerlendirildiğinde kontrol ve çalışma gruplarında sırası ile 3.77±0,3; 3.67±0,5 olarak hesaplanmıştır ve iki grup arasında ortalama transfer edilen embriyoların kalitesi açısından anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Diğer çalışmalarda ise transfer edilen embriyoların kalitesini karşılaştıran bir veriye rastlanılmadı.

Barash ve ark. transfer günü olarak 3, 5 ya da 6. günler veya her iki günü seçtiler. Raziel ve ark. OPU'dan 48-72 saat sonra embriyo transferi yaparken bizim çalışmamızda ise OPU'dan sonra 2.-3. ya da 4.gün transfer yapıldı. Çalışma ve kontrol grupları arasında, embriyo transfer günleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Önceki çalışmalarda ise embriyo transfer günleri açısından yapılan karşılaştırma ile ilgili bir veri bulunmamaktadır (178,179,180,181).



Yaptığımız çalışmada bir ya da daha fazla başarısız IVF-ET siklusu geçiren hastalarda IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 21. ve 28. günlerde yapılan endometrial biyopsi ile klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında anlamlı oranda artış saptanmıştır. Kontrol ve çalışma gruplarında sırasıyla implantasyon oranları % 30.88'e karşı % 34.67, klinik gebelik oranları % 34'a karşı % 60 ve embriyo transferi başına canlı doğum oranları ise % 24'e karşı % 44 olarak bulunmuştur. Patolojik incelemeleri yapılan endometrial biyopsi örneklerinin sonuçları, sekretuar endometrium ve ilginç olarak da proliferatif endometrium olarak tespit edilmiştir. Proliferatif endometrium sonucu gelen hastaların infertilite nedenlerinin genelde ovulatuvar faktör olduğu gözlenmiştir.

Barash ve ark. bir ya da daha fazla başarısız IVF- ET siklusu geçiren hastalarda IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 8, 12, 21 ve 26. günlerde yapılan endometrial biyopsi ile implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının anlamlı oranda ve 2 kattan daha fazla arttığını rapor etmişlerdir. Benzer sayıda embriyo transferleri ile kontrol ve çalışma gruplarında sırasıyla implantasyon oranlarını % 14'e karşı % 28, klinik gebelik oranlarını % 30'a karşı % 67 ve embriyo transferi başına canlı doğum oranlarını ise % 23'e karşı % 49 olarak saptadımışlardır (178).

Li ve ark. yaptığı çalışmada, Barash ve ark.nın tespitlerinden daha yüksek oranda başarı kaydedildi. Li ve ark. hormonal stimülasyonun başlangıcında 8 mm'den fazla endometrial kalınlığın saptandığı hastalarda klinik gebelik oranlarının anlamlı olarak daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuç, endometrial kalınlığın OPU günü yerine hormonal stimülasyonun başlangıcında ölçülmesinin IVF gidişatının tahmininde daha değerli bir parametre olduğunu desteklemektedir. Endometriuma uygulanan lokal hasar ile poliplerin ve endometriumdaki anormal kalınlığın ortadan kaldırılması endometrium reseptivitesini artırmaktadır (181,213,214,215).

Li ve ark. embriyo transferinden 2 hafta önce endometriuma yapılan lokal hasarın gebelik oranlarını anlamlı olarak artırdığını gösterdiler. USG'de güçlü eko (polip gibi), irregüler eko ya da endometrial kalınlaşma tespit edilen hastaları çalışmalarına aldılar. Retrospektif olarak toplam 81 hastada yaptıkları çalışmada çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla implantasyon oranlarını % 30 ve % 6.52; klinik gebelik oranlarını % 68.57 ve % 13.88, canlı doğum oranlarını ise % 48.57 ve % 11.11 olarak rapor ettiler(181).

Raziel ve ark. yüksek oranda implantasyon başarısızlığı olan (taze embriyo ile yapılan  $\geq 4$  IVF denemesi ve  $\geq 12$  toplam transfer edilen taze embriyo sayısını sağlayan ancak

beraberinde klinik gebelik elde edilemeyen) bir grup hastada IVF tedavisinden önceki spontan menstrüel siklusta 21. ve 26. günlerde yapılan endometrial biyopsi ile çalışma ve kontrol gruplarında sırası ile implantasyon oranlarını % 11'e karşı % 4, klinik gebelik oranlarını % 30'a karşı % 12 ve canlı doğum oranlarını % 22'ye karşı % 8 olarak anlamlı şekilde farklı olarak rapor ettiler. Patolojik incelemeleri yapılan endometrial biyopsi örneklerinde sekretuar endometriumdan farklı bir sonuç bildirmedi (179).

Zhou ve ark. proliferatif faz endometriumundaki biyolojik markerların implantasyon yeteneğini tahmin edebileceği düşüncesiyle USG'de irregüler eko (güçlü eko ya da homojen olmayan eko) olan toplam 121 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada sırası ile çalışma ve kontrol gruplarında implantasyon oranlarını; % 33.3'e karşı % 17.78, klinik gebelik oranlarını; % 48.33'e karşı % 27.86, canlı doğum oranlarını ise % 41.67'e karşı % 22.96 olarak rapor ettiler (180).

Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında yaptığımız çalışmada implantasyon oranları çalışma grubunda Barash ve ark. , Raziel ve ark. , Li ve ark. ile Zhou ve ark.'nın yaptığı çalışmalardan daha yüksekti. Ancak kontrol ve çalışma grupları kıyaslandığında diğer çalışmalarda implantasyon oranlarında anlamlı bir farklılık tespit edilirken, bizim çalışmamızda anlamlı bir farklılık saptanmamakla birlikte çalışma grubunda klinik olarak anlamlı olabilecek implantasyon artışı gözlenmiştir.

Klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına bakıldığında Barash ve ark. ile Li ve ark.'nın yaptığı çalışmalarla kıyaslandığında çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Zhou ve ark. ile Raziel ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda ise bizim tesbit ettiğimiz klinik gebelik ve canlı doğum oranlarından daha düşük oranlar rapor edilmekle birlikte, çalışmamız Zhou ve ark.'nın sonuçlarına sonuçlarımız daha yakın olarak görülmüştür. Raziel ve ark. yüksek oranda implantasyon başarısızlığı olan çok düşük gebelik potansiyelindeki hastalarda çalışmalarını yaptıkları için daha düşük sonuçlar elde edilmiş olabilir.

Ancak IVF tedavisinde endometrial hasarlanma ile ilgili hala cevaplanmamış sorular bulunmaktadır. Başarılı bir gebelik ve doğumun ardından sonraki IVF tedavisinden önce endometrial biyopsi tekrarlanmalı mıdır? Diğer bir soru ise biyopsi ve ovarian hiperstimülasyon arasında bizim yaptığımız gibi bir zaman aralığı olmasın mı ya da bir zaman aralığı olacaksa herhangi bir dezavantajı olur mu ya da endometrial hasardan sonra KOH protokolü başlanana kadar geçen süre ne kadar olmalıdır?

## SONUÇ

Biz çalışmamızda endometriuma uygulanan lokal hasarın embriyo implantasyon oranlarını, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarını artırdığını tespit ettik.

ICSI öncesinde endometrial hasarlama, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda gebelik oranlarını geliştirebilen ucuz, hemen hemen komplikasyonsuz, kolay uygulanabilen ve etkili bir prosedür gibi görünmektedir. Aynı sonuçlar randomize edilmiş birbirine benzer hasta gruplarıyla oluşturulmuş daha büyük çalışmalarla tekrarlanırsa endometrial örnekleme işlemi rutin olarak uygulanabilir.

Hasarlanan endometriumun reseptivitesinin artma mekanizmasının açıklanması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir. Endometrium hasarlandığında hangi faktörlerin salındığı ve ne tür proteinlerin harekete geçtiğinin saptanabilmesi için moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuçta endometriuma uygulanan lokal hasar, uygulanan IVF sayısını ve hiperstimülasyon riskini azaltarak aşikar klinik ve ekonomik yararlar sağlayabilir.

## ÖZET

**Amaç:** Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan ICSI-ET (intrasitoplazmik sperm injeksiyonu-embriyo transferi) sikluslarında endometriuma uygulanan lokal hasarın implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarına olan etkisini araştırmak.

**Çalışma Dizaynı:** Prospektif çalışma

**Çalışma Yeri:** Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, Tardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi

**Gereç-Yöntem:** İnfertilite nedeniyle başvuran ve ICSI-ET yapılması kararlaştırılan, uzun protokol (GnRH analogu; rFSH+HMG) yöntemiyle KOH uygulanacak, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan toplam 100 hasta seçildi. Aralarından randomize olarak seçilen 50 hastaya KOH siklusundan önce tekrarlanan endometrial biyopsi uygulandı.

**Sonuç:** Hastaların yaş ortalaması, indüksiyon gün süresi, kullanılan toplam gonadotropin dozları, hCG günü E<sub>2</sub> değerleri ve endometrium kalınlıkları, siklus başına toplam MII evresindeki oosit sayıları, transfere uygun kalitedeki total embriyo sayıları, transfer günleri ve transfer edilen embriyo sayıları iki grupta da benzerdi. Benzer sayıda embriyo transferleri ile (çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla 138 ve 141) implantasyon oranları (% 34.67'e karşı % 30.8,  $p > 0.05$ ), klinik gebelik oranları (% 60'e karşı % 34,  $p = 0.009$ ) ve ET başına canlı doğum oranları (% 44'e karşı % 24,  $p = 0.03$ ) çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

**Tartışma:** Bu sonuçlar IVF tedavisi öncesinde endometriuma uygulanan lokal hasarın embriyo implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarını artırdığını desteklemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Endometrium, lokal hasar, implantasyon, gebelik, in vitro fertilizasyon

## ABSTRACT

**Objective:** To explore the effect of local injury to the endometrium for implantation pregnancy and live birth rates in ICSI –ET cycles with recurrent implantation failure

**Study Design:** Prospective study.

**Setting:** A clinical assisted reproductive center of Selçuk University Meram Medical Faculty Hospital.

**Patient(s):** A group of 100 patients, who failed to conceive during one or more cycles of IVF and embryo transfer (ET), treated with a long protocol for controlled ovarian hyperstimulation.

**Intervention(s):** The IVF treatment and ET were preceded by repeated endometrial biopsies, in a randomly selected 50 of a total of 100 patients.

**Main Outcome Measure(s):** Outcome of IVF-ET treatments.

**Result(s):** Age of the patients, days of stimulation, total dose of gonadotropins, E<sub>2</sub> concentrations and endometrial thickness on hCG day, total MII stage oocytes, the total number of high quality embryos for transfer, the day of transfer and the number of embryos transferred were similar for both groups. Transfer of a similar number of embryos (138 and 141 in the experimental and control patients, respectively) resulted in rates of implantation (34.67 % vs. 30.88 %,  $p > 0.05$ ), clinical pregnancy (60 % vs. 34 %,  $p = 0.009$ ), and live births per ET (44 % vs. 24 %,  $p = 0.03$ ), that were higher in the experimental group as compared to controls.

**Conclusion (s):** These results suggest that IVF treatment that is preceded by local injury to the endometrium improved the rates of embryo implantation, clinical pregnancy, and live births in ART.

**Key Words:** Endometrium, local injury, implantation, pregnancy, in vitro fertilization

## KAYNAKLAR

1. Speroff L., Glass N.H., Kase R.G., Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 6 th edition, 1999: 84, 171, 213, 236, 1013, 1097, 1133.
2. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83(129: 4177-4188)
3. Gougeon A, Echochard R, Thalabard JC. Age related changes of population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early follicles in aging women, Biol Reprod 50: 653, 1994
4. Tietze C. Reproductive span and rate of reproduction among Hutterite women, Fertil Steril 8: 89, 1957
5. Guttmacher AF, Factors affecting normal expectancy of conception, JAMA 161:855, 1956
6. American Society for Reproductive Medicine, Optimal evaluation of the infertile female. A practice committee report, Birmingham, AL, 2000
7. Speroff L, Fritz M.A., Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite, 7.baskı, 2007: Bölüm 4, 1220-1221
8. Brugo-Olmeda S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. Reprod Biomed Online 2001; 2 (1): 41-53
9. Balassch J. Gonadotrophin ovarian stimulation and intrauterin insemination for unexplained infertility. Reprod Biomed Online 2004; 9 (6): 664-72
10. Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A, The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after invitro fertilization, Fertil Steril 65: 783,1996
11. Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN. Embryo quality and developmental potential compromised by age, Acta Obstet Gynecol Scand 80:169, 2001
12. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology, RESOLVE, 2001 assisted

reproductive technology succes rates, Centers for disease Control and Prevention, Atlanta GA, 2003

13. Hamilton-Fairley D, Taylor A. Anovulation. *BMJ*. 2003; 6:546
14. Taponen S, Ahonkaillo S, Martikainen H, et al. Prevalence of polycystic ovaries in women with self-reported symptoms of oligo-menorrhoea and / or hirsutism: Northern Finland Birth Cohort 1966 Study, *Hum. Reprod*. 2004; 18:789
15. Rowland GF, Forsey T, Moss TR, et al: Failure of invitro fertilization and embryo replacement following infection with clamymidia trachomatous. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1985; 2:151
16. Licciardo F, Grifo JA, Rosenwaks Z, et al: Relation between antibodies to clamymidia trachomatous and spontaneous abortion following in vitro fertilization *J. Assist. Reprod. Genet*. 1992; 9:207
17. Pritts EA. Fibroids and Infertility: a systematic review of the evidence, *Obstet Gynecol Survey* 56:483, 2001
18. Donnez J, Jadoul P. What are the implications of myomas on infertility? A need for debate? *Hum Reprod* 17:1424, 2002
19. Frattarelli JL, Lauria –Costa DF, Miller BT, et al: Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*, 2000; 74:512
20. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Investigation of the infertile couple. In Speroff L, Glass RH, Kase NG, *Clinical Gynaecological Endocrinology and Infertility*, 5th edition pp 816 Baltimore: Williams and Wilkins ,1994
21. Seifer DB, Lambert-Messerlain G, Hogan JW, et al. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997; 67: 110-114
22. Baramki TA: Hysterosalpingography. *Fertil Steril* 2005; 83:1595
23. Alataş C, Aksoy E, Akarsu C, et al. Evaluation of intrauterine abnormalities in infertile patients by sonohysterography. *Hum Reprod* 1997; 12:487
24. Yucebilgin MS, Aktan E, Bozkurt K, et al. Comparison of hydrosonegography and diagnostic hysteroscopy in evaluation of infertile patients. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol*. 2004; 31:56
25. Gomel V, Taylor PJ. Diagnostic laparoscopy in infertility. In Key WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. *Infertility evaluation treatment*. 330-348. W.B. Saunders,1995
26. GurganT, Urman B, Yaralı H, Duran HE. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 to predict ovarian response in women undergoing controlled ovarian

- hyperstimulation for invitro fertilization using flare –up protocol. *Fertil Steril* 1997; 68:483
27. Muasher SE, Oehninger S, Simonetti S, et al. The value of basal and or stimulated serum gonadotrophin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1998; 50:298
  28. Scott JR RT, Hoffman GE. Prognostic assesment of ovarian reserve, *Fertil Steril* 63:1; 1995
  29. Barrosso G, Oehninger S, Monzo A, Kolm P, Gibbons WE, Muasher SJ. High FSH:LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: impact on follicular development and IVF outcome, *J Assist Reprod Genet* 18: 499, 2001
  30. Lass A, Gerrard A, Abusheikha N, et al. IVF performance of women who have fluctuating early follicular FSH levels . *J.Assist Reprod Genet* 200;17:566
  31. Kwee J, Elting MW, Schats R, et al. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2003; 18; 1422
  32. Smotrich DB, Widra Ea, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman LJ, Prognostic value of day 3 estradiol on invitro fertilization outcome, *Fertil Steril* 64: 1136; 1995
  33. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z, Day 3 estradiol serum concentration as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization, *Fertil Steril* 64:991; 1995
  34. Fıçıcıoğlu C, Kutlu T, Demirbaşoğlu S, Mulayim B. The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve. *Gynecol Endocrinol* .2003; 17:287
  35. Jasso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N. Testicular antimüllerian hormone: history genetics, regulation and clinical applications. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:37-41
  36. Picard J.Y., Jasso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol*. 1984;34(1):23-29.
  37. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 2001; 22(5): 657-674.
  38. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN, Antimüllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2005;45: 20-4
  39. Fıçıcıoğlu C, Kutlu T, Bağlam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85: 592-6



40. Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikkh E, Racowsky C. Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age. *Fertil Steril* . 2003; 80:111
41. Ranieri DM, Quinn F, Makhlof A, et al. Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotrophin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1998; 70:227
42. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, et al. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting poor responders in in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994; 9: 1607-1611
43. Tomas C, Nuojua-Huttunen S, Martikainen H. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1997 ; 12 :220-223.
44. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, et al. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998; 69: 505-510.
45. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population(1.850.000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6(6): 811-6
46. World Health Organization, Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th, Cambridge University Press, 1999
47. Türk Androloji Rehberi. Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri Derneği. 2004 Orhon E.,Günalp S.,Özgür K.
48. Van Steirterghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection, *Hum Reprod* 8: 1061, 1993
49. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men, *New Engl J Med* 345: 1388, 2001
50. Shirivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azospermia *Hum Reprod* 9: 2058, 1994
51. Craft I, Tsigotis M, Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa, *Hum Reprod* 10: 1623, 1995
52. Speroff L, Glass RH, Kase NG; *Clinical Gyneacologic Endocrinology and Infertility*. Williams &Wilkins, Baltimore. First Edition, 1973; 256-257

53. Collins J, Diagnostic Assesment of the Infertile Female Partner. *CurrProbl Obstet Gynecol Fertil* 1988;11: 6-42
54. Rowe P, Comhaire F, Hargreave T. Female partner. In: WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge Press Syndicate of the University of Cambridge; 2000: 40-67
55. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007; 25 (6): 445-453
56. Donaghay M, Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 2007;25 (6): 461-475
57. Dubuisson JB, Chapron C, Nos Z, Morice P, Aubroit FX, Garnier P. Sterilization reversal: fertility results, *Hum Reprod* 10:1145,1995
58. Zeyneloglu HB. Hydrosalpinx and assisted reproduction: options and rationale for treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20:13 (3): 281-6
59. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod* 1999; 14(11): 2762-9
60. Tulandi T,Collins JA, Burrows E,et al. Treatment dependent and treatment independent pregnancy among women with periadneksiyal adhesions. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162 (2):354-7
61. Memarzadeh S, Muse KN, Fox M. Endometriosis. In: Decherney AH, Nathan L, eds. *Current obstetric and gynelogic diagnosis and treatment* 9th edition, 2003: 765-775
62. Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, Su JT, Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination *Int J Androl* 25: 277, 2002
63. Swerdloff RS, Wang C. *Evaluation of male infertility. Up to date* 2007
64. Fluker MR, Urman B, Mackinnon M, Barrow SR, Pride SM, Yuen BH. Exogenous gonodotropin theraphy in World Health Organization groups I and II ovulatory disorders. *Obstet Gynecol* 1994,83 (2) 189-96
65. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 70: 207-13
66. Aboulgar MA, Mansour RT, Serour GI, Al-Inany HG. Diagnosis and management of unexplained infertility an update. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 267:177-88

67. Meldrum DR. Evaluation and preparation of the infertile couple for invitro fertilization. In: Gardner DK. Invitro fertilization, a practical approach, 2007
68. Bates GW, Garza DE, Garza MM, Clinical manifestations of hormonal changes in the menstrual cycle, *Obstet Gynecol Clin North Am* 17:299, 1990
69. Soules MR, McLachlan RI, Ek M, Dahl KD, Cohen NL, Bremner WJ, Luteal phase deficiency: characterization of reproductive hormones over the menstrual cycle *J Clin Endocrinol Metab* 69:804, 1989
70. Derman S, Adashi EY. Induction of ovulation. *Compr Ther* 1995 ;21:583-9
71. Macklon NS, Fauser BCJM. Progress in ovarian stimulation. *Ann. d'Endocrinol*1999; 60: 137-142
72. De Crespigny L, O'Herlihy C, Robinson H. Ultrasonic observation of the mechanism of human ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139: 636-9.
73. Quagliarello J, Arny M, Inaccuracy of basal body temperature charts in predicting urinary luteinizing hormone surges, *Fertil Steril* 45:334, 1986
74. Cooke ID, Morgan CA, Parry TE, Correlation of endometrial biopsy and plasma progesterone levels in infertile women, *J Obstet Gynaecol Br Comm* 79:647, 1972
75. Jones GS, Wentz Ac, The structure and function of the corpus luteum. *Clin Obstet Gynaecol* 3:43, 1976
76. *Clinical Endocrinology and Infertility*. Sperof L, Glass R.H, Kase N.G, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*.6 th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins,1999:487-522 and 1013-1132
77. Burges S and Spanish Collaborative Group on Female Hypogonadotropic Hypogonadizm *Human Reprod*, 2001, 16: 2525-32
78. Homburg R, Howles C.M. Low dose FSH treatment in unovulatory infertility with PCOS: Objectives, Results. Effects and Specifications. *Hum Reprod Upd* 1999; 5: 493-499.
79. White DM, Polson DW, Kiddy D, et al Induction of ovulation with low-dose gonadotropins in polycystic ovary syndrome: an analysis of 109 pregnancies in 225 women. *Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3821-3824.
80. Lobo RA, Gysler M, March CM, Goebelsmann U, Mishell DR, Jr. Clinical and labaratory predictors of clomiphene response, *Fertil Steril* 37:168, 1982
81. Clark JH, Markaverich BM, The agonistic-antagonistic properties of clomiphene: a rewiev, *Pharmacol Ther* 15:467,1982
82. Gorkitsky GA, Kase NG, Speroff L, Ovulation induction rates with clomiphene citrate, *Obstet Gynecol* 51:265,1978

83. Dodge ST, Strickler RC, Keller DW, Ovulation induction with low dose of clomiphene citrate, *Obstet Gynecol* 67:638, 1986
84. European practice in Gynaecology and Obstetrics, Ovulation induction, 2002
85. Fatemi HM, Kolibianakis E, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem AC, Devroey P. Clomiphene citrate versus letrozole for ovarian stimulation: a pilot study. *Reprod Biomed Online* 2003;7(5):543-6
86. Femara patient prescribing information. [www.usfemara/infopage/prescribing](http://www.usfemara/infopage/prescribing)
87. Kashyap S, Wells GA, Rosenwaks Z. Insulin sensitizing agents as primary therapy for patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2004; 19(11); 2474-83
88. Ben-Rafael Z, Levy T, Schoemaker J. Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance. *Fertil Steril* 1998; 69: 40S-49S.
89. Boime I, Ben-Menahem D, and Olijve W. Studies of recombinant gonadotropins: intersection of basic science and therapeutics in: Fauser P, CJM, Rutherford AJ, Strauss IJF, Van Steirteghem A. *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. Parthenon Publishing, London 1999, pp 147-164
90. Van Santbrink EJP, Fauser BCJM. Urinary Follicle Stimulating Hormone for Normogonadotropic Clomiphene-Resistant Anovulatory Infertility: Prospective, Randomized Comparison between Low Dose Step-Up and Step-Down Dose Regimens. *Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3597-3601.
91. Loumaye E, Campbell R, Salat-Boroux J. Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Hum reprod* 1995; 1: 188-199.
92. Townsend SL, Brown JB, Johnstone JW. Induction of ovulation. *J Obstet Gynaecol British Commonwealth* 1966; 73: 529-535.
93. Brown JB. Pituitary control of ovarian function-concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust NZJ. Obstet Gynaecol* 1978; 18: 46-54.
94. Ben-Rafael Z, Levy T, Schoemaker J. Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance. *Fertil Steril* 1998; 69: 40S-49S.
95. Ober C, Weil S, Steck T, et al. Increased risk for polycystic ovary syndrome associated With human leukocyte antigen DQAI\*0501. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167: 1803-1806.
96. Schoot DC, Hop WC, Pache TD, et al. Growth of the dominant follicle is similar to normal in patients with gonadotrophin-stimulated polycystic ovary syndrome exhibiting monofollicular development during a decremental dose regimen. *Acta Endocrinol* 1993; 129: 126-9.

97. Rabau E, David A, Serr DM, Maschiach S, Lunenfeld B. Human menopausal gonadotrophins for anovulation and sterility: Results of 7 year treatment. *Am J Obstet Gynaecol* 1967; 98: 92-98.
98. Sengoku K, Tamate K, Takaoka Y, et al. The clinical efficacy of low-dose step up follicle stimulating hormone administration for treatment of unexplained infertility. *Hum Reprod* 1999; 14:349-353.
99. Whelan III JG, Vlahos NK: The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 883-896.
100. Polson DW, Mason HD, Saldanha MBY, and Franks S. Ovulation of a single dominant follicle during treatment with low-dose pulsatile follicle stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1987; 26: 205-212
101. Andoh K, Mizunuma H, Liu X, et al. A comparative study of fixed-dose, stepdown and low dose step-up regimens of human menopausal gonadotropin for patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998; 70: 840-846,
102. Sagle MA, Hamilton-Fairley D, Kiddy DS, Franks S. A Comparative, randomized study of low-dose human menopausal gonadotropin and follicle stimulating hormone in woman with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1991; 55: 56-60.
103. Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Saale M, and Franks S. Low-dosegonadotrophin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1991; 6:1095-1099.
104. Polson DW, Mason HD, Kiddy DS. Low-dose follicle-stimulating hormone in the treatment of polycystic ovary syndrome: a comparison of pulsatile subcutaneous with daily intramuscular therapy. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 746-748.
105. Buvat J, Buvat-Herbaut M, Marcolin G. et al. Purified follicle-stimulating hormone in polycystic ovary syndrome: slow administration is safer and more effective. *Fertil Steril* 1989;52:553-559
106. Mizunuma H, Takagi T, Yamada K, et al. Ovulation induction by step-down administration of purified urinary follicle-stimulating hormone in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1991; 55: 1195-1196.
107. Schipper I, Hop WCJ, Fauser BCJM. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold-window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle duration rather than magnitude of FSH increase affects follicle development. *Clin Endocrinol Meta*13. 1997; 83:1292-1298.

108. Cedrin-Durnerin I, Bstandig B, Herve F, et al. A comparative study of high fixeddose and decremental-dose regimens of gonadotropins in a minidose gonadotropin releasing hormone agonist flare protocol for poor responders. *Fertil Steril* 2000; 73:1055-1056.
109. Van Santbrink EJP, Dondenvinkel PFJ, Van Dessel TJHM, and Fauser BCJM, Gonadotrophin induction of ovulation using a step-down dose regimen: single-centre clinical experience in 82 patients. *Hum Reprod* 1995-.10: 1048-1053.
110. Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik, İkinci baskı, MN Medikal ve Nobel, 2005
111. Cuellar FG. Bromocriptine mesylate (Parlodel) in the management of amenorrhea/galactorrhea associated with hyperprolactinemia, *Obstet Gynecol* 55:278;1980.
112. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 70: 207-13
113. Tarlatzis BC, Bontis J, Kolibianakis EM, et al. Evaluation of intrauterine insemination with washed spermatozoa from the husband in the treatment of infertility. *Hum Reprod* 1991; 6: 1241.
114. Mortimer D, Templeton AA. Sperm transport in the human female reproductive tract in relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 401.
115. McGovern P, Quagliarello J, Arny M. Relationship of within-patient semen variability to outcome of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1989; 51: 1019.
116. Hoing LM, Devroey P, Van Steirteghem AC. Treatment of infertility because of oligoasthenoteratospermia by transcervical intrauterine insemination of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1986; 45: 388
117. Dodson WC, Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 1991; 55:457.
118. DiMarzo SJ, Kennedy JF, Young PE, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation on pregnancy rates intrauterine insemination. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1607.
119. Chaffkin LM, Nulsen JC, Luciano AA, Metzger DA. A comparative analysis of the cycle fecundity rates associated with combined human menopausal gonadotropin (hMG) and intrauterine insemination (IUI) versus either hMG or IUI alone. *Fertil Steril* 1991; 55: 252.
120. Hugues JN, Durnerin IC. Revisiting gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotrophins. *Human Reproduction Update* 1998; 4(1): 83-101.

121. Fitzgerald PA. Hypothalamic and pituitary hormones. In Katzung BG (ed), Basic and clinical pharmacology. California: Mcgraw-Hill, 8th ed, 2001, pp 625-643.
122. Daya S, Follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles, Cochrane Database Syst rev. CD000061,2000
123. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Ferlini F, Perri T, Parmegiani L, Comparison of controlled ovarian stimulation with human menopausal gonadotropin or recombinant follicle-stimulating hormone Fertil Steril 80:390,2003
124. Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, Olivennes F, de Ziegler D, Frydman R, New look at endometrial echogenicity: objective computer assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization –embryo transfer, Fertil Steril 74,274,2000
125. Barbieri RL, Hornstein MD. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), Reproductive endocrinology. Pennsylvania: Elsevier Inc. 5th ed, 2004, pp 839-873
126. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. Geneva: WHO, 2002, pp 102-125.
127. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Human Reproduction 2002; 17(9): 2287-2299.
128. Karacan M, Erkan H, Karabulut O, Sarikamis B, Camlibel T, Benhabib M. Clinical pregnancy rates in an IVF program. Use of the flare up protocol after failure with long regimens of GnRH-a J Reprod Med 46:485,2001
129. Land JA, Yarmolinskaya MI, Dumoulin JC, Evers JL. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 65:961:1996
130. Homburg R, Levy T, Ben-Rafael ZA. Comparative prospective study of conventional regimen with chronic low-dose administration of follicle-stimulating hormone for anovulation associated with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 1991; 63: 729- 732.
131. Thatcher SS, Jones E, DeCherney AH. Ovarian cysts decrease the success of controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization. Fertil Steril 52:812,1989
132. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation, Hum Reprod Update 8:279;2002
133. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K, Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproduction technologies compared to the long protocol, Meta-analysis, Arch Gynecol Obstet 265:175;2001

134. Fitzgerald PA. Hypothalamic and pituitary hormones. In Katzung BG (ed), Basic and clinical pharmacology. California: Mcgraw-Hill, 8th ed, 2001, pp 625-643.
135. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. Human Reproduction Update 2000; 6(4):322-331.
136. Teresa Wiesak Shore Institute for Reproductive Medicine, Brick, NS, USA. Role of LH in controlled ovarian stimulation. Reproductive Biology 2002; 2(3). 215-227.
137. Al-Inany H, Aboulgar M, GnRH antagonists in assisted reproduction: a cochrane review Hum Reprod 17:874; 2002
138. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. Human Reproduction Update 2000; 6(4):322-331.
139. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, et al. The use of GnRH antagonists in ovarian hyperstimulation. Human reproduction Update 2002; 8(3):279-290.
140. Griesinger G, Felferbaum R, Diedrich K. GnRH antagonists in ovarian hyperstimulation: a treatment regimen of clinician's second choice? Data from the German national IVF registry. Human Reproduction 2005; 20(9):2373-2375.
141. Ron-El R, Lazrel A, Schachter M, et al. Induction of ovulation after GnRH antagonists. Human Reproduction Update 2000; 6(4):318-321.
142. Olivennes F, Alvarez J, Bouchard P, et al. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: adose finding study of 3 versus 2 mg. Human Reproduction 1998; 13(9): 2411-2414.
143. Olivennes F, Belcisch-Allart J, Empeiraire JC, et al. Prospective, randomised, controlled study of in-vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) antagonist (Cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (Triptorelin). Fertility and Sterility 2000; 73(2):314-320.
144. Golan A., Ron-El R., Herman A., et al. Ovarian hyperstimulation syndrome following D-Trp-6 luteinizing hormone releasing hormone microcapsules and menotropin for in vitro fertilization. Fertil Steril 1988,50(6):912-6
145. Damario M.A, Barmat L., Liu H.C. et al dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing hormone agonists improves in vitro fertilization outcome in high responder patients. Hum Reprod (1991) 12 (II)2359-65
146. Muechler EK, Kohler D, Huang KE, Monitoring of ovulation induction with HMG-HCG therapy by plasma estrogen and progesterone. Int J Fertil 26:273,1981
147. Ditkoff Ec, Plumb J, Selick A, Sauer MV, Anesthesia practices in the United States common to in vitro fertilization (IVF ) centers. J Assist Reprod Genet 14:145,1997



148. Uygur D, Alkan RN, Batuoglu S, Recurrent empty follicle syndrome. *J Assist Reprod Genet* 20:390,2003
149. Yaron Y, Peyser MR, Samuel D, Amit A, Lessing JB. Infected endometriotic cysts secondary to oocyte aspiration for in vitro fertilization, *Hum Reprod* 9: 1759,1994
150. Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. Microinjection. *Manuel on Assisted Reproduction* 2000; 377-87.
151. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK, Embryo transfer techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 76:863,2001
152. Soliman S, Daya S, Collins J, Hughes EG. The role of luteal phase support in infertility treatment: a metaanalysis of randomized trials. *Fertil Steril* 1994;61: 1068-76
153. Pritts EA, Atwood AK, Luteal phase support in infertility treatment: a metanalysis of the randomized trials, *Hum Reprod* 17:2287,2002
154. Mochtar MG Hogerzeil HV, Mol BW, Progesterone alone versus progesterone combined with HCG as luteal phase support in GnRHa/HMG induced IVF cycles: a randomized clinical trial, *Hum Reprod* 11:1602,1996
155. Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. *Hum Reprod Update* 6:139.2000
156. Propst AM, Hill JA, Gingsburg ES, Hurwitz S, Politch J, Yanushpolsky EH. A randomized study comparing Crinone % 8 and intramuscular progesterone supplementation in in vitro fertilization embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 76,1144,2001
157. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994;266:1508 –18.
158. Sherwin R, Catalano R, Sharkey A. Large-scale gene expression studies of the endometrium: what have we learnt? *Reproduction* 2006;132: 1–10.
159. Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Diaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5742–52.
160. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, et al. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;20:2104–17.
161. Sharkey A. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 1998;3:52–61.

162. Basak S, Dubanchet S, Zourbas S, Chaouat G, Das C. Expression of proinflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:2–11.
163. Barash A, Weissman A, Manor M, Milman D, Ben-Arie A, Shoham Z. Prospective evaluation of endometrial thickness as a predictor of pituitary down-regulation following GnRH-a administration in an IVF program. *Fertil Steril* 1998;69:496–9.
164. Weissman A, Barash A, Manor M, Ben-Arie A, Granot I. Acute changes in endometrial thickness after aspiration of functional ovarian cysts. *Fertil Steril* 1998;69:1142-4
165. Germond M, Primi MP, Senn A. Hatching: how to select the clinical indications. *Ann NY Acad Sci* 2004;1034:145–51.
166. Bar-Hava I, Krissi H, Ashkenazi J, Orvieto R, Shelef M, Ben-Rafael Z. Fibrin glue improves pregnancy rates in women of advanced reproductive age and in patients in whom in vitro fertilization attempts repeatedly fail. *Fertil Steril* 1999;71:821– 4.
167. Simon A, Safran A, Revel A, Alzenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, et al. Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole acromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertil Steril* 2003; 79:1434–8.
168. Aslan D, Elizur SE, Levron J, Shulman A, Lerner-Geva L, Bider D, et al. Comparison of zygote intrafallopian tube transfer and transcervical uterine embryo transfer in patients with repeated implantation failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;122:191– 4.
169. Urman B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *RBM Online* 2005;11:371–91.
170. Wang H, Dey Sk. Road map to embryo implantation: clues from Mouse models. *Nat Rev gen* 2006;7:185-99.
171. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003;7:151–61.
172. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002;296:2185–8.
173. Dimitriadis E, Salmons LA, Robb L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod* 2000;6:907–14.

174. Cork BA, Li TC, Warren MA, Laird SM. Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. *J Reprod Immunol* 2001;50:3–17.
175. Dimitriadis E, Stoikos C, Baca M, Fairlie WD, McCoubrie JE, Salmons LA. Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3458–65.
176. Granot I, Dekel N, Bechor E, Segal I, Fieldust S, Barash A. Temporal analysis of connexin 43, protein and gene expression, throughout the menstrual cycle in human endometrium. *Fertil Steril* 2000;73:381–6.
177. Akbas GE, Taylor HS. HOXC and HOXD gene expression in human endometrium: lack of redundancy with HOXA paralogs. *Biol Reprod* 2004;70:39–45.
178. Barash et al. Endometrial injury increases its receptivity Vol. 79, No. 6, June 2003, 1317-22
179. Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Berno O, Ron-El R, Friedler S. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril* 2007;87:198–201.
180. Zhou et al. Endometrial injury in COH cycle Vol. 89, No. 5, May 2008, *Fertility and Sterility*:1166-76.
181. R.Li et al. *International Congress Series* 1271 (2004) 73- 76
182. Loeb L.U ber die experimentelle Erzeugung von Knoten von Deciduagewebe in dem Uterus des Meerschweinchens nach stattgefundenener Copulation [The experimental proof changes in the uterine decidua of guinea pig after mating]. *Zentralbl Allg Pathol* 1907;18:563–5.
183. Humphrey KW. Interaction between estrogen-17<sub>β</sub> and progesterone on the induction of deciduomata in ovariectomized mice. *Aust J Biol Science* 1969;22:689–99.
184. Finn CA, Martin L. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol Reprod* 1972;7:82–6.

185. Shelesnyak MC, Marcus GJ. The study of nidation. In: Shelesnyak MC, Marcus GJ, eds. Ovum implantation, its hormonal, biochemical, neurophysiological and immunological bases. New York: Science Publishers, Gordon and Breach, 1967:3–30.
186. Lessey et al., regulated expression of heparin binding EGF- like growth faktör in the human endometrium:a potential paracrine role during implantation, Mol. >Reprod.Dev. 62(4)(2002) 446-455
187. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. Placenta 2001;22:1–13.
188. Akita S, Ishihara H, Mohammad Abdur R, Fujii T. Leukemia inhibitory factor gene improves skin allograft survival in the mouse model. Transplantation 2000;70:1026–31.
189. Macklon NS, Fauser BC. Impact of ovarian hyperstimulation on the luteal phase. J Reprod Fertil 2000;55(Suppl):101–10
190. Kolb BA, Paulson RJ. The luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation and the possible impact of this hyperstimulation on embryo implantation. Am J Obstet Gynecol 1997;176:1262–7.
191. Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Diaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5742–52.
192. Qin L, Wang YL, Bai SX, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS. Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal–fetal interface during tubal implantation. Reproduction 2003;126:383–91.
193. Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6 beta1 integrins. J Biol Chem 2001;276:17550–8.
194. Takeyama H, Funahashi H, Sawai H, Takahashi H, Yamamoto M, Akamo Y, et al. Expression of alpha(6) integrin subunit is associated with malignancy in gastric gastrointestinal stromal tumors. Med Sci Monit 2007;13:CR51–6.
195. Kalma et al. Expression of UPIb in human endometrium 2008

196. Wu XR, Manabe M, Yu J, Sun TT. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem* 1990;265:19170–9.
197. Yu J, Lin JH, Wu XR, Sun TT. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol* 1994;125:171–82.
198. Hicks RM, Ketterer B. Hexagonal lattice of subunits in the thick luminal membrane of the rat urinary bladder. *Nature* 1969;224:1304–5.
199. Brisson A, Wade RH. Three-dimensional structure of luminal plasma membrane protein from urinary bladder. *J Mol Biol* 1983;166:21–36.
200. Wu XR, Medina JJ, Sun TT. Selective interactions of UPIa and UPIb, Two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:29752–9.
201. Negrete HO, Rivers RL, Goughs AH, Colombini M. Individual leaflets of a membrane bilayer can independently regulate permeability. *J Biol Chem* 1996;271:11627–30.
202. Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 2004;5: 117–28.
203. MahbubHasanAKM, SatoK, SakakibaraK, OuZ, IwasakiT, UedaY, et al. Uroplakin III, a novel Src substrate in *Xenopus* egg rafts, is a target for sperm protease essential for fertilization. *Dev Biol* 2005;286:483–92.
204. Sakakibara K, Sato K, Yoshino K, Oshiro N, Hirahara S, Mahbub Hasan AKM, et al. Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine- phosphorylated upon fertilization. *J Biol Chem* 2005;280:15029–37.
205. Mahbub Hasan AKM, Ou Z, Sakakibara K, Hirahara S, Iwasaki T, Sato K, et al. Characterization of *Xenopus* egg membrane microdomains containing uroplakin Ib/III complex: roles of their molecular interactions for subcellular localization and signal transduction. *Genes to Cells* 2007;12:251–67.
206. Tu L, Sun TT, Kreibich G. Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 2002;13:4221–30.

207. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216–29.
208. Dey SK. Fatty link to fertility. *Nature* 2005;435:34–5.
209. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, White JO. The effect of sex steroids hormones and interleukin-1-beta on MUC1 expression in endometrial epithelial cell lines. *Reproduction* 2006;131:733–42.
210. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Reproduction* 1997;2: 84–93.
211. Carson DD, Julian J, Lessey BA, Prakobphol A, Fisher SJ. MUC1 is a scaffold for selectin ligands in the human uterus. *Front Biosci* 2006;11:2903–8.
212. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during
213. P. Kovacs, et al. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome, *Hum. Reprod.* 18 (11) (2003) 2337– 2341.
214. G.S. Basir, et al., Evaluation of cycle-to-cycle variation of endometrial responsiveness using transvaginal sonography in women undergoing assisted reproduction, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 19 (5) (2002) 484– 489.
215. R.L. Schild, et al. Endometrial receptivity in an in vitro fertilization program as assessed by spiral artery blood flow, endometrial thickness, endometrial volume, and uterine artery blood flow. *Fertil. Steril.* 75 (2) (2001) 361–366