

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof.Dr.Mehmet Çolakoğlu**

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU – EMBRİYO TRANSFERİ**  
**SİKLUSLARINDA OTOLOG KUMULUS HÜCRE - OOSİT KOMPLEKSİNİN**  
**KÜLTÜR ORTAMI OLARAK KULLANILMASININ EMBRİYO GELİŞİM**  
**KALİTESİNE, İMPLANTASYON ve GEBELİK ORANLARINA ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Nalan CİHANGİR**

**UZMANLIK TEZİ**

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

**KONYA**  
**Mart 2009**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	70
7. ÖZET	72
8. ABSTRACT	73
9. KAYNAKLAR	74
10. TEŞEKKÜR	92

## GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir kontrasepsiyon 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 sağlanması ancak korunmasız ilişkiye rağmen yeni bir gebeliğin olmaması durumudur. Ancak 30'lu yaşlarının 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 (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 Embriyo 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 sitoplazması içine enjeksiyonu ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection ), testislerden sperm çıkartılması; 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 foliküller transvajinal ultrasonografi eşliğinde toplanır. Foliküllerden elde edilen oositler laboratuvar ortamında eşten alınan uygun spermler ile fertilize edilir. İşlem sonucunda elde edilen embriyolar transservikal yoldan anne adayı uterusuna transfer edilir. Bugün itibarıyla 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 arttırılması düşünülmüştür. Bugün, bu amaçla in vitro fertilizasyon dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermatozoanın, fertilizasyon yeteneği için önce dişi genital organlarında kapasitasyon safhasını geçirmesi gerektiği anlaşıldıktan sonra tavşanlarda ilk vitro fertilizasyon yapılmıştır. 1969' ların sonlarında Edwars ve arkadaşları, insan oositleriyle ilk başarılı in vitro fertilizasyonu gerçekleştirdiklerini açıklamışlardır. İlk IVF gebeliği 1976 yılında fizyolog Dr.Edwars ve jinekolog Dr.Stepto tarafından gerçekleştirilen gebeliktir. Ancak oluşan gebeliğin ektopik gebelik olması talihsizliktir. Nihayet yaklaşık 21 yıl önce, Cambridge'de 1978 yılında yine Dr.Edwars ve Dr.Stepto tarafından in vitro fertilizasyon yöntemiyle uterin bir gebelik sağlanmış, Louise Brown adında sağlıklı bir bebek olarak dünyaya gelmiştir. Zamanla IVF tedavisinin GIFT, ZIFT, TET, ICSI gibi çeşitli modifikasyonları ortaya çıkmış, uygun hastalarda kullanıma girmiştir. 1983'de 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 ilk ZIFT bebeği (Devroey ve ark.) dünyaya gelmiştir. SUZI tedavisiyle ilk doğum 1988 Ng ve ark. tarafından, ilk ICSI gebeliği 1992 de Palermo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir.

Prof. Dr. Refik Çapanoğlu ve ark. İzmir Ege Üniveritesi'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 (YÜT) ile oluşturulan gebeliklerin oranını 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, açıklamaya yöneliktir. Bu alandaki her yeni çalışma gebelik ve implantasyon oranlarını arttırmayı amaçlar.

Biz bu çalışmada; ICSI-ET siklusları için folikül aspirasyonu yöntemiyle elde edilen otolog kumulus hücre – oosit komplekslerinin (COC), embriyolar için kokültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişim hızları ve kalitesi üzerindeki olumlu etkisini, yine otolog

kumulus hücre – oosit komplekslerinin gelişen embriyolar ile birlikte uterin kaviteye transferi ile implantasyon ve gebelik oranlarını arttırmada etkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Folikül aspirasyonu esnasında elde edilen otolog COC 'lar, mikroenjeksiyon işlemi yapılarak döllenmiş oositlerin (1 kumulus hücre-oosit kompleksi / 3 döllenmiş oosit ) yanında ko-kültür olarak kültür dishinde kullanılmıştır. Embriyoların bu hücre kompleksi birlikteliğindeki gelişimleri gözlemlenmiştir. Ardından oluşan embriyolar ve otolog kumulus hücre –oosit komplekslerinin uterus kavitesine birlikte transferi yapılmıştır. Çalışmamız 2008-2009 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'nde prospektif randomize kontrollü olarak yapılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Primordial germ hücreleri vitellus kesesininin, allantoisin ve barsak arka kısmı endoderminden kaynaklanmaktadır. 6-8. gestasyonel haftalarda germ hücreleri hızla mitozla çoğalarak ovaryan farklılaşmayı başlatırlar. 16-20. gebelik haftalarında yaklaşık 6-7 milyon oogoniya ulaşılır. Bu noktadan sonra germ hücreleri menapoza dek sürekli azalır. 11-12. haftada oogoniyalar 1. mayotik bölünme ile oositlere dönüşürler, profazda beklerler. Tek bir ovum 2 mayotik bölünme ile oluşur. Bir tanesi tam ovulasyondan önce, ikincisi sperm penetrasyonu esnasında olur. Fazla genetik materyal her mayotik bölünmede oluşan polar body ile atılır (1,3).

İlk mayotik bölünme sonrası oosit oluşuktan sonra germ hücre sayısı doğumda 1-2 milyona ve puberte başlangıcında 300.000-500.000 'e düşmektedir. Yaşamın geri kalan 35-40 yılında sadece 400-500 oosit gelişecek geri kalanı atreziye uğrayacaktır. 37-38 yaşına dek foliküler kayıp oranı aynı kalacak menopoz öncesi 10-15 yıl kayıp oranı artacaktır (3). Menapozda ise 1000' den az sayıda folikül kalacaktır.

İnfertilite çiftin bir yılı aşan sürede düzenli ve korunmasız cinsel ilişkisine rağmen gebe kalamaması olarak tanımlanır. 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
- ✓ 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 fertilitesi 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 fertilitenin en yüksek seviyesinde ,
- ✓ 25-29 yaş arası % 4-8 oranında fertilitenin azalma başları ,
- ✓ 30-34 yaş arası % 15-19 oranında ,
- ✓ 35-39 yaş arası % 26-46 oranında ,
- ✓ 40 yaş sonrası % 95 oranında doğurganlık kapasitesi azalmaktadır (4, 5).

Son 20 yılda infertilite tanısında ve tedavisinde pek çok yenilik olmuştur. IVF (InVitro Fertilizasyon ) ve diğer asiste reproduktif teknolojilerin (yardımcı üreme teknikleri) 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 uygulansada günümüzde her türlü fertilitenin problemlerinde kullanılmaktadır.

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 ovulasyon bozuklukları
- ✓ % 30-40 tubal problemler
- ✓ %45- 50 erkek faktörü mevcuttur.
- ✓ % 10 açıklanamayan infertilite

Sadece kadın faktörü incelendiğinde, % 40 ovulatuvar disfonksiyon, % 40 tubal ve pelvik patolojiler, % 15 nedeni açıklanamayan infertilite tanıları fertilitate problemleridir (6, 7, 8).

## İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### Anamnez

Yaşın kadında ilerlemesiyle over rezervi ve antral folikül 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 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 düşünülmelidir. Yaşlanmanın uterus üzerine olumsuz etkisi yoktur. Yaşla birlikte benign uterus patolojilerinde (leiomyom, endometrial polipler, adenomyozis) artışı olmakla birlikte kadınlarda fertilitateye 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 bu 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. Menstruasyon esnasında dismenore varlığı, disparoni, fokal hassasiyet ve kul-de-sac nodularitesi peritoneal patolojileri, endometriozisi düşündürür.

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

Ovulatuvar problemlere yol açabilecek tiroid hastalıkları, galaktore, hirsutismus, diabet gibi sistemik hastalıklar sorgulanmalıdır. Daha önce gebelik oluşup oluşmadığı değerlendirilir. Sekonder infertilite de tedavi daha kolay ve prognoz daha iyidir. Daha önceki infertilite tedavileri, uygulanan ilaçlar, over yanıtı, uygulanan tedaviler ve sonuçları 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 enfeksiyonları 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 myometriyumun homojenitesi, eğer varsa myomatöz yapıların endometrium kavitesi ile ilişkisi 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 foliküllerin sayısı, kistik veya solid oluşumlar değerlendirilir. Erken proliferatif fazda yapılan transvajinal ultrasonografi ile overlerde gözlenen antral folikül sayısı overlerin gonadotropinler ile uyarıldığında vereceği cevabı belirlemektedir. Her iki overde toplam 15 ve daha üzeri antral folikül izlenirse overlerin cevabının iyi olacağı öngürülür. Her iki overde toplam 5 veya daha az antral folikül izlendiği durumda gonadotropin uyarısına over yanıtı oldukça kısıtlı kalmaktadır (19). Pelvisin ultrasonografik incelenmesinde patoloji tespiti halinde histereskopi ve laparoskopi gibi cerrahi işlemler gerekebilir.

## Laboratuvar incelemeleri

Hipotalamus-hipofiz – over aksının fonksiyonlarının değerlendirilmesi, over rezervinin taranması amacıyla menstruel kanamanın 2.-3. gününde FSH, LH, östradiol (E<sub>2</sub>), 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 östradiol (E<sub>2</sub>) değerlerinin >50 pg/ml olması ovulasyon indüksiyonunda kötü prognozla ilişkilidir. Yüksek östradiol (E<sub>2</sub>) seviyeleri artmış FSH sonucudur. Artmış östradiol (E<sub>2</sub>) düzeyinin ise FSH yı yalancı şekilde baskılayabileceği akılda tutulmalıdır. Bu nedenle östradiol (E<sub>2</sub>) ve FSH birlikte değerlendirilmelidir. İnhibin B overdeki granuloza hücrelerince menstruasyonun foliküler fazında üretilir ve FSH üretimini baskılar. FSH'nın dolaşımında artması azalmış İnhibin B seviyesi ile ilişkilidir. Siklusun 3. gününde İnhibin B > 45 pg/ml olması iyi prognoz belirtisidir (20, 21).

Ayrıca prolaktin, TSH, serbest T<sub>4</sub> gibi aksın çalışmasına etkisi olabilecek hormon düzeyleri değerlendirilir. AMH (antimüllerian hormon) düzeyi menstruel siklus zamanından bağımsız olarak antral folikül sayısı hakkında bilgi verebilir. Hirsutismus saptanan olgularda DHEA-S, serbest testosteron, 17-OH-progesteron, androstenedion düzeyleri incelenir (20).

Hematolojik testlerden kan grubu belirlenmeli ve tam kan sayımı yapılmalıdır. Mevcut enfeksiyon ve bağıışıklığın önceden tanımlanması için; Hbs Ag, 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 görüntülenmesine dayanan infertilite araştırmasında temel tanı yöntemidir. İnfertiliteye neden olabilecek uterin kavitenin konjenital anomalilerini tespit etmede ve organik patolojilerin tanımlanmasında kullanılabilir. Tüplerin açık, tıkalı oluşu, blokajın yeri, uterin kavitede sineşi, polip veya myom varlığı değerlendirilmektedir. Müllerian anomaliler, intrakaviter kitle varlığı, intrauterin sineşi ve adezyonların varlığı infertilitenin nedenini ortaya koyabilir. 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 yada iki taraflı tıkalı tespit edilmektedir (20). HSG değerlendirmesinde, 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, submuköz myom, sineşiler, uterin anomaliler) değerlendirilir. İşlem menstruasyon bitiminde foliküler 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 özellikle YÜT kullanılacak hastalarda endometrial reseptiviteyi ve implantasyonu olumsuz etkilemektedir. Kavitedeki patolojilerden şüphelenildiğinde kaviteyi net değerlendirme amacıyla, tespit 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 saptayan 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. Tubal faktörlerin değerlendirilmesinde laparoskopi kesin tanımlayıcı girişimdir. Uterus, ön-arka cul-de sac, ovaryan yüzeyler, fossa ve tüpler izlenir. Servikal yoldan verilen metilen mavisi ile tubaların açık veya tıkalı olup olmadığı gözlenir. Böylece infertiliteyi etkileyen ve HSG ile tespit edilemeyen hafif derecede distal tubal hastalıklar (fimbrial tıkanıklık, fimozis), pelvik veya adneksiyal adezyonlar ve endometriozis gözlenir. Tanı sonrası tıkanıklıkların açılması, adezyonların giderilmesi gibi cerrahi tedavi olanağında 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 foliküler 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> (östradiol) 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 foliküler fazda östradiol düzeyide over rezervi hakkında bilgi verir. E<sub>2</sub> seviyesinin < 45 pg/ml olması beklenir. FSH gibi 3. günde E<sub>2</sub> (östradiol) düzeyinin yüksek olması (80 pg/ml üzeri) düşük cevabı öngörür (31). Erken östradiol artışı aynı zamanda FSH değerini baskılayarak artmış değerleri maskeleyip over rezervi sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açar. 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).

## **Anti-Müllerian Hormon (AMH)**

Antimüllerian Hormon (Müllerian İnhibing Faktör), dimerik bir glikoproteindir. Erkekte fetal seks farklılaşması döneminde sertoli hücrelerinde üretilir ve müllerian kanalların regresyonuna neden olur (35). 72 kDa ağırlığında, disülfid bağlarıyla bağlanmış iki monomerden oluşur. AMH; inhibin, aktivin glikoproteinlerinin dahil olduğu Transforming Growth Faktör-B ailesindedir. AMH'nun büyüme sırasında, preantral ve erken antral foliküllerden salındığı gösterilmiştir (36, 37).

Kadınlarda 6 mm den küçük antral foliküller AMH salgılar. Over aktivitesi üzerine düzenleyici etkisi vardır. AMH seviyeleri çalışmaların sonucu olarak elde edilen oosit sayıları ile serum AMH düzeyi 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 p.o. verilir. FSH ve E<sub>2</sub> ölçümü 10. günde tekrarlanır. Klomifen

sitrat ile folikül gelişiminin uyarılmasına cevap folikülden E<sub>2</sub> salgılanması beklenir. Artan E<sub>2</sub> 'nin, FSH' yı baskılayarak artışını engellemesi gerekmektedir. 10. günde FSH'nın bazal değerlere göre artması veya E<sub>2</sub> değerinde anlamlı yükseliş olmaması over rezervinin düşük olduğu olumsuz sonuç olarak değerlendirilir. 3. gün FSH değeri normalden yüksek ve anormal klomifen sitrat testi sonucu over rezervinin azaldığını düşündürür (40).

### **GnRH analogu stimülasyon testi (GAST)**

Over rezervi iyi olgularda, GnRH analogu uygulamasını takiben 4-6 gün içinde 'flare etki' olarak bilinen FSH ve LH artışına yanıt 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 Reserv 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> kontrasyonları 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 foliküler fazda ultrasonografik olarak tanımlanabilen 2-10 mm arasındaki antral foliküllerin sayısındaki azalma, FSH konsantrasyonlarındaki artıştan daha önce ortaya çıkabilir. Tomas ve ark. ovaryan stimülasyon öncesi folikül sayısı ile over volümünün korele olduğunu bildirmişlerdir (43). Ultrasonografi ile antral foliküllerin sayımı, IVF programlarında toplanacak oositlerin sayısının tahmininde yardımcı olabilir. Her iki overde toplam 15 ve üzeri antral folikül varsa bu overler uyarıya iyi cevap vermekte, her iki overde toplam 5 veya daha az folikül 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 masturbasyon yöntemi ile elde edilen ayrı 2 spermogram 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 (intrauterin inseminasyon) için sperm hazırlanması anormalliği düzeltebilir ancak minimum 10 milyon motil sperm olması gerekir. İlk IVF çalışmalarında oositin, 2-6 milyon sperm ile inseminasyonu yapılmıyordu. 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 kamarasına 5 µl semen konarak 20 büyütme altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayılarak  $10^6$  ile çarpılarak mikrolitredeki sperm sayısı belirlenir (  $10^6$  /ml). Normal sperm konsantrasyonu  $> 20 \times 10^6$  /ml ve totalde  $40 \times 10^6$  /ml dir. Semen analizi normal sınırlarda olan erkeklerde endokrinolojik bozukluklar çok nadirdir. Ejekulyon olmaması (aspermi) veya ejakulat

hacminin azlığı retrograd ejakulasyonu, ejakuluar 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 $< 20 \times 10^6$ /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	Ejakülatta 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 spermierii 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).

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

### **Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA)**

Konjenital bilateral vas deferans yokluğu veya düzeltilemeyen tıkanıklıkları olan olgularda mikro cerrahi 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 azospermi de veya epididimal sperm aspirasyonu başarısız olan olgular da açık mikrocerrahi ile dondurma işlemi için perkütan 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 mediumun 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 insülin 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 (aylık dönemde gebe kalma potansiyeli) 0.22/ay ve fekundite (bir menstruel siklusta gebe kalma potansiyeli) 0.15-0.18 ay olarak tanımlanmıştır. Yıllık % 85 gebelik oranı vardır. İnfertilite, 1 yıllık korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalınmamasıdır. 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 servikste 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**

### **UTERİN 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-Küster-Hauser Sendromu), arkuat uterus, 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 yada total tıkanıklığı oluşabilir. İnamural, submüköz myomlar kavite basısı oluşturarak obstetrik komplikasyonlara ve implantasyon bozukluğuna neden olmaktadır (53, 54).

## **SERVİKAL SEBEPLER**

Servikal faktörler 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).

## **ENDOMETRİAL 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 salınımı, 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 olsada kötü cerrahi prognozda, cerrahi istemeyenlerde IVF cerrahi tedaviye alternatiftir (57).

Tespit edilen hidrosalpinksde 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 ileri 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 bozukluk ise tedavi edilebilir, hafif ama önemli semen bozukluklarında intrauterin inseminasyon (IUI) yapılabilir. Tedavisi mümkün değil ise ejakülattan, epididimden veya testislerden elde edilen sperm (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. 1 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 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 gerçekleşir. Anovulasyon veya ovulasyon disfonksiyonu menstruel siklus sıklığını ve süresini etkilemektedir. Oligomenorenin en sık sebebi polikistik over hastalığı (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 (45X) ile ilişkili olabilir. Sekonder amenore en az 6 ay süre ile ovulasyonun olmamasıdır. Ciddi endokrin disfonksiyonu yapan tirod, adrenal, pituiter (hiperprolaktinemi) hastalıkları neden olabilir. Ancak en sık prematür over yetmezliği ile karşılaşılmalıdır (67).

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

Foliküler fazda yapılan, dominant folikülün büyüme takibi rüptür öncesi 18-25 mm boyutlarına dek izlenebilir. Folikülün takiplerde kaybolması ve Douglas'da 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 foliküler 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 düşünülmelidir.

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

Tablo 3 : Anovulatuvar Hastalıkların Sınıflandırılması (WHO sınıflaması )

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

**WHO GRUP I** ---Hipogonadotropik hipogonadizm: Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon söz konusu olduğu için pulsatil GnRH uygulaması veya menopozal gonadotropinler (HMG) ile ovulasyon sağlanır. Gebelik oranları HMG ile siklus başına % 25-30 civarındadır. Yine bu tip hastalara recFSH ve recLH kombine stimülasyon protokolleri uygulandığında folikül 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).

#### **Eksojen GnRH protokolü**

WHO Grup I, Hipogonadotropik hipogonadizmli anovulatuvar kadınlarda kullanılır. GnRH sürekli pulsatil tarzda pompa yardımıyla verilir. Fizyolojik dozlarda gonadotropin salgısını uyarak folikül gelişimini sağlar.

**WHO GRUP II**---Normogonadotropik hipogonadizm: Polikistik over hastaları bu grubun çoğunluğunu oluşturmaktadır. PKOS olguların çoğunda vücut kitle indeksi artmıştır. Bu artış anovulasyonu beraberinde getirir. Hastalarda irregüler menstruel sikluslar (35-90 gün), disfonksiyonel uterin kanama, menoraji, metroraji, hiperandrojenizm bulguları, hirsutismus ve

obezite mevcuttur. Azalmış fertilité, artmış gebelik kayıpları vardır. Ultrasonografik incelemede over korteksi altında periferik dizilimli küçük foliküller (<10 mm) izlenir. FSH/LH oranının tersine döndüğü, 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. Ovülasyon 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 folikül gelişimi takip edilir. Dominant folikül gelişiyor ovulasyon olmuyor ise hCG ile ovulasyon tetiklenebilir. Başlangıç dozu folikül 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, başağrısı 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 anastrazol 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 (letrazol) bu etkiyi periferik östrojen sentezini azaltarak yaparlar. Antiöstrojenik etkisi klomifen sitrata göre daha azdır. Klomifen sitrata dirençli olgularda klinik deneyim kısıtlı olsada kullanılabilir. Siklusun 3.-7. günlerinde 2.5 mg / gün doz uygulamasıyla yapılan çalışmada letrazol ile östrojen ve progesteron düzeylerinin, klomifen sitrat uygulamasına göre daha düşük, folikül sayısının daha az olduğu görülmüştür (85).

KOH'da FSH dozunu azaltmak, düşük over yanıtı hastalarda sonuçları iyileştirmek, 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 özelliğidir. WHO grup II anovulasyonda kullanılan oral antidiabetik ajanlardan metformin, troglitazon, rosiglitazon, pioglitazon periferik insülin duyarlılığını arttırırlar.

PKOS 'nın büyük kısmında metformin kullanımı 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 menapozal 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:** 30 yılı aşkın bir süredir infertilite tedavisinde kullanılan eksojen gonadotropindir. Postmenopozal kadın idrarının, sefaroze içeren ortamdan süzülmesiyle elde edilir. Menotropinler içerisinde çeşitli üriner proteinler (UP) vardır, ve oransal olarak bir ampul hMG içerisinde > % 95 UP mevcuttur. Bir HMG ampülünde 75 Ü FSH, 75 Ü 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 ampul saf-FSH, 75IU FSH aktivitesi, < %1 LH aktivitesi içerir. Saf FSH 'da IM uygulanır.

**Yüksek saflıkta üriner FSH:** Postmenopozal kadın idrarının monoklonal antikolar kullanılarak LH ve hCG'den ayrıştırılmasıyla elde edilir. u-HP-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), 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. (92), folikül gelişimini sağlayan FSH dozu ile OHSS ve çoğul gebeliğe neden olan FSH dozu arasındaki farkın çok az olduğunu bildirmiştir. Daha sonra Brown ve ark. (93), eksojen gonadotropin tedavisinde foliküllerin belli bir FSH eşik düzeyi olduğunu, bu dozun altında çok uzun süre indüksiyon yapılsa bile folikül gelişiminin sağlanamadığını bildirdiler. Dozun % 10-30 arasında artırılmasıyla eşik dozun aşıldığı, folikül gelişiminin sağlanabildiği ve bu dozun çok üzerine çıkılması halinde ise fazla sayıda folikülün uyarıldığını bildirdiler. 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 sıklularda, farklı eşik dozun olabileceği tespit edilmiştir. Eşik doz fazla geçilmese bile, eşik doza ulaşıldıktan sonra, bu dozda uzun süre devam edilirse yine birden fazla folikül 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. Foliküler gelişimin sağlandığı bu aralığa pencere periyodu (Window concept) denir (94, 95, 96).

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

Eksojen gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonunda ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu nedenle bu ajanların kullanıma girdiği 1960'li yıllardan itibaren değişik tedavi rejimleri geliştirilmiştir. Ovulasyon indüksiyonu, kullanılan ilaç dozu, serum E<sub>2</sub> düzeyi ve ultrasonografi ile kontrol edilmeye çalışılmıştır. Rabau (97) 1967'de basamaklı artım protokolünü önermiş, istenilen cevap alınmadığı zaman ilaç dozunu 1 ampul / gün şeklinde

artırmıştı. Daha sonra 5-7 günde bir 1 ampul artırılan geleneksel protokol çoğu klinikte rutin kullanıma girmiş, 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, folikül uyarımına 150 IU/gün dozunda başlanır. Uygulama günün aynı saatlerinde yapılır. Hasta serum E<sub>2</sub> 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 preovulatar folikül 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 gebeliği değerlendirmek için ise hCG gününden 14-16 gün sonra, kanda βhCG düzeyi ölçülür.

Geleneksel protokolda, yüksek doz ekzojen 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 (100) ilk kez FSH eşik doz-eşik düzey kavramını esas alarak, recFSH'yı cilt altından, 75 IU/gün dozunda foliküler yanıt alınana kadar, maksimum 15 gün uyguladı. 12 mm ve üzerinde folikül sağlanamaması halinde dozu yarım ampul artırdı. Yine yanıt alınamazsa, haftada bir yarım ampul (37.5 IU) artışlar yaptı. Foliküler gelişimin sağlandığı dozda, folikül 16 mm çapa ulaşmıncaya kadar devam etti. Folikül 16 mm çapa ulaştığında ovulasyonu tetiklemek için hCG uyguladı.

Kronik düşük doz step-up protokolünde, ovulasyon indüksiyonuna spontan menstruel siklus veya 10 mg /gün dozunda oral MPA'nın 10 günlük kullanımı sonrası gerçekleştirilen çekilme kanamasını takiben 3-5. günlerde 75 IU/gün dozunda uygulamaya başlanır. Tedavinin 7. gününde ultrasonografik inceleme yapılır. 10 mm veya daha üstünde folikül yoksa edilmezse aynı dozda 14. güne kadar devam edilir. Hala yeterli folikül gelişimi izlenemezse doz 37.5 IU/gün artırılır. Folikül gelişimi izleninceye kadar bir hafta aralıklarla bu doz artımı tekrarlanır. (en fazla 35 güne kadar). Folikül gelişiminin (10 mm veya daha üstü) izlendiği

dozda, dominant folikül 17 mm veya daha üstü boyuta ulaşınca kadar devam edilir. Ovulasyonu tetiklemek için 10.000 IU hCG intramüsküler 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, monofoliküler 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 protokolda, ovaryen yanıtın ortaya çıkmasından itibaren, hCG'nin uygulanacağı güne kadar, uygulanan FSH dozunda değişiklik yapılmamaktadır. Geç foliküler dönemde dominant folikülün büyümesi FSH'ya daha az bağımlıdır. Basamaklı artım protokolleri, bu dönemde serum FSH konsantrasyonunu artırarak daha çok folikül gelişmesine neden olabilir (101, 106, 107).

Normal menstrüel sikluslarda, perimenstrüel dönemde başlayıp erken foliküler dönemde devam eden, FSH artışı gözlenir. Geç foliküler 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 folikül sayısında azalma sağlanmaktadır (107).

Geleneksel protokol ve kronik düşük doz step-up protokolda, değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, protokolda 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 folikül gelişimi sağlanamadığında, günlük dozu 150 IU' ya çıkarmışlardır. Andah ve ark. (101) 2 gün, günde 225 IU dozu uyguladıktan sonra, 3. günde günlük dozu 150 IU' ya 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 150IU, >28 kg/m<sup>2</sup> olanlara 187.5 IU dozunda uygulama yapmışlardır. 9 mm' den büyük folikül 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 (50-100 mg/gün) en son gün düşük doz gonadotropin (75 IU FSH veya HMG ) başlanır. Folikül gelişimi hCG uygulaması kriterlerine ulaşına dek takip edilir.

**WHO GRUP III**---Hipergonadotropik hipogonadizm: endojen gonadotropin düzeyi over rezervi azalmış (primordial folikül sayısı azalmış) olgularda oluşur. Vakit kaybedilmeden yardımla üreme teknolojilerine başvurulması gerekir. Gebelik şansı oldukça düşüktür.

**HİPERPROLAKTİNEMİK ANOVULASYON:** % 15-20 oranında oligomenoreik kadında hiperprolaktinemi mevcuttur. İnfertiliteye neden olması GnRH salgısında azalmaya yol açarak hipogonadizm oluşturması şeklindedir. 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 protokolu**

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 başladıktan 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, ejakülattan ya da cerrahi yollarla alınan spermelerin oositler ile bir araya getirilmesini, eğer laboratuvar ortamında embriyolar elde edilmiş ise uterusun kaviteye transferini sağlayan bir tedavi sürecidir.

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

Tablo 4: 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. İntrauterin inseminasyon (IUI), spermatozoa'nın 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. İntrauterin inseminasyon 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 yanısıra daha fazla spermın oosit yakınına aktarılmasının da rolü olduğu söylenebilir (116). İntrauterin

inseminasyon başarısının over hiperstimulasyonu ile birlikte uygulandığında arttığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (117, 118, 119)

### **İn vitro Fertilizasyon (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, monitorizasyonu kolay ve sonucunda tekil gebeliği sağlayabilecek şekilde olmalıdır.

Over kapasitesi IVF planlanan her kadında değerlendirilmelidir. 3. gün FSH düzeyi başlanacak uygun gonadotropin dozunu belirlemek için önemlidir. Transvajinal ultrasonografi ile overler incelenerek antral folikül 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.

### **Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) Seçenekleri**

#### **A. Doğal siklus**

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

#### **B. Klomifen Sitrata**

3. gün başlanan 100 mg klomifen sitrata 5-8 gün kullanılır, normal ovulatuvar kadında 2 veya fazla folikül geliştirir. Düşük maliyet, az monitorizasyon gerekliliği yüzünden dost IVF tedavi rejimi gibi görünmektedir.

#### **C. Klomifen sitrata ve Eksojen Gonadotropin ile Ardışık Tedavi**

5 gün 100 mg /gün klomifen sitrata tedavisine gonadotropin eklenmesi tek başına klomifen tedavisine göre daha başarılıdır.

#### **D. Uzun Etkili GnRH Agonistleri ile Yapılan Down Regülasyon Sonrasında Eksojen Gonadotropin Tedavisi ( Long Protokoller)**

DeneySEL ve klinik çalışmalarda tekrarlayan invivo 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 bağımlıdır. Yine doz ve formülasyona bağılı 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 folikül gelişimi sağlanır. Böylece senkron folikül gelişimi uyarılırken, LH 'nın erken ve kontrolsüz yükselişi engellenir (122).

Genellikle adetın 21. günü başlanır, en az 14 gün süreyle GnRH analogu uygulanır. Takip eden menstruasyonun 1-3. günlerinde yapılan ultrasonografi kontrolünde 10 mm den büyük folikül yoksa, 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. 3 gün aralıklarla E<sub>2</sub> düzeyi (her bir 14 mm boyutundaki folikül için 150-200 pg/ml) ve ultrasonografi ile folikül büyümesi takip edilir. Genelde hedef en az 2 tane 17-18 mm çapında ve 14-16 mm çapında birkaç tane folikül elde etmektir. Son foliküler maturasyon için 5000-10.000 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) varlığında kötü prognozla ilişkilidir.

Kullanımdaki GnRH agonistleri ;

- a) Leuprolid asetat : en sık kullanılan formdur. Ciltaltı 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.
- b) Nafarelin asetat : intranasal uygulanır.
- c) Buserelin asetat : ciltaltı veya intranasal kullanılır.
- d) Triptorelin asetat : ciltaltı uygulanır.

### Uzun dönem GnRH-a protokolü

Önceki siklusun luteal fazında ve erken foliküler fazda GnRH a verilmesi ile hem hipofizer hem de over desensitizasyonu elde edilir. GnRH a enjeksiyonuna hCG verilene dek devam edilir. Randomize çalışmaların metaanalizinde GnRH a nun IVF iptal oranını düşürdüğü, oosit sayısını ve klinik gebelik oranlarını arttırdığı 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 analoga, siklusta ilk kullanım gününe, kullanım süresi ve kullanılan formülasyona göre değişir (120). Standart, minidoz ve ultraminidoz için önerilen dozlar aşağıda gösterilmiştir (tablo 5).

Tablo 5: GnRH analogu çeşitleri ve standart, minidoz ve ultraminidoz için önerilen dozlar

GnRH analogu	Standart doz	Mikrodoz	Ultramikrodoz
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	



### **Kısa dönem GnRH-a protokolü**

Bu protokolde GnRH-a erken foliküler fazda verilmeye başlanır. GnRH-a'nın flare up etkisinden foliküler 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 adet 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır. Folikül gelişimi takip edilerek hCG uygulama kriterlerine ulaşıncaya kadar tedaviye devam edilir.

Mikro doz flare –up protokolünde ise oral kontraseptif kullanımını takiben kanamanın 3. gününde mikro doz leuprolid (günde 2 kez 40 µg) tedavisine başlanır ve gonadotropine adet 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır. Folikül 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 regülasyon yapılan siklusların karşılaştırmasında, gebelik oranları arasında fark bulunamamıştır (130).

GnRH agonistlerinin kronik uygulama gerekliliği olması, flare-up etkileri sonucu over kistleri gelişmesi veya uzun süreli kullanıma bağlı desensitizasyon sonucu over tükenmişlik sendromu oluşturmaları yan etkileridir.

GnRH analogu kullanımıyla flare-up etkisine bağlı bazı hastalarda gelişen folikül kistlerinin varlığını bazı araştırmacılar kötü ovaryan cevap, azalmış oosit ve embriyo sayısı ile daha düşük IVF başarısı ilişkili olduğunu savunmakta olsada (131) aksini düşünen çalışmacılarda vardır.

## E. 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 foliküler 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.
- Folikül kisti flare etki olmadığı için gelişmez.
- OHSS riski daha azdır (133).

GnRH'ın sentetik analogları olan bu ilaçlar pituitar 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 reversible supresyon yaparlar; desensitizasyon periodu gerektirmezler (134, 135). Agonistlerle karşılaştırıldığında antagonistlerin etkisi oldukça 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 olmaktadır. Üçüncü jenerasyonun histamin salınım etkisi az olup, antiovulatuvar etkisi 2. jenerasyona eşdeğerdir. Üçüncü jenerasyon antagonistlerden üzerinde en çok çalışılanları cetrotrelax [Cetrotide (Serono)] ve ganirelix [Antagon veya Orgalutron (Organon)] tir.

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

Gonadotropin tedavisine başlandıktan yaklaşık 5-6 gün sonra en büyük folikül 13-14 mm çapa ulaştınca, E<sub>2</sub> seviyesi 500 pg/ml üzerinde ise 0.25 mg /gün dozunda ciltaltı enjeksiyonu şeklinde yapılır. 96 saat LH pikini geciktirecek cetroreliksin 3.0 mg lık tek enjeksiyon formu, günlük kullanım kadar rahat doz ayarlamasına izin vermez. Foliküler 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 foliküler 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 pituiter 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 folikül boyutuna göre başlamanın, sabit günde başlamak kadar etkili olduğu ve bu yöntemle daha az antagonist kullanıldığını belirten çalışmalar mevcuttur (140).

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

Normoovulatar kadınlarda tek ve büyük doz antagonistin geç foliküler dönemde kullanımının spontan LH artışını ertelediği bulundu (138). Cetrorelixle 3-5 mg sc 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 foliküler 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 çokmerkezli çalışmalarda over folikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve gebelik oranları agonist protokolüne göre daha az bulunmuştur (143). Foliküler gelişim açısından bakıldığında agonist siklusa göre antagonist sikluslarda foliküllerin 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)**

Over hiperstimulasyon sendromu (OHSS) eksojen gonadotropin tedavisinin en ciddi komplikasyonudur. IVF-ET sikluslarının % 1-10'da görülür. hCG uygulamasından sonraki 3-7. günler arasında görülen erken OHSS, ovulasyon öncesi stimulusya 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 çok sayıdaki folikül ve korpus luteum tarafından VEGF sanımıyla 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 ovaryan genişleme, E<sub>2</sub> düzeyi 3000 pg/ml den fazla, folikül boyutlarında artış) halinde şiddetli ovaryan hiperstimulasyon sendromunu (OHSS) 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 foliküler maturasyon sağlanır)
- Erken tek taraflı folikül 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 15.0000 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 Monitorizasyon**

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

Serum E<sub>2</sub> düzeyi her zaman folikül 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 foliküler büyüme takip edilir. Foliküllerin 1-3 mm/gün hızında büyümeleri beklenir. Foliküler ölçüm, içten içe birbirine dik eksendeki iki ölçümün toplanarak ortalamasının alınmasıyla elde edilir. Matür folikül ölçümü için değer 18-19 mm olmalıdır. En büyük folikül 18-19 mm ve ardından takip eden en az 3 adet 16-18 mm'lik folikül 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.

Foliküler 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)

## **Folikül Aspirasyonu**

hCG enjeksiyonunu takiben 34-36 saat sonra folikül aspirasyonu (oocyte pick-up, OPU) gerçekleştirilir. Transvajinal ultrasonografi eşliğinde intravenöz sedasyon veya her iki

lateral fornikslere yapılacak lokal anestezi ile toplanması standart işlemdir (147). Proflaktik 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 foliküllere girilerek sıvı ve oositler toplanır. 10 mm'den büyük foliküllerin toplanması için birkaç kez overe girilmesi yeterli olur.

Boş folikül sendromu yeterli folikül boyut gelişimine rağmen aspire edilen foliküllerden oosit elde edilememesi durumudur. hCG enjeksiyonunun yapılmadığını veya etkisiz olduğunu düşündür. Tek overden oosit çıkmaması halinde siklusu kurtarmak için hCG dozu tekrar edilerek 36 saat sonra diğer overdeki foliküller aspire edilmelidir (148).

Oosit toplama işleminin komplikasyon oranı oldukça düşüktür. En sık iğnenin geçtiği lateral fornikslere 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 6 : Oosit Maturasyonunun Değerlendirmesi

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, ooplazma düz-gündür. Kumulus geniş görünümlüdür.
Grade IV (postmatür)	Kumulus yığın halinde veya yok, polar body var, ooplazma 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 hyalüronidaz 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 İşlemi**

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 hücresinin mikropipet yardımıyla oosit sitoplazmasına yerleştirilmesi işlemine intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) denir. ICSI ile ilk denemeler 1962 yılında deniz diken 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, fragmantasyon 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 7 : Genel Embriyo Değerlendirmesi

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

### **Embriyo Transferi**

Embriyolar pronukleer fazdan blastokist aşamasına kadar herhangi bir dönemde transfer edilebilsede sıklıkla 2. veya 3. gün (6-8 hücreli) grade 1-2 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 aktarılarak 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 hücreleri 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 periyoddan 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. Folikül aspirasyonu sonrasında oluşan korpus luteumlar bu nedenle LH uyarısı olmadığı için progesteron üretemezler. 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 :

- a) Oral tablet (günlük 300-800 mg )
- b) Vajinal jel % 8 (günlük 90 mg )
- c) Vajinal tablet (günlük100-600 mg )
- d) İntramusküler enjeksiyon (25-50 mg günlük )

Folikül aspirasyonunun ertesi günü luteal faz desteği için progesteron formları veya hCG (3 günde bir 1500-2000 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 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 ORTAMLARININ YAPISI

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  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $PO_4^-$ ,  $Cl^-$  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 edilmiştir.

Optimal kültür ortamının bulundurulması 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 bikarbonat / CO<sub>2</sub> tampon sistemidir. Mediumlar içerdikleri HCO<sub>3</sub> nedeniyle hava ile temas ettiklerinde kısa sürede pH yükselmeye neden olurlar. Bu nedenle CO<sub>2</sub> oranını % 5' te tutmak amacıyla işlem öncesinde kültür ortamlarının yaklaşık 16 saat süreyle % 5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübatörde bekletilmesi gerekir. İnkübatör dışında yapılacak işlemlerde gaz değişiminin yaratacağı olumsuzlukları önlemek için yağ altında çalışılmalı ve HEPES (hidroksietilpiperazinethansülfonikası) 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.

## **KO-KÜLTÜR SİSTEMLERİ**

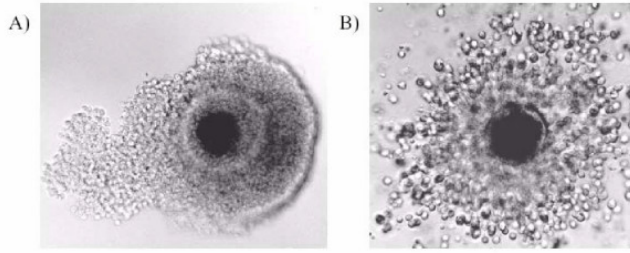
Yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen embriyoların in vitro gelişimlerinin desteklenmesi gerekmektedir. Laboratuvar şartlarında hücreler için gerekli besin maddelerini, sitokinleri ve büyüme faktörlerini içeren, ortamdaki zararlı maddeleri uzaklaştıran kokültür sistemleri geliştirilmiştir. Embriyoların çeşitli basamaklardaki blokajlarını aşabilmek amaçlanmıştır. Oluşan embriyoların in vitro ihtiyaçlarını karşılamak, gelişimlerini ve implantasyon kabiliyetlerini desteklemek amaçlı insan üreme dokularından birçok hücre tipi ko-kültür amacıyla kullanılmıştır. İnsan ve inek ovidukt, uterus, böbrek ve over kanseri hücrelerinin bu amaçla kullanımları blastokist gelişimi sağlamıştır ancak implantasyon oranları çok yükselmemiş, ayrıca viral kontaminasyon, hücreler arası gereksiz mediatör salınımı, metabolik atık birikimi gibi sıkıntılar oluşmuştur (157).

Sıradan kültür mediumları insan tubal sıvısının benzeri olup maternal serum veya protein eklerini içermektedir. İlk planlanan bu amaçla tubal epitelyum hücrelerinin kullanılması olmuştur. Ancak karşılaşılan zorluklar bunu uygulanabilir olmaktan çıkarmıştır. İnek uterus hücre kullanımında çeşitli enfeksiyöz ajanların geçiş riski olması nedeniyle FDA otolog kaynaklar dışında hücre kullanımını yasaklamıştır (158, 159). Çalışmalar otolog endometrial hücrelerin kullanılması şeklinde olmuştur. Özellikle daha önce bir veya daha fazla IVF başarısızlığı olan kadınlarda kullanılmalarının faydalı olabileceği gösterilmiştir (160, 161, 162).

Homolog membran granuloza hücreleri veya homolog endometrial hücreler kullanılarak ko-kültürler geliştirilmiştir. Böylece viral kontaminasyon riskinden uzak, oosit ve embriyolar için kendi doğal ortamlarının sağlandığı kültür ortamları oluşturulabilmiştir.

Ovulasyon; fertilize edilebilme kapasitesi taşıyan oosit ve onu çevreleyen somatik kumulus hücrelerinin overden atılmasıdır (şekil 1). Ovulasyon öncesi gonadotropinlerin kan seviyesinin yükselmesine yanıt olarak oosit mayoz bölünmeyi sürdürürken kumulus hücreleri hyaluronik asit (hyaluronan) üretimine başlar. Kumulus hücreleri ovulasyon öncesinde oosit maturasyonunu destekler, ovulasyon esnasında tubalar ile iletişimi sağlar ve ovulasyondan kısa süre sonra spermatozoanın oosit ile birleşmesindeki kompleks mekanizmalara eşlik eder. Bu nedenle kumulus hücrelerinin ko-kültür ortamı olarak kullanılmasının temelinde oosite sağladığı desteğin devam etmesi amacı vardır.

Memelilerin ovulasyonunda, fizyolojik ve biyokimyasal süreçler etkisiyle preovulatar folikülden, COC genişlemesi görülür (şekil 1). Ovulasyonun en önemli basamağı kumulus hücreleri tarafından üretilen yüksek viskoelastik ekstrasellüler matriks üretimidir. Birçok çalışma bu ekstrasellüler matriksin kadın infertilitesi için en kritik nokta olduğunu göstermiştir. Hyaluronan, negatif yüklü glikozaminoglikan, COC matriksinin major komponentidir. Midsikluskdaki LH yükselmesinden sonra COC genişlemesinden sorumludur (163).



Şekil 1 : A ve B; kumulus hücre-oosit kompleksleri ve çevresinde genişlemiş viskoelastik matriks, (Dell'Aquila et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004 2:44 doi:10.1186/1477-7827-2-44)

Overlerin graff hücreleri endokrin ve gelişim fonksiyonları olan somatik hücrelerdir. Endokrin fonksiyonları, steroidogenez gibi, öncelikle sıralı granuloza hücreleri (kumulus hücreleri) tarafından yapılır. Kumulus hücreleri, oosit ile yakın ilişkili olan hücreler, oositin büyümesi ve gelişmesi için oosit ile karşılıklı etkileşime girerler.

Kokültür sistemi için gerekli kumulus –granuloza hücreleri, folikül aspirasyonunda oosit ile birlikte folikül sıvısının içindedir, kolay elde edilir. Ek işlem yapılmadan birleşen hücreleri kokültür yapısı oluştururlar, otolog oldukları için de viral tarama gerektirmezler. Bu hücreler steroid ve protein sentezleyerek parakrin yolla erken dönem embriyoların gelişimini

desteklerler (163). Uzun mikrovillusları sayesinde hücrenin oolemmasına ulaşır gap junctionlar ve desmosomlar oluştururlar. Bu sayede metabolitlerin veya gerekli maddelerin hücreler arası taşınmasını sağlarlar.

Kumulus hücreleri kültür mediumu içeriğinin pH 'sını stabilize ederler, istenmeyen maddeleri (oksidatif ajanlar, hypoksantin gibi ) ortadan kaldırırlar. Aynı zamanda embriyo gelişimini destekleyen bazı maddeler salgırlar. Embriyoların kumulus hücrelerini steroidogenez yapması için uyardığı düşünülmektedir.

Fabrizi ve ark. yaptığı bir çalışmaya göre, kumulus hücre kokültürü yapılan embriyolar için, iyi kalitedekilerin kültür ortamında yaklaşık 90 kDa luk protein üretimi tespit edilmiştir. Kumulus hücreleri ve embriyolar arasındaki iletişim ile protein üretiminin bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Embriyotrofik faktörler olarak nitelendirilen kumulus hücrelerinin ürettiği steroid ve proteinler embriyoların erken gelişim dönemini olumlu etkilemektedir.

Aynı çalışmada, insan ootog kumulus hücreleri ile oluşturulan kokültür sisteminin blastokist aşamasına kadar embriyo gelişimini desteklediği gösterilmiştir. Blastokist gelişim oranları karşılaştırıldığında, blastokist gelişiminin klasik medium kullanımı ile % 7, kumulus hücre kokültür kullanımı ile % 50 oranında olduğu tespit edilmiştir. Bu gelişime rağmen çalışma gebelik oranlarında gelişme bildirmemiştir. Çalışmada, 2. gün embriyo transferi ile % 16.6 gebelik oranına karşılık, blastokist transferi ile % 14.2 oranında gebelik elde edilmiştir.

Buna karşılık Wiemer ve ark. yaptığı çalışmada (164) sığır ovidukt epitel hücrelerinin kullanımıyla hem embriyo morfolojisinin iyileştiği hem de gebelik oranlarının arttığını bildirilmiştir. 2. gün embriyo transferi için gebelik oranlarını bahsedilen hücre kokültürü için % 43, klasik medium kullanımı için % 29 olarak vermiştir. Transfer edilmeyen embriyoların ise blastokiste gidiş oranını (%58.4), klasik medium kullanımına göre (%29.7) oldukça yüksek oranda bildirmiştir.

Benzer olarak Freeman ve ark. yaptığı çalışmada (165), embriyolar kumulus hücreleri ile 2 gün kokültüre edilip, en iyi kalitede 3 veya 4 adet seçilerek transfer edilmiştir. Gebelik oranı % 54.2 olarak bildirmiştir. Transfer edilmeyen embriyoların kokültür ortamında blastokiste ilerleme oranları ise % 67.7 olarak yayınlanmıştır.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarla ilgili olarak, kumulus hücrelerinin kokültür ortamı için elde edilme metodlarındaki farklılıklarda embriyo gelişimi ve gebelik oranlarına etkili olabilir. Freeman ve ark, Percoll veya santrifüj yöntemi kullanmadan kültür mediumunda sedimentasyon yöntemiyle (basit yerçekimi) kumulus hücrelerini elde etmişlerdir. Her bir dishe 100.000 hücre konulmuştur. Fabbri ve ark. ise santrifüj yöntemiyle hücreleri toplamışlar ve her dishe 250.000 hücre paylaşmışlardır. Bu iki çalışmadaki gebelik sonuçları karşılaştırıldığında, belkide daha nazik hücre elde etme yönteminin ve daha az sayıda hücre kullanımının embriyoların gelişimi için daha uygun kokültür ortamı yarattığı düşünülebilir.

Otolog kumulus hücre kokültür sistemlerinin diğerlerine göre birçok avantajı vardır. Otolog sistemlerde enfeksiyon taraması gereksizdir. Oosit aspirasyonu esnasında elde edilmeleri kolaydır. 24 saat içinde kokültür için hazır olurlar. Diğer hücre kültürlerinin ömürleri kısadır ancak kumulus hücreleri 7-10 güne kadar kültürde yaşarlar. pH düzeyleri sabit kalır ve medium değişiminde çok az artık madde bulunur.

Literatürdeki değişik çalışmalarda yayınlanan oranlar karşılaştırıldığında, in vivo ortamda embriyoların gelişimi hakkında bilgimizin olmaması ve embriyo kalitesini değerlendirmek için standartların olmaması nedeniyle kokültür sistemleri insan embriyolarında kaliteyi artırma gücünü kanıtlayamamaktadır. Bazı araştırmacılar blastokist oluşumunun embriyonun kalitesini gösteremeyeceğini, bu nedenle gebelik oranlarının iyileştirilmesi için kokültür sisteminin gücünü ölçmede blastokist gelişiminin güvenilir kanıt olamayacağını savunmaktadırlar (166, 167).

Fabbri ve ark . yaptıkları çalışmada (168) kumulus hücre kokültürünün erken dönemde uygun olmayan bazı embriyoların gelişimini destekleyerek blastokist aşamasına ulaştırdığını, böylece dondurulmalarına olanak sağladığını bildirmişlerdir. 6. güne kadar kumulus hücre kokültüründe tutulan kötü kalitedeki embriyoların % 32 oranında sağlıklı blastokistlere geliştiği izlenmiştir. Dirnfeld ve ark. yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde etmiştir (169). Kumulus hücre kokültüründe ve HTF (human tubal fluid) mediumunda gelişen 4-8 hücreli embriyolar karşılaştırıldığında sırayla; kötü kalitedeki embriyoların oranı % 14 ve % 51, iyi kalitedeki embriyoların oranı % 56.6 ve % 4 olarak gözlemlenmiştir.

Goud ve ark. in vitro maturasyon için, kumulus hücresi ile etkileşim halinde kültürde bekletilen oositlerin nükleer maturasyonunun, kumulus hücresinden temizlenenlere göre daha yüksek oranda geliştiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada klivaj oranlarının kumulus ilişkili oositlerde arttığı, sitoplazmik maturasyonunun daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (170).



Ovulasyon öncesi dönemde oosit etrafında kumulus matriksinin hızla oluşumu yegane ve dinamik biyolojik bir olaydır. Somatik over hücreleri ve oosit tarafından üretilen proteinler ve dolaşan hormonlar sayesinde kumulus hücrelerinin kompleks genlerinin regulasyonu ile kumulus matriksi oluşur. Bu kompleksin düzgün oluşumu ve birleşimi, folikül çatlaması, oositin transportu ve fertilizasyonu gibi kadın infertilitesinin çeşitli basamakları için çok önemlidir. Günümüzde kumulus matriksinin infertilitedeki rolü hakkında çok az çalışma olmasına rağmen, oositlerin büyüme kapasiteleri hakkında önemli bilgiler içerdiği ve matriksin anahtar roller oynadığı düşünülmektedir.

Tüm memelilerde LH artışının, oosit maturasyonu ve ovulasyonunu oluşturacak bir dizi olayı başlattığı bilinmektedir. Bu etki sonucu oosit, kumulus hücrelerini oosit maturasyonu için uyarır. Kumulus hücreleri fertilizasyonda, embriyo gelişiminde ve gebelik oluşumunda önemli rollere sahiptir. Hücreler arası etkileşim sonucu kumulus matriksi, yapısında tekrarlayan disakkaritlerden oluşan glukronik asit ve N-asetilglukozamini içeren glukozaminoglikan formdaki Hyaluronan (HA) içerir. HA sentezi ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimi ile kumulus genişlemesi oluşur. LH artışı HA sentezini tetiklerken, FSH uyarısı da 3-6 saat içinde COC artışını 30 kez artırır (171). Böylece kumulus hücre –oosit kompleksini çevreleyen, ovulasyonu sağlayan viskoelastik matriks meydana gelir (172).

Hyaluronan (HA) birçok dokuda önemli bir ekstrasellüler matriks komponentidir. Toole ve ark. yaptıkları çalışmalarda inflamasyonda, doku yenilenmesinde, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıklarda varlığı gösterilmiştir (173). HA, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, direkt olarak hücre davranışını etkileyebilir. Güncel çalışmalar HA 'nın tümör hücrelerinin yüzeylerindeki CD44 reseptörleri ile etkileştiğini, ErbB2 reseptörünü aktive ettiğini, bunun sonucunda hücre büyümesi ve yaşaması için etkili sinyal olan PI3K yolunun aktive olduğunu göstermektedir (174, 175). Bu yol COC içinde de aktiftir. CD44 sentezi HA sentezi ile paralel olup, in vitro ortamdaki kumulus hücre kültürlerinde HA nın apoptotik indeksi azalttığı gözlemlenmiştir (176, 177). HA 'nın esas görevi ekstrasellüler matriksin hücreler arası boşluklarını doldurmaktır. Oluşan kumulus matriksi viskoelastik özellik gösterir bu da COC nin kolay deforme olmasına olanak tanır böylece ovulasyon esnasında rüptüre olan folikülün kolay geçişi sağlanmış olur.

Preovulatar folikülde proteinler, COC matriksinin fonksiyonlarını sağlamak ve matriksin uygun yapısını oluşturmak için hem serumdan elde edilir hem de lokal olarak sentezlenir. Komponentleri arasında inter  $\alpha$ - tripsin ailesinin ağır zinciri, tümör nekrozis faktör ile uyarılmış protein -6 (Tnfp-6), pentraxin 3 (PTX3), proteoglikan şeklinde olan

versikanlar bulunur. Uygun şekilde genişlemiş kumulus matriksinin fertilizasyon için çok önemli olduğu bilinmektedir. Farelerde yapılan bazı çalışmalar bize; kumulus matriksini oluşturan bikunin, Tnfp-6 veya PTX3 genlerinin farenin genetik problemleri sonucu ekspresyonunun oluşmaması halinde oosit fertilizasyon yetmezliğine bağlı sterilite veya subfertiliteye neden olduğunu göstermiştir (178, 179, 180).

İn vivo olarak birçok faktör kumulus hücre genişlemesini etkilemektedir. LH, granuloza hücresinde G-proteini bağlı reseptörüne bağlanınca adenilat siklazı aktive eder. Hücre içinde siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyini artırır. cAMP düzeyini arttıran diğer faktörler; FSH, prostaglandin E2 (PGE2), cAMP analogları da in vitro ortamda hücreyi uyarak kumulus genişlemesine yol açarlar. PG üretimini kontrol eden siklooksijenaz-2 (COX 2) enziminin varlığında, COC genişlemesi oluşur. Kadınların bu enzim inhibitörleri (indometazin, NS-398 ) ile tedavi edilmeleri halinde ovulasyonlarında gecikme oluştuğunu gösteren çalışmalar vardır (181, 182). COX-2 geninin, farelerde mutasyonunun infertilite ile sonuçlanan kumulus genişleme problemlerini, ovulasyon gecikmesini ve oosit fertilizasyon yetmezliğini ortaya çıkardığı gösterilmiştir (183, 184).

İn vitro epidermal growth faktör (EGF) ailesi COC matriks üretimini düzenler. EGF, HA sentezi için bir önemli uyarıcıdır (185). Kumulus hücrelerinin hormonlara ve foliküler faktörlere yanıtı üzerinde oositin ürettiği büyüme faktörlerinin rolü vardır.

Fertilizasyonda, COC matriksi oluşumu oositin atılması için önemli bir öncüdür. Sperm oosit ile kontakt kurmadan önce kumulus matriksi ile temasa geçer. Komponentleri veya biyolojik aktif molekülleri sayesinde kumulus matriksi sperm için kemoatraktan maddedir (186). Kumulus matriksi sperm kapasitasyonunda da önemli rol alır, yüksek fertilizasyon potansiyeli olan sperm için seçici bariyer görevi görür. COC' un proteoglikan içeriği insan sperm akrozom reaksiyonunu hızlandırır (187).

Ovulasyondan sonra oositin oviduktal epitele tutunabilmesi için COC matriksi ile fallop tüpünün silialı infundibular epiteli arasında selektif adezyon gereklidir. Matriks ile kaplanmış COC başarılı şekilde oviduktal lümene taşınırken kumulusdan yoksun, matriks ile çevrelenmemiş oositler taşınmaz. Ovulasyondan sonraki bozulmuş oosit taşınması COC matriksinin parçalanamaması ile ilişkilidir. Bunun sonucu olarak hastalarda ya infertilite ya da bozulmuş oosit taşınmasına bağlı ektopik gebelikler oluşmaktadır (188).

COC matriksinin intrasellüler sinyalleşmede önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. Suziki va ark. yaptıkları çalışmada, COC matriks bileşenlerinden olan proteoglikan kompleksi şeklindeki antiproteaz etkilili inter- $\alpha$ - tripsin inhibitörü (I $\alpha$ I) ailesinin COC matriksi oluşumundaki ve fonksiyonundaki etkiye dikkatleri çekmişlerdir. Mikroarray ve

polimeraz chain reaksiyonu analizi ile hCG enjeksiyonu sonrasında fare COC 'da inter- $\alpha$ -tripsin inhibitörü (I $\alpha$ I) yokluğunda 29 genin regulasyonunun aktifleştiği, 5 genin regulasyonunun ise inhibe olarak ovulasyon yetmezliğine neden olduklarını bulmuşlardır (189).

Wu ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada kumulus hücre varlığının oosit üzerindeki oksidatif stresi azalttığını ortaya göstermişlerdir. Perisellüler HA ve versikanların hücrelerdeki oksidatif hasarın önemli inhibitörleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle COC matriksinde bulunan bir çeşit proteoglikan olan versikanın, doku kanlanması ve inflamasyonun olduğu ovulasyon sırasında oksidatif serbest radikallerin artışına karşı oositi koruduğu düşünülmektedir (190).

COC matriksinin sentezi ve kumulus genlerinin aktifleşmesi oosit kalitesi ve gelişme kapasitesine bağlıdır. Kumulus genişlemesi düzeyi, IVF için kaliteli oositlerin seçilmesi konusunda yıllarca kriter olarak kullanılmıştır (191). Oosit kalitelerinin, folikül sıvısındaki HA konsantrasyonu gibi kumulus hücrelerindeki CD44 gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalarda COX-2, HAS-2, Gremlin ve PTX3 ekspresyonları da oosit kalitesiyle ilişkili bulunmuştur (192, 193). Kumulus hücreleri, sitoplazmik uzantılarıyla zona pellusidayı geçerek oosit plazmalemmasına ulaşırlar ve böylelikle oosit maturasyonunda gerekli substratların bir kısmını hücreye sağlarlar. Bu hücreler hem endokrin hem de parakrin özellik taşımaktadırlar (194).

Russell ve ark. yaptığı çalışmaya göre kumulus hücre matriksinin ovulasyon ve fertilizasyon başarısı için vazgeçilmez olduğu bilinmektedir (194). Kumulus matriks gelişiminin, oositin büyüme potansiyeli ile bağlantılı olduğu, genler aracılığıyla oosit ve kumulus hücrelerinin etkileştiği gösterilmiştir. COC matriks oluşumu kumulus hücresinden hyaluronan (HA) sentezini gerektirir. LH etkisiyle oosit tarafından salgılanan büyüme faktörleri, kumulus hücresindeki matriks üreten genleri harekete geçirir. HA üreten hyaluronan sentetaz 2 (Has2) bu yol ile aktive olur (195, 196, 197, 198). Aktivasyonu oositin büyüme kapasitesiyle ilişkilidir.

Oosit ile kumulus hücreleri arasında büyüme faktörleri ve gen aktivasyonu etkileşiminin oosit fertilize olduktan sonra da devam ettiği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında planlanan çalışmamızda;

- folikül aspirasyonu ile elde edilen otolog COC kullanımıyla, ICSI işlemi sonrasında embriyolar için doğal hücre kültürü ortamının sağlanması ,
- hücreler arası iletişimin devamı sayesinde (büyüme faktörleri, sitokin salgıları ile ) oluşan embriyoların kültür ortamında desteklenmesi,
- uterin kaviteye embriyolar ve COC'un birlikte transferi ,
- birlikte transfer sayesinde, COC'un selektif adezyon kabiliyetinden faydalanarak embriyonun endometriumun yüzeyel tabakasındaki pinopodlara temasının kolaylaştırılması ve bunun implantasyona etkisini araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

01.01.2008-31.01.2009 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesine infertilite nedeniyle başvuran ve değerlendirilmeleri sonucunda tubal faktör, ovulatuvar faktör, erkek infertilitesi tespit edilen veya açıklanamayan infertilite tanısı alan hastalar, ICSI-ET (intrasitoplazmik sperm injeksiyonu –embriyo transferi) yapılması amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmamız fakültemiz etik kurulu onayını almıştır.

Çalışmaya alınma kriterleri :

- Yaş >24 , <38
- Vücut kitle indeksi 18-29 arasında
- Primer ya da sekonder infertilite nedeniyle başvuran tubal faktör , ovulatuvar faktör veya erkek faktörü tespit edilerek ICSI için tedavi endikasyonu bulunan
- Açıklanamayan infertilite grubunda olanlar
- Düzenli menstrüel siklusa sahip hastalar (25-31 gün )
- Over rezervi normal veya yüksek tahmin edilenler, menstruasyonun 3. günü yapılan transvajinal ultrasonografide antral folikül sayısı 10 ve üzeri hastalar
- Menstruasyonun 3. günü bazal FSH değeri < 11 , E<sub>2</sub> değeri < 80 pg/ml olanlar
- Prolaktin seviyesi ve tiroid fonksiyon testleri normal olanlar
- Folikül aspirasyonu sonrası elde edilen matür oosit (MII) sayısı > 10 üzerinde

## Çalışmaya alınmama kriterleri

- İleri yaş (yaş>38)
- Klinik olarak anlamlı sistemik veya endokrinolojik hastalığı olanlar (diabetes mellitus, Cushing hastalığı, tiroid fonksiyon bozukluğu, hiperprolaktinemi... )
- Histerosalpingografi, sonohisterografi veya ofis histeroskopi ile daha önce uterin kavitede submükoz myom, polip, septum, sineşi gibi yer kaplayan lezyon tespit edilenler
- Daha önceki sikluslarında over cevabı kötü olanlar ( poor responder )
- 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

Çalışmaya alınan hastaların hepsine uzun protokol (GnRH analogu ile down regülasyon ) agonist tedavisi sonrası recFSH ve /veya HMG kullanılarak kontrollü ovaryan hiperstimulasyonu uygulanmıştır. Foliküler matürasyon monitörize edilerek yeterli boyuta ulaştığı zamanda hCG uygulaması ile ovulasyon tetiklenmiştir. Takip eden folikül aspirasyonu ile oositler ve otolog kumulus hücreleri elde edilmiştir. Rutin ICSI yöntemi ile matür oositlerin fertilizasyonu sağlanmıştır. Semen örnekleri masturbasyon yöntemiyle, genelde 2-4 günlük cinsel perhiz sonrasında, folikül aspirasyonunun yapılacağı gün merkezimizde toplanmıştır. Her iki grup ta da eşit olarak 3'er, toplam 6 hastanın spermleri mikrocerrahi yöntemlerden TESA/TESE işlemi sonucu elde edilmiştir.

Grup 1 (kontrol grubu) 50, Grup 2 (çalışma grubu) 50 hasta yukarıda belirtilen çalışma kriterlerine uygun bulunarak randomize edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma grubunda (grup 2) folikül aspirasyonu ile elde edilen otolog COC 'lar, ICSI işlemi yapılan embriyoların kültür ortamı olarak kullanılmış, kontrol grubunda (grup 1) ise rutin işlemdeki gibi ICSI sonrası embriyolar ardışık medium sıvıları ile kültüre edilerek gelişimleri takip edilmiştir.

Folikül aspirasyonunu takip eden 2.-3. günlerde çalışma grubunda en iyi kalitedeki embriyolar COC' lar eşliğinde uterin kaviteye transfer edilmiştir. Kontrol grubunda ise rutin

uygulamadaki gibi kumulus hücreleri olmadan en iyi kalitedeki embriyolar seçilerek transfer yapılmıştır. Her iki grup için implantasyon ve gebelik sonuçları kaydedilmiştir.

### **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 foliküler fazda ultrasonografi yardımıyla pelvik alan patolojileri değerlendirildi. Uterus boyutları, endometrium kalınlığı, over boyutları, folikül 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 ile başlandı. Takip eden menstruasyonun 2-3. gününde serum östrojen (E<sub>2</sub>) düzeyinin 50 pg/ ml altında tespiti veya menstruasyonu olmayan hastalar için en az 14 süreyle GnRH analogunun uygulanmış olması, 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 foliküllerin sayı ve boyutları, endometriumun kalınlığı ve serum östrojen (E<sub>2</sub>) düzeyleri kaydedildi. Over cevabına göre doz arttırılarak veya azaltılarak ayarlandı. 2-3 gün aralıklarla folikül gelişimi transvajinal ultrasonografi ve serum östrojen (E<sub>2</sub>) seviyeleri ile takip edildi. Önde giden folikül 18-20 mm olduğunda veya foliküllerden ikisi 17 mm olduğunda üriner hCG 10.000 IU (Pregnyl amp, Organon, Türkiye) İ.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 fornikse 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 foliküllere girilerek sıvı, kumulus hücreleri ve oositler toplandı.

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

Çalışma grubu için (grup 2), matur oosit sayısı (M II) 10 ve üzerinde olan hastalar randomize olarak seçildi. Folikül aspirasyonu ile hem oositler hem de çalışma grubunda kullanılacak olan kumulus hücre-oosit kompleksleri elde edildi. Yeterli sayıda oosite mikroinjeksiyon işlemi uygulandıktan sonra geride kalan, kullanılmayacak olan kumulus hücre-oosit kompleksleri, kültür ortamı yaratmak amacıyla kültür dishine bırakıldı. ICSI işlemi yapılan oositler, olog kumulus hücre-oosit kompleksleri ile aynı ortama yerleştirildi (1 kumulus hücre-oosit kompleksi / 3 dölllenmiş oosit ). Uygun laboratuvar koşulları altında (% 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem, 37<sup>0</sup> C sıcaklıkta ) gelişmeleri takip edildi. 18.saatte fertilizasyon ve klivaj oranları, 24- 48 -72. saatte embriyo gelişimleri değerlendirilerek veriler kaydedildi.

ICSI işlemi sonrasındaki 2 veya 3. günde, çalışma grubu (Grup2) için, gelişen embriyolar arasından en yüksek skorlara sahip kalitede maksimum 3 adet ( Sağlık Bakanlığının sınırladığı sayıda ) seçilerek, kültür ortamındaki kumulus hücre-oosit kompleksi birlikteliğinde embriyo transfer kateterine yüklenip uterin kaviteye ultrasonografik görüntüleme yardımıyla bırakıldı. Transfer katateri olarak Wallace 23 mm soft kateter (Smiths, İngiltere) kullanıldı.

Kontrol grubunu (grup 1) oluşturmak için, bahsedilen çalışma kriterlerine sahip hastalara GnRH analogu ile down regülasyonu sağlanarak ovulasyon indüksiyonu için uygun dozda gonadotropin tedavisine başlandı. Foliküler maturasyon takip edildi, uygun zamanda hCG injeksiyonu ile ovulasyon tetiklendi. Sonrasında 35-37. saatte folikül aspirasyonu uygulandı, 10 ve üzeri oosit elde edilen hastalar randomize şekilde seçildi. Grup 2 'den farklı olarak Grup 1'de toplanan oositlerin kumulus hücreleri hyaluronidaz enzimi (Hyase) kullanılarak temizlendi, ardından rutin mikroenjeksiyon işlemi uygulandı, uygun laboratuvar şartlarında oluşan embriyoların gelişimleri ardışık kültür mediumları kullanılarak takip edildi. Grup 2 için bahsedilen saatlerdeki gibi Grup 1 için de embriyo fertilizasyon ve klivaj oranları kaydedildi. Gelişen embriyolardan 2. veya 3. günde en yüksek skorlara sahip kalitede maksimum 3 adet (Sağlık Bakanlığının sınırladığı sayıda ) seçilerek intrauterin kaviteye transfer edildi. Transfer esnasında kumulus hücreleri eklenmedi. Transfer kateteri olarak Wallace 23 mm soft kateter (Smiths, İngiltere) kullanıldı. Çalışmamızda folikül aspirasyonu ve embriyo transfer işlemleri aynı hekim tarafından gerçekleştirildi.

Tüm hastalara luteal faz desteği amacıyla foliküllerin aspire edildiği gün akşamı başlanan intravajinal 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 s.c. 1\*1 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 gebelik kesesi ve kardiak aktivite saptanan vakalar klinik gebelik olarak, 12.gebelik haftasını dolduranlar ise devam eden gebelik olarak kabul edildi.Gebelik olduğu takdirde vajinal progesterona 10. gebelik haftasına dek devam edildi.

### **Embriyo Yükleme Prosedürü**

Her bir hasta için, 16-17 G luk iğne yardımıyla, en uygun vakum basıncında (100-200 mmHg) transvajinal ultrasonografi eşliğinde 17-22 mm boyutundaki tüm foliküllere girilerek elde edilen aspirasyon sıvıları steriomikroskop altında incelendi. COC'lar pipet ucu ile toplandı. Vakadan alınan COC'lar Tubal Fluid eşdeğeri sıvıda (HTF, SAGE) toplandı, toplanan COC'ların sayısı 10 ve yukarı olduğunda çalışmaya dahil edildi. COC'lar, mineral oil altında 400-500 ml fertilizasyon mediumuna (SAGE, USA) toplandı. Çalışmada gruplama



işlemi (Grup 1 ve 2 için) daha önceden randomize bir şekilde düzenlendi ve embriyolog en son haberdar edildi ki bu da hyase enzimi ile muameleden önce yapıldı. Vaka, çalışma grubuna (Grup 2) alınacak ise COC'lardan 12 adet en geniş ekspansiyon olanlar enjeksiyon işlemine girecek şekilde hyase enzimli solüsyon ile 15-20 saniyelik işleme tabii tutuldu ve yarıklanma mediumuna alındı (SAGE); geriye kalan 4 adet COC kokültür amaçlı olarak, ICSI sonrası için hazırlanan dishteki 85-90 mikrolitrelik yarıklanma mediumuna yerleştirildi. Ancak kokültür için seçilen COC'lar 3-4 değişik HTF dropletinde mekanik pipetting yöntemi ile iyice yıkandı (1-1.5 ml), özellikle eritrosit kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırıldı.

Eğer Grup 2'ye seçilmemiş ise en az ekspansiyon olan 4 COC ayrıldı ve hem Grup 1 hem de Grup 2 için eşit devam edecek olan hyase enzimi ve denuding aşamaları gerçekleştirildi. Çıplak zonası ortaya çıkan 12 adet oosit ICSI dishine yerleştirildi ve 10 adet oosite sperm enjekte edildi. ICSI işleminden sonra oositler Grup 1 için 3-4 oosit 1 adet 70-80 mikrolitrelik klivaj mediumunda, Grup 2 içinse 3-4 oosit bir adet COC ile beraber olacak şekilde 85-90 mikrolitrelik droplette yerleştirildi. Embriyo kültür işlemlerinde Grup 2 için COC'lar gelişen embriyolarla beraber aynı droplette kaldı, changede de bu beraberliğin devamına dikkat edildi. Hücre kültür inkübasyon işlemleri %5 CO<sub>2</sub> ve 37<sup>0</sup>C ortamında (Nuair, USA) gerçekleştirildi.

Her iki grupta 18-21. saatleri için pronukleus kontrolleri yapıldı. Embriyo transferi 2. veya 3. gün gerçekleştirildi. Transfer işleminde Grup 1 için en iyi kalitede embriyolar seçildi ve 40-50 mikrolitre %30 HSA katkılı medium (SAGE) içerisinde katatere (Wallace soft katater) yüklendi. Grup 2 için aynı işlemler uygulandı ancak transfer edilecek embriyoların beraberinde kültürde devam eden COC'da ilave edilerek embriyo transfer kataterine hem embriyolar hem de COC'lar birlikte yüklendi. Kateter içeriği 8-10 saniye içerisinde uterus kavitesine bırakıldı.

## Gruplar arasında karşılaştırılan parametreler

Her iki grup arasındaki parametreleri karşılaştırmada elde edilen kriterlere uygun olarak Ki-kare, T Test ve Mann Witney –U testleri kullanıldı.  $P < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

Grup 1 ve Grup 2 arasında, yaş, indüksiyon gün süresi, günlük kullanılan recFSH dozu, toplam recFSH dozları, günlük kullanılan LHdozu, toplam LH dozları, toplam kullanılan gonadotropin dozları, hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri, folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrason ile ölçülen endometrium kalınlıkları, toplanan MII oosit sayıları, siklus başına ortalama MII sayıları, fertilizasyon ve klivaj oranları, fertilize olan embriyolardan transfere uygun kalitede gelişen embriyoların sayıları, embriyoların transfer edildiği gün, transfer edilen embriyo sayıları, transfer edilen ortalama embriyo sayıları, implantasyon ve gebelik oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

## BULGULAR

Her iki grup için uygulanan ovulasyon induksiyonuna yanıt ile ilgili parametreler Tablo 8 de belirtilmiştir. Yaş, indüksiyon gün süresi, günlük kullanılan recFSH dozu, toplam recFSH dozları, günlük kullanılan LHdozu, toplam LH dozları, toplam kullanılan gonadotropin dozları, hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri (pg/ml), folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrason ile ölçülen endometrium kalınlıkları(mm), toplanan MII oosit sayıları, siklus başına ortalama MII sayıları, açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.

Hastaların yaş aralığı 24-38 idi. Grup 1 de ortalama yaş değeri  $27,6 \pm 3,3$ , Grup 2 de  $28,8 \pm 4,4$  olup gruplar arasında yaş açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi ( $P > 0,05$ ).

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 fark yoktu( $P > 0,05$ ).

Tablo 8: Kontrol ve Çalışma Gruplarının Kontrollü 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	27,6 ± 3,3	28,8 ± 4,4	P > 0.05
İndüksiyon süresi (gün)	10,52 ± 1,1	10,48 ± 1,0	P > 0.05
Günlük kullanılan recFSH dozu (IU)	185 ± 46,2	177,5 ± 37,2	P > 0.05
Toplam recFSH miktarı (IU)	1884,5 ± 502,3	1859,5 ± 434,5	P > 0.05
Günlük kullanılan HMG dozu (IU)	78 ± 14,8	84 ± 24,6	P > 0.05
Toplam HMG miktarı (IU)	813 ± 127,9	877,5 ± 255,9	P > 0.05
Toplam gonadotropin miktarı (IU) (recFSH+HMG)	2697,5 ± 539,3	2737 ± 435,6	P > 0.05
hCG günü serum E <sub>2</sub> (pg/ml)	2166 ± 425,5	2210 ± 369,3	P > 0.05
h CG günü endometrial kalınlık (mm)	10,5 ± 1,7	10,7 ± 1,7	P > 0.05
Toplanan MII oosit sayıları	617	643	P > 0.05
Siklus başına ortalama MII sayıları	12,3 ± 1,6	12,8 ± 2,2	P > 0.05

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

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu uygulamasında Grup 1 için günlük 75-300 IU, Grup 2 için 100-225 IU aralığında recFSH dozları seçildi. Günlük uygulanan ortalama recFSH dozu Grup 1 da 185 ± 46,2 IU, Grup 2 de 177,5 ± 37,2 IU olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Tüm indüksiyon süresince Grup 1 için toplam kullanılan recFSH dozu en az 900 IU, en fazla 3300 IU olup kullanılan ortalama

toplam recFSH dozu  $1884,5 \pm 502,3$  IU idi. Grup 2 için bu doz en az 900 IU en fazla 2925 IU idi. Ortalama toplam recFSH dozu ise  $1859,5 \pm 434,5$  IU olup her iki grup arasında anlamlı fark yoktu.

Her iki grup için kullanılan recFSH dozlarına ek olarak hastalara 75-150 IU aralığında HMG dozları seçildi. Günlük uygulanan ortalama HMG dozu Grup 1’de  $78 \pm 14,8$  IU, Grup 2’ de  $84 \pm 24,6$  IU olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tüm indüksiyon süresince toplam kullanılan HMG doz aralığı Grup 1 için 675-1500 IU, Grup 2 için 675 -1650 IU idi. Ortalama toplam HMG dozları sırasıyla Grup 1’de  $813 \pm 127,9$  IU, Grup 2 ‘de  $877,5 \pm 255,9$  IU olarak hesaplandı ve aralarında anlamlı fark yoktu.

Çalışmada hastalar için seçilen toplam recFSH ve /veya HMG doz aralığı Grup 1 için 1800-4125 IU, Grup 2 için 2025-3900 IU olarak hesaplandı. Toplam ortalama kullanılan dozlar ise sırasıyla Grup 1 ve 2 için  $2697,5 \pm 539,3$  IU ve  $2737 \pm 435,6$  IU idi. Her iki grupta kullanılan toplam gonadotropin dozları açısından anlamlı fark bulunamadı.

Grup 1’de hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri en düşük 1300 pg/ ml, en yüksek 3200 pg/ ml idi. Grup 2 için en düşük serum  $E_2$  değeri 1500 pg/ml, en yüksek serum  $E_2$  değeri 3000 pg/ ml olarak tespit edildi. Her iki grubun ortalama serum  $E_2$  değerleri sırasıyla Grup 1 ve Grup 2 için  $2166 \pm 425,5$  pg/ ml,  $2210 \pm 369,3$  pg/ ml olarak bulundu. hCG günü ölçülen serum  $E_2$  değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı.

Folikül aspirasyonu günü transvajinal ultrasonografi yardımıyla işlem başlamadan önce endometrium kalınlıkları Grup 1 için 7,3-14 mm aralığında, Grup 2 için 6,7-14,6 mm aralığında ölçüldü. Ortalama değerler Grup 1 ve Grup 2 için sırasıyla  $10,5 \pm 1,7$  mm,  $10,7 \pm 1,7$  mm olup her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilememiştir.

Grup 1’de toplanan oositler içinde metafaz II (M II) safhasındaki oosit sayısı toplam 617, siklus başına ortalama  $12,3 \pm 1,6$ , Grup 2’de M II oosit sayısı toplam 643, siklus başına  $12,8 \pm 2,2$  olarak hesaplandı. Her iki grup arasında elde edilen M II oosit sayıları açısından anlamlı fark yoktu ( $P>0.05$ ).

Tablo 9: Kontrol ve Çalışma Gruplarının ICSI işlemi sonrası Parametreleri

ÖZELLİKLER	KONTROL GRUBU (Grup 1) (%) veya ort.±SD n=50	ÇALIŞMA GRUBU (Grup 2) (%) veya ort.±SD n=50	İSTATİSTİKSEL DEĞERİ (p)
Fertilizasyon oranı (%)	% 44.37	% 56.63	<b>P= 0.030</b>
Klivaj oranı (%)	% 41.4	% 59.6	<b>P=0.001</b>
Transfere uygun kalitedeki toplam embriyo sayıları (n)	206	217	P > 0.05
2. gün transfer edilen embriyo sayıları (n)	32 (% 64)	31 (% 62)	P > 0.05
3. gün transfer edilen embriyo sayıları (n)	18 (% 36)	19 (% 38)	P > 0.05
Ortalama transfer edilen embriyo sayıları (n)	2,9 ±0,3	2,8 ± 0,5	P > 0.05
İmplantasyon oranı (%)	% 33	% 34	P > 0.05
Klinik gebelik oranı (%)	17 (% 34)	22 (%44 )	P > 0.05

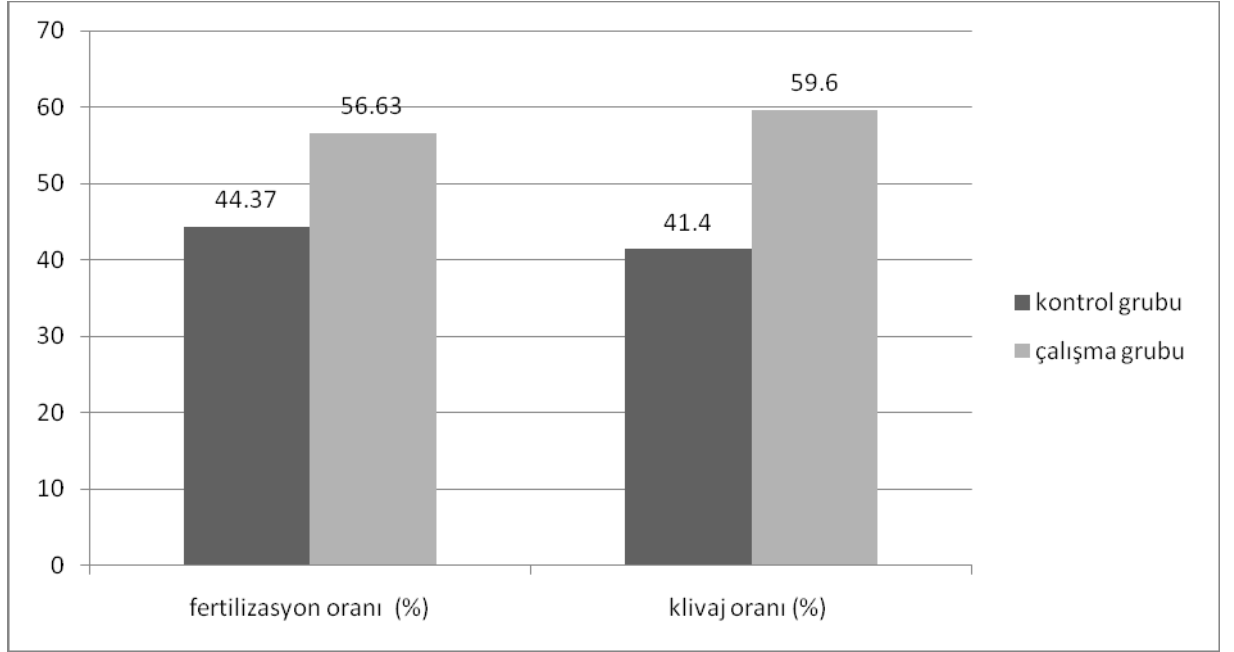
(Ortalamalar için eşitlik testi, bağımsız örnekler için T testi ,p değeri > 0.05 istatistiksel anlamsız, p değeri < 0.05 istatistiksel anlamlı )

Fertilizasyon oranları ( 18-21. saatlerde tespit edilen ) karşılaştırıldığında, her iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edildi (p =0.030). Ortalama değer Grup 1’de % 44.37, Grup 2’de % 56.63 olarak hesaplandı. Fertilizasyon oranı Grup 2’de, Grup 1’e göre daha yüksek idi (grafik1).

Klivaj oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (p =0.001). Grup 1 için klivaj oranı % 41.4, Grup 2 için klivaj oranı % 59.6 olarak hesaplandı. Klivaj oranı Grup 2’de, Grup 1’e göre daha yüksek idi (grafik 1).

ICSI işlemi yapılan ve fertilize olan embriyolar transfer günü değerlendirildiğinde transfere uygun kalitede gelişen embriyo sayıları Grup 1’de toplam 206 adet, Grup 2’de 217 adet idi. Her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

Grafik 1: Fertilizasyon ve Klivaj oranlarının karşılaştırılması

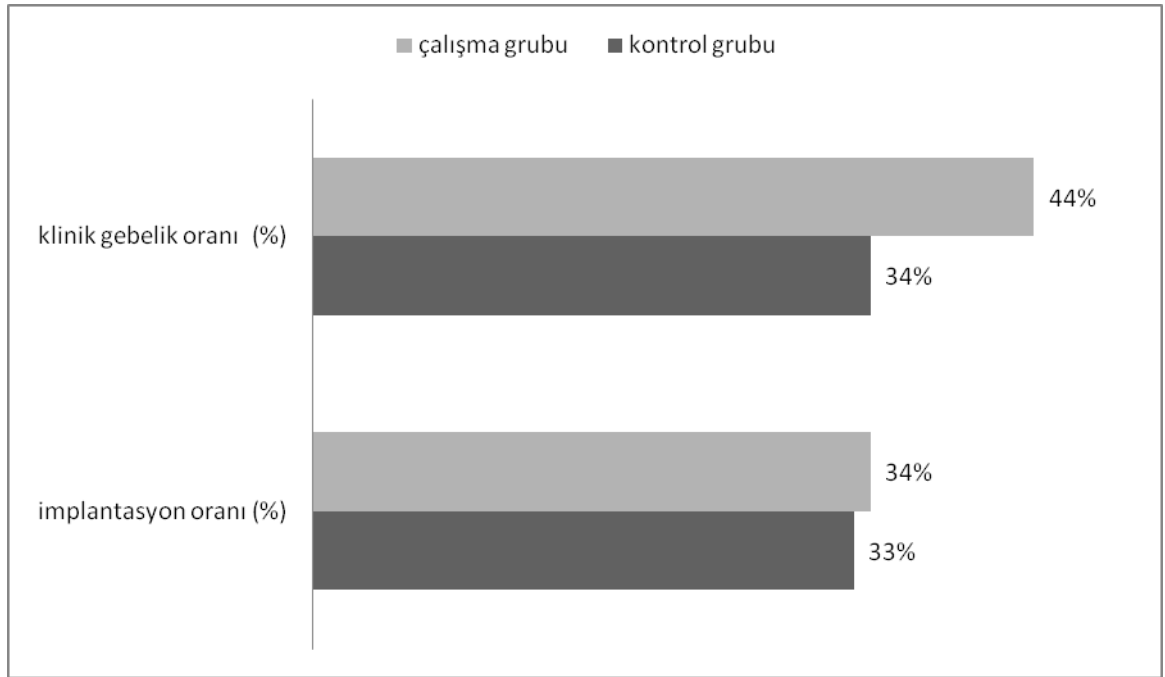


Embriyolar ICSI işleminden sonraki 2.veya 3. gün de transfer edildi. Grup 1’de 32 (% 64), Grup 2’de 31 (% 62) hastanın 2. gün embriyo transfer işlemi yapıldı. Grup 1’de 18 (% 36), Grup 2’de 19 (% 38) hastanın 3.gün embriyo transfer işlemi yapıldı. Her iki grup arasında, embriyo transfer günleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edilemedi ( $p>0.05$ ).

Gelişen embriyolar arasından en iyi kalitedekiler seçilerek yapılan embriyo transferlerinde, toplam transfer edilen embriyo sayıları açısından her iki grup arasında anlamlı fark yok idi ( $p > 0.05$ ). Grup 1 için; 47 hastaya 3 adet, 2 hastaya 2 adet, 1 hastaya 1 adet embriyo transfer edildi. Grup 2 için; 43 hastaya 3 adet, 4 hastaya 2 adet, 3 hastaya 1 adet embriyo transfer edildi.

Ortalama transfer edilen embriyo sayıları ise Grup 1 için  $2,9 \pm 0,3$ , Grup 2 için  $2,8 \pm 0,5$  olarak hesaplanmıştır, iki grup arasında ortalama transfer edilen embriyolar açısından anlamlı fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ )

Grafik 2 : İmplantasyon ve Klinik gebelik oranları



Grup 1 'de gebelik sonuçları pozitif olan hastalara transfer edilmiş toplam 63 embriyonun 21' i implante oldu. İmplantasyon oranı % 33 idi. Grup 2 de ise transfer edilen 75 embriyonun 26 'sı implante oldu, implantasyon oranı % 34 idi. Her iki grup arasında istatistiksel olarak fark olmamasına ( $p > 0.05$ ) rağmen literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında bu oran klinik olarak anlamlı farklı değerlendirilmiştir (grafik 2).

Grup 1'de 17 hastada gebelik oluşup % 34 oranı tespit edilirken Grup 2'de 22 hastada gebelik oluşup oran % 44 olarak bulundu. Her iki grup arasında gebelik oranları açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ). Ancak Grup 2'deki % 44 gebelik oranı klinik olarak anlamlı olarak değerlendirildi (grafik 2).

## TARTIŞMA

IVF de kokültür kullanımının geçmişte zaman zaman uygulandığı bilinmektedir (199). Embriyo gelişimini desteklemek amacıyla fallop tüpü, endometrium veya kumulus hücreleri kültür mediumunun üzerinde tek tabaka halinde (monolayer) kullanılmıştır (200, 201). Besleyici ya da yardımcı bu hücrelerin kültür mediumundaki toksinleri uzaklaştırarak ve büyüme faktörlerini salgılayarak (IGF I-II ,VEGF, TGF  $\alpha$  ve  $\beta$ , PAF, EGF) embriyo gelişimini uyardığı bilinmektedir (202). Besleyici bu hücrelerin medium içerisindeki glukozu metabolize ederek embriyonun ortamda daha tolere edilebilir glukoz düzeyine maruz kalmasını sağladığı düşünülmektedir (203).

Bizim çalışmamızda, folikül aspirasyonu ile elde edilen kumulus hücreleri alışlageldiği gibi tek tabaka halinde kültür ortamı olarak kullanılmamıştır. Hücrelerin kullanımında modifikasyon yapılarak bu hücreler doğal ilişkileri bozulmadan, folikül aspirasyonu ile elde edildiği kompleks halinde ko-kültür ortamını oluşturmak üzere kültür dishine yerleştirilmiştir. Sonuçta bu hücrelerin gelişmesi ve genişlemesiyle üç boyutlu olarak nitelendirebileceğimiz embriyoyu saran bir ko-kültür ortamı elde edilmiştir.

Literatürde az sayıdaki benzer çalışmalar, kumulus hücrelerinin ko-kültür ortamı olarak kullanılması sonucunda daha hızlı fertilizasyon ve klivaj oranları, az fragmentasyon ve daha iyi implantasyon oranları bildirmişlerdir (204, 205, 206, 207). Bizim çalışmamızın sonucunda fertilizasyon oranları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ( $p = 0.030$ ). Ortalama değer Grup 1'de % 44.37 , Grup 2'de % 56.63 olarak hesaplanmıştır. Klivaj oranları karşılaştırıldığında da her iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ( $p = 0.001$ ). Ortalama değer Grup 1'de % 41.4 iken Grup 2'de % 59.6 olarak tespit edilmiştir.

Parik ve ark . yaptığı kokültür kombinasyonu ve otolog kumulus hücreleri yardımcı embriyo transferi çalışmasında implantasyon oranlarında ( $p < .001$ ) ve gebelik oranlarında ( $P < .01$ ) önemli artış olduğu bildirilmiştir (208). Çalışma grubundaki 267 vakaya kumulus kokültürü ve kumulus yardımcı embriyo transferi uygulanmış, % 47.6 gebelik oranı ve % 25.6 implantasyon oranı yayınlanmıştır. 250 vakalık kumulus kokültürü yapılan ancak kumulus yardımcı embriyo transferi yapılmayan kontrol grubunda ise gebelik ve implantasyon oranları sırasıyla % 34 ve % 14.5 olarak bildirilmiştir. Kumulus hücrelerinin embriyonik



gelişimi desteklemesinin yanında embriyonun uterusu adezyonundaki doğal mekanizmayı da iyileştirerek implantasyon ve gebelik oranlarında fark yarattığı düşünülmektedir.

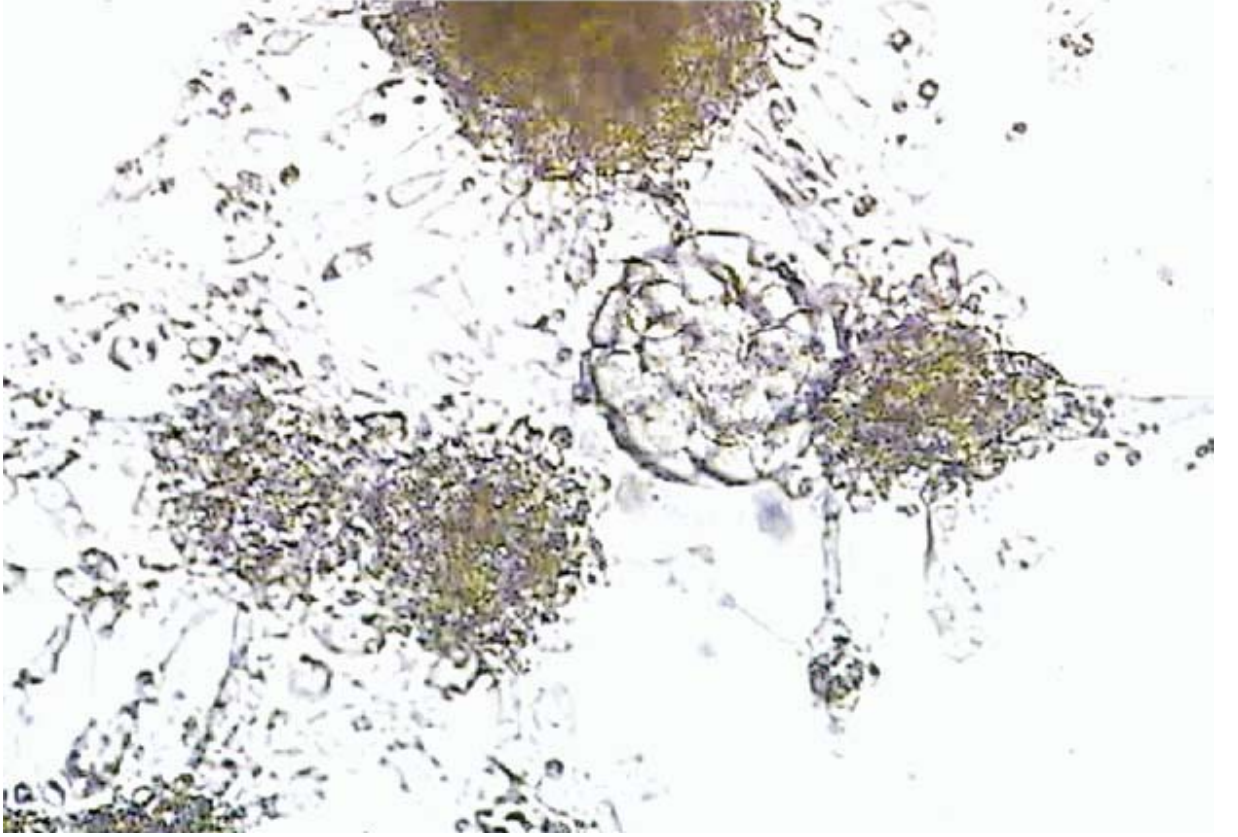
Embriyo gelişimi için kumulus kokültürünün kullanıldığı, çalışma grubunda kumulus yardımcı embriyo transferi yapılan Parikh ve ark. çalışmasının bizim çalışmamıza benzer yanları vardır ancak gruplardaki hasta sayıları açısından (Grup 1 n=267, Grup 2 n= 250) farklı bir çalışmadır. Literatürde dizaynı benzer bir çalışma bulunamadığı için çalışmamızın sonuçları bu çalışma ile karşılaştırılacaktır.

Bahsedilen çalışmada, her iki grupta embriyo gelişimini desteklemek için kumulus ko-kültürü kullanılmış fertilizasyon ve klivaj oranları Grup 1’de % 73.1 ve % 100 ve Grup 2’de sırasıyla % 71.8 ve % 100 olarak benzer tespit edildiği yayınlanmıştır. Her iki grup arasında fark bulunmamıştır. Bu oranlar oldukça yüksek olup yapılan kumulus ko-kültürünün fertilizasyon ve klivaj hızlarını arttırdığını açıkça göstermektedir. Her iki grupta n=50 hasta takip ettiğimiz çalışmamızla (fertilizasyon ve klivaj oranı sırasıyla; % 56.63, % 59.6) karşılaştırıldığında yayınlanmış sonuçlar yüksek değerlerdir. Çalışmamızdaki hasta sayısının artırılması halinde benzer sonuçlara ulaşılacağı görüşündeyiz.

Yaptığımız araştırmada da COC ile ko-kültür yapılan çalışma grubunun (Grup 2) fertilizasyon ve klivaj hızları sırasıyla % 56.63, % 59.6) ko-kültür yapılmayan kontrol grubunda ise sırasıyla % 44.37, % 41.4 olarak bulunmuş, Parik ve ark. yaptığı çalışmadaki gibi ko-kültür yapılan grup yönünde oranlar daha yüksek çıkmıştır. Fertilizasyon ve klivaj oranlarının yükselmesi, embriyoların kumulus hücreleri varlığında bölünme hızlarının artmasının nedeni olarak kumulus hücrelerinin in vivo ortamda olduğu gibi yardımcı-besleyici hücre görevine devam ettiği sonucunu desteklemektedir (208).

Yapılan çalışmalar da, folikül aspirasyonu yöntemiyle elde edilen kumulus hücrelerinin IL-6, IGF I-II, VEGF üretimleri in vivo ortamda immunassay yöntemi ile test edilmiş, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kültürdeki kumulus hücrelerinin apoptozisinin başladığı 10. güne dek tespit edilebildiği bildirilmiştir. Kültürde çoğalmaya devam eden kumulus hücreleri üzerinde yapılan elektron mikroskop çalışmaları ile artmış mitokondrial aktivite, hücrenin sitoplazmik vakuelleri ve gap junctionlarının varlığı gösterilmiştir. Tüm bu gözlemler artmış hücresel aktivite sonucudur. Bu çalışmalar bize kumulus hücreleri arası bağlantıları daha iyi anlama olanağı tanımıştır. Hücre-hücre adezyonunu sağlayan, esansiyel besleyici maddelerin embriyoya transferini kolaylaştıran ve uterin implantasyon için çekici bir yüzey oluşturan bağlantılar gözlenmiştir (208). Yapılan çalışmalarda kumulus kokültürünün

fertilizasyon ve klivaj oranlarına olumlu etkisinin mekanizması, hücreler arası iletişimin devam etmesi olarak yorumlanmaktadır (şekil 2).



Şekil 2 : Petri kabında gelişiminin 3. günündeki embriyonun genişlemiş ve yayılmış kumulus hücreleri ile sımsıkı sarılması ve embriyo ile dentritik iletişimi (Parikh et.al ; Cumulus-aided embryo transfer. Fertil Steril 2006 )

Parikh ve ark. yaptığı çalışmanın devamında Grup 2' de kumulus ko-kültürü yapılan embriyolar geliştirilmiş ancak uterin kaviteye kumulus yardımcı embriyo transferi yapılmamış, Grup 1' de hem kumulus ko-kültürü yapılarak embriyolar geliştirilmiş hem de kumulus yardımcı embriyo transferi uygulanmış. Aynı çalışmanın Grup 1 ve Grup 2 için sırasıyla implantasyon oranları (% 25.6 ya % 14.5,  $p < .001$ ) ve gebelik oranları (% 47.6 ya %34,  $p < .01$ ) olarak yayınlanmıştır. Bizim çalışmamızda kumulus hücreleriyle birlikte transfer ettiğimiz embriyoları içeren Grup 2 için implantasyon ve gebelik oranlarımız sırasıyla % 34 ve % 44 olarak tespit edilmiştir.

Her iki çalışmanın klinik gebelik oranları benzer sonuçlanmıştır (% 47.6 ya % 44). İki çalışma değerlendirildiğinde bizim çalışmamızda implantasyon oranının daha yüksek olmasının (% 25.6 ya % 34) nedeni kullanılan kumulus ko-kültürü tekniğinden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Parik ve ark., çalışmalarında elde ettikleri kumulus hücrelerini hyaluronidaz enzimi ile oositlerden ayırmışlar, sonrasında çeşitli medium

destekleriyle geliştirilerek pronukleer safhadaki embriyolar ile birleştirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise COC'lar ayrıştırılmadan doğal haliyle, ek kimyasal etkiye maruz bırakılmadan kültür ortamında ICSI işleminden hemen sonra embriyoların gelişimleri için kullanılmış, üç boyutlu büyüdükleri izlenmiş ve bu şekilde embriyolar ile birlikte uterin kaviteye transfer edilmişlerdir.

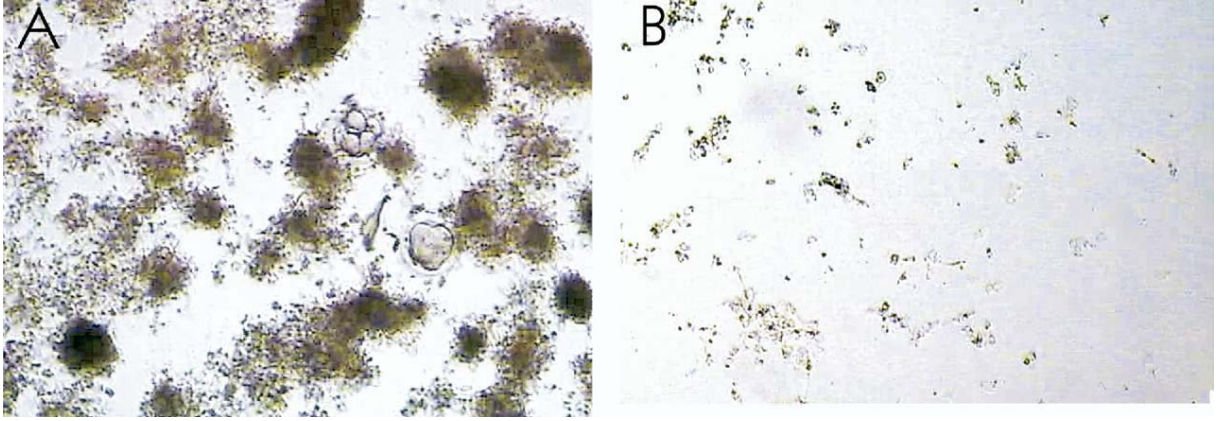
Kumulus hücrelerinden salgılanan IGF I ve II (209, 210), IL-1, IL-6, VEGF'nin embriyo morfolojisini iyileştirdiği ve implantasyon aşamasında olumlu rol oynadığı görüşünde olan çalışmalar vardır (211, 212, 213, 214). Çalışmamızda embriyolar ile birleştirilen kumulus hücrelerinin fertilizasyon ve klivaj oranlarında artış olmuştur. Fertilizasyon yeteneği ve klivaj döngüsü için gerekli enerjiyi, kumulus hücrelerinden salgılanan bu maddeler ve hücreler arası iletişimle uygun ortamı yaratarak başardıkları düşüncesindeyiz.

Aynı zamanda 2-3. gün 4-6-8'li blastomerlere sahip embriyoların kumulus hücreleri eşliğinde sanki palto giymiş gibi uterin kaviteye bırakılmalarının, uterin kavite içerisinde 6-8. günde implante olma yeteneği olan blastokist oluşana dek bölünerek çoğaldığı günlerde, bu hücreler sayesinde desteklendiği, korunduğu, biyolojik aktif hücre kompleksinin endometriumun epitel hücreleri ile sinyalizasyonu sağladığı görüşündeyiz. Çalışmamızda her iki grup arasında implantasyon oranları açısından anlamlı fark oluşmasa da (Grup 1 için % 33, Grup 2 için % 34), literatürde geniş hasta katılımıyla yapılan Parik ve ark. yaptığı çalışmada kumulus hücreleri eşliğinde embriyo transferi yapılan grubun (Grup 1) kumulus hücreleri eşliği olmadan embriyo transferi yapılan gruba (Grup 2) göre anlamlı oranda yüksek implantasyon oranlarına sahip olduğu yayınlanmıştır ( Grup 1 % 25.6 ; Grup 2 % 14.5 ) (110).

İmplantasyon oranlarının artırılma çabası, embriyo ve uterus arasındaki hassas temasın daha iyi sağlanması için 'yapıştırıcı -glue' araştırmalarını da günümüzde çoğaltmıştır (215). Biz çalışmamızda, embriyoların kumulus hücreleri ile kokültür yapılmasının, uterin kaviteye birlikte transfer edilmesinin, büyüme faktörlerini sunan bir kaynağın kullanılması, embriyonun endometrial pinopodlara yapışmasını kolaylaştırması açısından faydalı olduğu ve 'embriyo glue' etkisi gösterdiği kanısındayız.

Kumulus hücreleri ile ko-kültür yapılan çalışmalar da, petri dishinde kumulus hücrelerinin, embriyoya yakın kolonizasyon oluşturarak çoğaldıkları, embriyoya uzak yerlerin ise kumulus hücrelerinden yoksun kaldıkları görülmüştür. Bu durum embriyodan salgılanan sitokinlere yanıt olarak kumulus hücrelerinin embriyoyu çevrelemesi ve embriyo-kumulus hücreleri arasındaki iletişim olarak değerlendirilmiştir. Zaman zaman kumulus hücrelerinin

embriyoyu tüm kenarlardan çepeçevre sardığı ve kokültürün 3-5. günlerinde kumulus hücrelerinin embriyonun altında ve üzerinde büyümeye devam ettiği görülmüştür (şekil 3), (208). Benzer şekilde kumulus hücrelerinin embriyoları sardığı ve kültür dishinde her yöne çoğalarak embriyoyu çevrelediği bizim çalışmamızda da gözlemlenmiştir.



Şekil 3 : A; petri kabında kumulus hücrelerinin embriyoya yakın yerleşimi , B;aynı petri kabında embriyoya uzak bölgedeki hücrelerin azalması (Parikh et.al ; Cumulus-aided embryo transfer. Fertil Steril 2006 )

Kumulus hücreleri, kokültür sistemi içinde besleyici tabaka olarak kullanılmışlardır. Çalışmalarla çeşitli embriyonik hücre gelişim modülatörleri tespit edilmiştir. Kumulus kokültürü ve kumulus yardımcı embriyo transfer tekniğinin kullanımı mantıklı bir şekilde daha iyi kalitede embriyo elde etmek ve implantasyonu iyileştirmek, kumulus hücresinin salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinlerden faydalanmak amacı taşımaktadır. Kumulus hücrelerini embriyolar ile birlikte uterusu transfer etmek birçok hayvan türünde olduğu gibi fiziyojiye yakın görülmektedir. Özellikle kedilerde, embriyo bölünmesinin çevresini saran kumulus hücreleri birlikteliğinde olduğu bilinmektedir.

Memeli kumulus hücreleri oosit büyümesi ve maturasyonu sürecinde önemli rol alır. Ovarian folikül içinde ve ovulasyon zamanında kumulus hücrelerinin oositi beslediği bilinmektedir (216). Kumulus hücresi ile oosit arasındaki yakın ilişkinin varlığı kumulus hücresinin projeksiyonları ve iç bağlantıların dinamik teması şeklinde olduğu düşünülmektedir. Oosit maturasyonundan sonra oosit ile bağlantılar kesilmesine rağmen kumulus hücreleri arası ilişkiler sabit kalır (217).

Yapılan çeşitli çalışmalarda preimplantasyon ve periimplantasyon dönemi embriyolarda, fallop tüplerinde, endometriumda sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri tespit edilmiştir (218, 219, 220, 221). Embriyo gelişiminde, endometriumun implantasyon dönemine hazırlanmasındaki rolleri böylece daha iyi gösterilmiştir (222, 223).

Embriyo implantasyonunda ve embriyo gelişiminde büyüme faktörlerinden olan VEGF (vasküler endotelial growth faktör)' nin rolü araştırılmıştır. VEGF ve reseptörleri, insan endometriumu (224), plasenta (225), fallop tüpleri, overler (226) gibi birçok üreme dokusunda bulunmuştur. Son zamanlarda VEGF mesenger RNA (mRNA) proteini, luteal faz döneminde maksimum olmak üzere, menstrüel siklus boyunca insan endometriumunda tespit edilmiştir. VEGF proteinini üreten genler glandular epitel hücrelerinde lokalize olarak bulunmaktadır.

Endometriumun aylık değişiminde ve implantasyon sürecinde bir diğer büyüme faktörü olan IGF (insulin-like growth faktör) sistemi kilit rol almaktadır (227). Hem insanlarda hem de bazı hayvan türlerinde IGF lerin maternal-fetal yüzeyde bulunduğu gösterilmiştir. Bunun dışında fetal büyümenin insanlarda IGF ye bağımlı oluşu ile ilgili kanıtlar mevcuttur (228). Parikh ve ark. yaptıkları çalışmada, kumulus hücre kültüründe özellikle embriyonun klivaj hızının arttığı 2-3. günler arasında ELİSA yöntemiyle ölçülen IGF-I düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada embriyoların blastokist aşamasına ilelediği, implantasyona hazırlandığı 5-6. günlerde VEGF ve IL-6 düzeylerinin diğer günlere göre oldukça farklı değerlere ulaştığı gösterilmiştir. VEGF için 7-8. günlerde de salgılarda daha da artış bulunmuştur. Bu da kumulus hücrelerinin implantasyon ile bağlantılı olan bu sitokinleri değişik zamanlarda salgıladığını, uterus embriyo adezyonu için gerekli sitokin ve büyüme faktörlerini salgılayarak implantasyon sürecine yardımcı olduğunu düşündürmektedir.

Huang ve ark, çalışmalarında implantasyon sürecinde embriyo ile maternal dokuların iletişimde (229), embriyonun uterus yüzeyine yaklaşmasında, apozisyon olarak bilinen süreçte, IL sisteminin (IL-I $\alpha$ , IL-I $\beta$ , IL-I reseptor antagonisti ) önemli rollerini belirtmişlerdir (229, 230). IL-I  $\beta$  'nın endometrium ve embriyo arasındaki sinyal sistemi olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak araştırmalar, IL-6 'nında implantasyondaki rolüne ışık tutmuştur (231). Kumulus hücrelerinin IL-6 salgıladığı bilinmektedir. İntrauterin kaviteye kumulus hücreleri ile embriyoların birlikte transfer edilmesi halinde, kumulus hücre

salgılarının endometrium –embriyo arasındaki haberleşme sistemine katkıda bulunduğu, sinyalizasyonu arttırdığı bu sayede implantasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

Normal olarak insanlarda ampulladan uterin kaviteye doğru ilerleyen zigot 2, 4, 8, ve 16 hücreye (blastomer) bölünür. Klivaj fertilizasyonu takip eden ilk 12 saatte başlar ve her 12 saatte bir tekrarlanır. Morula adını alan 16 hücreli kitle fertilizasyonu takip eden 4. günde uterin kaviteye ulaşır. Bu kitle içinde bir kavite oluşmaya başlar, blastokist halini alır. Bu kaviter yapıdaki hücre gruplarının iç bölgesinden embriyoner dokular (inner cell mass), dış bölgesinden uterin duvara invazyon gösterecek trofoblastlar gelişir. Blastokist uterin kavitede 3-4 gün boşlukta kalabilir. Embriyonun implantasyonu blastokist aşamasında gerçekleşir (232). Yaklaşık 6. günde embriyoblastın (inner cell mass) bulunduğu kutupta üzerini örten trofoblastlar salgıladıkları proteolitik enzimler sayesinde sekretuar fazdaki endometriumun yüzeyel tabakası olan kompakt tabakanın epitelyum hücrelerini penetre etmeye başlar. Yaklaşık 8. günde blastokist endometrial stroma içerisinde kısmen gömülüdür. Bu aşamada embriyoblast üzerindeki alanda trofoblastlar içteki tek nükleuslu sitotrofoblastlar ve dıştaki çok nükleuslu sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki tabakaya farklılaşırlar ve endometrium içerisinde daha derine yerleşirler (233).

Embriyonun invivo 7.-8. günlerde endometriumu penetre ettiği düşünülürse, 2. veya 3. gün uterin kaviteye transfer edilen embriyoların 7.-8. günlere ulaşır, blastokist aşamasına gelerek invazyonu sağlaması için desteğe ne denli ihtiyacı olduğu açıktır. Kokültür ortamı olarak otolog COC kullanımının embriyoların gelişimini çeşitli sinyalizasyon sistemleriyle ilerlettiği, kumulus hücrelerinin kültür ortamlarında yapılan çalışmalarda bilgilere göre 9-10 gün canlı kalabildiği bilinmektedir. Bu nedenle kumulus hücrelerinin uterin kaviteye embriyolar ile birlikte transfer edilmelerinin, blastokist aşamasına dek hem embriyolara doğal ortam sağlaması hem de enerji desteğinin devam etmesi, toksik maddelerin uzaklaştırılması, ortamdaki oksidatif stresin temizlenmesi yönünde faydalı olduğunu düşünmekteyiz.

IVF için başarısız siklulardan kaçınmak ve çoğul gebelikleri önlemek için transfer edilecek embriyo sayısını sınırlandırılması, kalitesi yüksek embriyoların in vitro şartlarda uzun dönem takibi ile blastokist aşamasına getirilerek uterin kaviteye verilmesi günümüzde önem kazanmaktadır. Blastokist aşamasındaki embriyoların transferinin implantasyon oranlarını arttırdığı ve transfer edilecek embriyo sayısını azalttığı bilinmektedir. Ancak blastokist aşamasına dek embriyonun biyolojik ihtiyaçlarının desteklenmesinin zorluğu bu

faydalı yaklaşımın kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Geliştirilen kokültür sistemleri ve perfüzyon sistemleri blastokist elde edilmesi yönünde başarılı olamamıştır, embriyonun geliştiği farklı dönemlerin ihtiyaçlarına yönelik maddelerin sağlanması için ardışık mediumların kullanılması embriyo gelişimlerini biraz daha arttırmıştır ancak maliyetleride beraberinde yükseltmiştir.

Çalışmamızda kumulus ko-kültürü ile geliştirilen embriyolar 2-3. günde uterin kaviteye transfer edilmişlerdir. Literatürde kumulus kokültürünün embriyoları blastokist aşamasına ulaştırabileceğine ait çalışmalar vardır. Fabbri ve ark. yaptığı bir çalışmada (168), insan otolog kumulus hücreleri ile oluşturulan kokültür sisteminin blastokist aşamasına kadar embriyo gelişimini desteklediği gösterilmiştir. Blastokist gelişim oranları karşılaştırıldığında, blastokist gelişiminin klasik medium kullanımı ile % 7, kumulus hücre kokültür kullanımı ile % 50 oranında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz % 44 oranındaki gebelik başarısının, kumulus kokültürü ile oluşturulan balstokistlerin transferi sayesinde daha da yükselebileceğini düşünmekteyiz.

In vitro oosit maturasyonu yöntemi, PCOS hastalarda gonadotropin induksiyonu sonrasında hiperstimulasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiştir. 2-10 mm'lik antral foliküllerden germinal vezikül evresinde oositler (immatür oosit) elde edilerek matürasyon mediumlarında geliştirilirler. Matür oosit evresinde ICSI işlemi yapılarak embriyo transferi yapılmaktadır. Goud ve ark. in vitro maturasyon için, kumulus hücresi ile etkileşim halinde kültürde bekletilen oositlerin nükleer maturasyonunun, kumulus hücrelerinden temizlenenlere göre daha yüksek oranda geliştiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada klivaj oranlarının kumulus ilişkili oositlerde arttığı, sitoplazmik maturasyonunun daha iyi olduğu gözlenmiştir (170). Bu çalışma kumulus kokültürünün oositlerin in vitro maturasyon işlemi için kullanılabilmesini düşündürmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak; ICSI-ET sikluslarında geliştirilen embriyoların kalitesini, implantasyon ve gebelik oranlarını arttırmaya yönelik planlanan bu çalışmada otolog kumulus hücre- oosit kompleksinin ko-kültür ortamı olarak kullanılmasının ICSI sonrası fertilizasyon hızlarını ve embriyo bölünme hızlarını in vitro ortamdaki değerler açısından arttırdığı bulunmuştur. Bu sonuç literatürdeki ko-kültür çalışmaları ile desteklenmektedir. Otolog kumulus hücre-oosit kompleksi kullanımı hem elde edilmesi kolay hem de otolog olmaları nedeniyle oluşan embriyolar için doğal hücrelerdir. COC'un, ko-kültür ortamı olarak gelecekte daha sık kullanılacağını düşünmekteyiz.

Özellikle kumulus hücrelerinin kültür ortamlarında uzun süre canlı kalabilmeleri (yaklaşık 10 gün ) nedeniyle, blastokist gelişiminde yeterli desteği çoğu zaman sağlayamayan mediumların aksine doğal kültür ortamı sağlayarak blastokist gelişim aşamalarına destek olabileceklerini düşünmekteyiz. Çoğul gebeliklerin önlenmesi amacıyla yasal olarak bazı ülkelerde transfer edilecek embriyo sayılarının kısıtlandığı durumlarda implantasyon kabiliyeti kazanmış blastokist aşamasındaki az sayıda embriyonun transferi tercih edilecektir. Bu nedenle blastokist gelişimini laboratuvar ortamlarında doğal hücreler ile gerçekleştirmek için kumulus hücre ko-kültürü kullanımının avantajlı alternatif bir seçenek olacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamız, ko-kültür ortamı hazırlama yöntemine yeni bir bakış getirmiştir. Literatürdeki çalışmalardan ko-kültürlerin, tek tabaka halinde (monolayer) hücrelerin yayılarak kullanıldığını bilmekteyiz. Biz bu çalışmada teknikte modifikasyon oluşturarak ko-kültür ortamı yaratmak için ek maliyet ve ek iş gücü gerektirmeden kumulus hücrelerini doğal haliyle kültür ortamında kullandık. Kumulus hücreleri ve oosit enzimatik herhangi bir yolla ayrıştırılmadı. Bu yeni teknik sayesinde kültür ortamında COC'un üç boyutlu genişlemesine devam ettiğini gözlemledik. Daha önce böyle bir tekniğin kullanılmamış olması açısından literatür bilgisi için çalışmamız bir ilk olmuştur. IVF laboratuvarları için bu tekniğin geliştirilmesiyle kumulus hücrelerinin yararlı etkisinden faydalanmak daha da kolaylaşmıştır.

İmplantasyon ve gebelik oranları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlarla karşılaşılmış, literatürde yayınlanmış benzer çalışmadaki kadar yüksek ve farklı değerler elde edilememiştir. Bu farklılık muhtemelen çalışmamızda vaka sayılarının



kısıtlı olması nedeniyledir. Çalışmamızdaki vaka sayıları sağlıklı değerlendirme yapabilmek için yeterli değildir. Aynı çalışmanın geniş vaka katılımıyla yapılması halinde implantasyon ve gebelik oranlarının anlamlı farklı olup daha gerçekçi oranlara ulaşacağını düşünmekteyiz. Ancak özellikleri birbirine son derece yakın olan iki grup arasında implantasyon oranlarının kontrol grubu % 33, çalışma grubu % 34 olarak benzer çıkmasına rağmen kontrol grubundaki % 34, çalışma grubundaki % 44 gebelik oranlarını klinik olarak anlamlı bulmaktayız. Bu farklılığın implantasyon oranına yansımamasının nedeni olarak implantasyon sürecini etkileyen farklı faktörlerin olasılığını düşünmekteyiz. Bu nedenle yapılacak geniş randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır, yapılacak bu çalışmalar ışığında ovulasyon indüksiyonu ve otolog kumulus hücre-oosit kompleksi kullanımıyla ilgili gelecekte olumlu gelişmeler olabileceğini düşünmekteyiz.

## ÖZET

**Amaç :** İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu-embriyo transferi (ICSI-ET) sikluslarında folikül aspirasyonu ile elde edilen otolog kumulus hücre-oosit komplekslerinin kültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişimine ve embriyolar eşliğinde uterin kaviteye transferinin implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç-Yöntem :** İnfertilite nedeniyle başvuran ve ICSI-ET yapılması kararlaştırılan, uzun protokol (GnRH analogu; rFSH+HMG) yöntemiyle KOH uygulanan, folikül aspirasyonu ile toplanan oosit sayıları 10 ve üzerindeki 100 hasta randomize olarak seçildi. Folikül aspirasyonu ile otolog COC 'lar elde edildi. Çalışma grubundaki 50 hastaya kültür ortamı olarak kullanıldı ve embriyolarla birlikte uterin kaviteye transferi yapıldı. Kontrol grubundaki 50 hastaya ise rutin kullanılan mediumlar ile embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulandı. İmplantasyon ve gebelik sonuçları karşılaştırıldı..

**Bulgu :** Yaş ortalaması, indüksiyon gün süresi, kullanılan toplam gonadotropin dozları, hCG günü E<sub>2</sub> değerleri, endometrium kalınlıkları, siklus başına ortalama MII sayıları, transfere uygun kalitedeki embriyo sayıları, transfer günleri ve sayıları açısından istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark yoktu. Fakat ICSI işlemi sonrasında kontrol grubunda % 44.37, çalışma grubunda % 56.63 fertilizasyon oranları, kontrol grubunda % 41.4, çalışma grubu % 59.6 klivaj oranları tespit edilerek gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptandı. Kontrol grubunda % 33, çalışma grubunda % 34 implantasyon oranları, kontrol grubunda % 34, çalışma grubunda % 44 gebelik oranları tespit edildi. Her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

**Sonuç :** Kültür ortamı olarak otolog COC kullanımı ve uterin kaviteye transferi implantasyon ve gebelik oranlarında anlamlı farklılık yaratmamıştır ancak klinik pratikte bu grubun sonuçlarının arttığı düşünülmektedir. Fertilizasyon ve klivaj oranlarında sağladığı anlamlı artış nedeniyle YÜT laboratuvarlarında doğal hücre kültürü amacıyla kullanımının embriyo gelişimi için avantaj sağlayacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler :** ICSI, kumulus hücreleri, ko-kültür, implantasyon, gebelik

## ABSTRACT

**Objective :** The purpose of this study was to evaluate the use of autologous COC co-culture for embryonic development and quality as a medium and to find out implantation and pregnancy rates after the embryo transfer with COCs in the ICSI-ET cycles.

**Study Design :** 100 infertile couples whose oocytes were retrieved 10 or more after follicle aspiration, were selected and randomly divided as control and study groups. Long GnRH analogue protocol was followed by controlled ovarian hyperstimulation with gonadotropins ( rFSH+ HMG). In the control group (n=50) the embryos underwent autologous COC coculture which was collected by follicle aspiration, and COC with embryos was transferred in to the uterine cavity. In the study group (n=50) conventional medium was used without COC co-culture. Implantation and pregnancy rates were correlated.

**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. Fertilization rates were % 44.37 in the control group and % 56.63 in the study group. Cleavage rates were % 41.4 in control group and % 59.6 in the study group. These rates were comparable also significant increase was demonstrated in study group. The implantation rates were % 33 in the control group, % 34 in the study group and pregnancy rates were % 34 in the control group, % 44 in the study group. These rates were insignificant statistically (p > 0.05).

**Conclusion (s):** Our study demonstrated that with the use of autologous COC co-culture and uterine transfer the embryos with COCs, there were no differences statistically in implantation and pregnancy rates, but we suggested that our implantation and pregnancy rates increased at the study group in clinical practice. The increased efficacy of the COC co-culture in fertilization and cleavage rates demonstrated that this kind of natural cell co-culture may play an important role in embryonic development in assisted reproductive techniques.

**Key Words:** ICSI, cumulus cells, co-culture, implantation, pregnancy

## 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 controled 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. Prevelance 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 clamymdia trachomatous. J In Vitro Fert Embryo Transfer 1985; 2:151
16. Licciardo F, Grifo JA, Rosenwaks Z, et al : Relation between antibodies to clamymdia trachomatous and spontaneus abortion following in vitro fertilization J. Assist. Reprod. Genet. 1992; 9:207
17. Pritts EA. Fibroids and Infertility: a systematic rewiev 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 follicule 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: Hysterosalpingoraphy. 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 hydrosonography and diagnostic hysteroscopy in evaluation of infertile patients. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 2004; 31:56
25. Gomel V, Taylor PJ. Diasgnostic 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. FıCıCıoğlu C, Kutlu T, Demirbařođlu 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. Esticular antimüllerian hormone : history genetics, regulation and clinical applications. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:37-41
36. Picard J.Y., Josso 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. Teixeria 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. FıCıCıoğlu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z.Early follicular antimullerian 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, Nuojuu-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, Smits 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. Donaghy 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 peritubal 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 gynecologic 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 gonadotropin therapy 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. In: Speroff L, Glass R.H, Kase N.G, eds. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999:487-522 and 1013-1132
77. Burges S and Spanish Collaborative Group on Female Hypogonadotropic Hypogonadism 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 laboratory predictors of clomiphene response, Fertil Steril 37:168, 1982
81. Clark JH, Markaverich BM, The agonistic-antagonistic properties of clomiphene: a review, Pharmacol Ther 15:467, 1982
82. Gorlitsky 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.com/info/page/prescribing](http://www.usfemara.com/info/page/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 JF, 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 DQA1\*0501. *Am J Obsict 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-dose gonadotrophin 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-Herbant 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 Metab* 1997; 83:1292-1298.
108. Cedrin-Durnerin I, Bstandig B, Herve F, et al. A comparative study of high fixed dose 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: a dose 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. Lin YC,Chang SY,Lan KC,Huang HW,Chang CY,Tsai MY,Kung FT,Huang FJ ,Human oocyte maturity in vivo determines the outcome of blastocyst development in vitro ,*J Assist Reprod Genet* 20:506;2003
158. Bavister BD.1995 Culture Preimplantation embryos: facts and artifacts.*Hum Reprod Update* .1:91-148

159. Wiemer K.E, Hoffman D.I, Maxson W.S. Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M, Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells, *Hum.Reprod.* 8 : 97 ,1993
160. Barnat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Xu K, Veeck L, Damario MA, Rosenwaks Z. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium, *Fertil Steril* 70:1109,1998
161. Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godke RA, The application of coculture in assisted reproduction : 10 years of experience with human embryos, *Hum Reprod* 13 (suppl 4 ) : 226,1998
162. Simon C, Mercader A , Garcia-Velasco J , Nikas G , Moreno C , Remohi J, Pellicer A, Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure, *J Clin Endocrinol Metab*,84:2638,1999
163. Nottola SA, Familiaria G, Micarara G, Aragona C, Motta PM: The ultrastructure of cumulus-corona cells at the time of fertilization and early embryogenesis. A scanning and transmission electron microscopic study in an in vitro fertilization program. *Arch Histol Cytol* 1991;54:145-161
164. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M, :Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells .*Hum Reprod* 1993 ;8 (1);97-101
165. Freeman MR, Witworth CM, Hill GA : Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rates following in-vitro fertilization .*Hum Reprod* 1995:10 (2):408-414
166. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, Frydman R: Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage . *Hum Reprod* 1994:9 (12)2367-2373
167. Van Blerkom J: Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells .*Hum Reprod* 1993: 8: 1525-1539
168. Fabbri R, Porcu E, Tiziana M, Primavera MR, Cecconi S, Nottola SA, Motta PM, Venturoli S, Flamigni C, Human Embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system .*Journ of Assit.Reprod Genetic* 17,1: 2000
169. Dirnfeld M,Goldman S,Gonen Y,Koifman M,Calderon I,Abramovici H:A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study .*Fertil Steril* 1997; 67(1): 120-122



170. Gaud .P.T, Goud A.P, Qiqn C, Laverge H, Van der Elst J, Sutter P.De, Dhont M, In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium, *Hum Reprod* 13: 1638-44, 1998
171. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 289–312.
172. Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB , Laurent Tc,Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 1992 ;151 (2):541-551
173. Toole BP. Hyaluronan : from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004 ;4 (7):528-539
174. Misra S, Ghatak S, Toole BP. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan,phosphoinositide 3-kinase and ErbB2 *J Biol hem* 2005 ; 280 (21): 20310-20315
175. Ghatak S , Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005 ;67 (4): 1165-1171
176. Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Saito T, Hiroi M. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil Steril* 200 ;74 (6): 1148-1152
177. Kaneko T, Saito H, Toya M, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44 *J Assist Reprod Genet* 2000 ;17(3): 162-167
178. Zhuo L, Yoneda M, Zhao M, et al. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivating of the bikunin gene in mice *J Biol Chem* 2001 ;276 (11): 7693-7696
179. Sato H, Kajikawa S, Kurado S et al . Impaired fertility in female mice lacking urinary trypsin inhibitor .*Biochem Biopsy Res Commun* 2001 ,281(5): 1154-1160
180. Varani S, Elvin JA,Yan C, et al .Knockout of pentaxrin 3,a downstream target of growth differentiation factor -9 causes female subfertility .*Mol Endocrinol* 2002 ;16(6): 1154-1167
181. Espey LL, Richards JS. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biol Reprod* 2002;67 (6):1662-1670
182. Mikuni M, Pall M, Peterson CM, et al .The selective prostoglandin endoperoxide synthase -2 inhibitor, NS-398 reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat *Biol Reprod* 1998; 59(5): 1077-1083

183. Davis BJ, Lennard DE, Lee Ca, et al .Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1-beta .*Endocrinology* 1999;140(6):2685-2695
184. Lim H , Paria BC, Das Sk, et al Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2-deficient mice *Cell* 1997;91(2):197-208
185. Downs S. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of murine oocyte and cumulus oophorus in vitro *Biol Reprod* 1989;41(2):371-379
186. Eisenbach M, Tur Kaspa I. Do human eggs attract spermatozoa ? *Bioessay* 1999 ;21 (3): 203-210
187. Tesarik J, Pilka L, Drahorad J, Cechova D, Veselsky L. The role of cumulus cell secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability :implication IVF. *Hum Reprod* 1988 ; 3(1):129-132
188. Harper JK. Gamete and zygote transport .IN:Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction* . New York : Raven Press; 1994:123-185
189. Suziki M, Kobayashi H, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T.Reproductive failure in mice lacking inter-alpha-trypsin inhibitor (iti)-iti target genes in Mouse ovary identified by microarray analysis *J Endokrinol* 2004 ;183(1):29-38
190. Wu Y, Wu J, Lee DY, et al ,Versican protects cells from oxidative stres-induced apoptosis. *Matrix Biol* 2005 ;24 (1)3-13
191. Ball G, Leibfried M, Lenz R, Ax R, Bavister B, First N. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes . *Biol Reprod* 1983; 28(3):717-725
192. Mckenzie LJ, Pangas SA, Carson SA et al. Human cumulus granulosa cell gene expression : a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF.*Hum Reprod* 2004; 19(12): 2869-2874
193. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a posible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 2005; 83(4): 1169-1179
194. Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex.*Semin Reprod Med* 2006;24:217–227.
195. Demir R. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. Palme Yayıncılık, 1995:79.
196. Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem* 1997;272:4787–479

197. Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol* 2004;276:64–73
198. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 2005;146:2798–2800
199. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, et al. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co-culture. *Fertil Steril* 1992;58:569–74.
200. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Emperaire JC. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995;63:109–14.
201. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbass AM. Co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells. *Hum Reprod* 1994;9:1727–9.
202. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:9–14.
203. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91–148.
204. Menezes YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990;42:301–6.
205. Menezes Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 1992;7(Suppl 1):101–6.
206. Ben-Chetrit A, Jurisicova A, Casper RF. Coculture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro. *Fertil Steril* 1996; 65:664–6.
207. Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995;10:408–14.
208. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA. Cumulus coculture and cumulus aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* .2006 Oct ; 86 (4):839-47

209. Echtenkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond JM. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol Reprod* 1990;43:8–14.
210. Mason HD, Willis DS, Holly JM, Franks S. Insulin preincubation enhances insulin-like growth factor-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1265–7.
211. Zolti M, Ben-Rafael Z, Meiom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, et al. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril* 1991;56:265–72.
212. Austgulen R, Arntzen KJ, Vatten LJ, Kahn J, Sunde A. Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor beta) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995;10:171–6.
213. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 1995;146:157–65.
214. Abbas MM, Evans JJ, Sin IL, Gooneratne A, Hill A, Benny PS. Vascular endothelial growth factor and leptin: regulation in human cumulus cells and in follicles. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82: 997–1003.
215. Schoolcraft W, Lane M, Stevens J, Gardner DK. Increased hyaluronan concentration in the embryo transfer medium results in a significant increase in human embryo implantation rate. *Fertil Steril* 2002;78:Abstract Book O-11.
216. Suzuki H, Jeong BS, Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000;63:723
217. Eppig JJ. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 1982;89:268–72
218. Tazuke SI, Guidice LC. Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal embryonic interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 1996;14:231–45
219. Chegini N. Oviductal-derived growth factors and cytokines: implications in preimplantation. *Semin Reprod Endocrinol* 1996;14:219–29
220. Hunter RH. Have the fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:475–86.
221. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Roles of growth factors during peri-implantation development.

222. Guidice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994;61:1–17.
223. Ghosh D, Sengupta J. Recent developments in endocrinology and paracrinology of blastocyst implantation in the primate. *Hum Reprod Update* 1998;4:153– 68.
224. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993;48:1120–8.
225. Clark DE, Smith SK, AM Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Human Reprod* 1996;11:1090–8.
- Gordon JD, Messiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996;81:353–9.
226. Giudice LN, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface. *J Reprod Immunol* 1998;39:133– 48.
227. Westwood M. Role of insulin-like growth factor binding protein 1 in human pregnancy. *Rev Reprod* 1999;4:160 –7.
228. Huang HY, Krussel JS, Wen Y, Polan ML. Use of reverse transcriptionpolymerase chain reaction to detect embryonic interleukin-1 system messenger RNA in individual preimplantation mouse embryos cocultured with veto cells. *Hum Reprod* 1997;12:1537–44.
229. Simon C, Pellicer A, Polan ML. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl2):43–54.
230. Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod* 1995;10:2793–9.
231. Carpenter SE. Implantation .In Wallach EE,Zacur H *Reproductive Medicine and Surgery* . St Lous,Mosby,1995
232. Chapman MG,Gruzinkas JG,Chard T *Implantation Biological and Clinical aspects* Berlin,Sprinter Verlag ,1998

## TEŞEKKÜR

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. kliniğindeki asistanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım; Anabilim Dalı Başkanı sayın **Prof. Dr. Mehmet Çolakoğlu**' na ve hocalarım sayın **Prof. Dr. Metin Çapar, Doç. Dr. Ali Acar, Doç. Dr. Çetin Çelik, Yrd. Doç. Dr. Kazım Gezginç, Yrd. Doç. Dr. Osman Balcı, Yrd. Doç. Dr. Suna Özdemir** 'e, tezimin hazırlanmasında, düzenlenmesinde yardımlarını esirgemeyen ve yetişmemde büyük emeği olan çok kıymetli tez hocam **Doç. Dr. Hüseyin Görkemli**' ye ,

Tez konumun ortaya çıkışı ve yapılandırılmasında değerli katkıları nedeniyle S.Ü.M.T.F. Histoloji ve Embriyoloji A.D. hocalarım sayın **Prof.Dr. Selçuk Duman** ve **Doç. Dr. Murad Aktan**'a , S.Ü.M.T.F. Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'nin sevgili çalışanlarına,

Tüm çalışma arkadaşlarıma, kliniğimiz hemşire ve hastane personeline,

Eğitim hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili anne ve babama,

Destek ve yardımlarını esirgemeyen eşime, en kıymetli varlığım biricik kızım Eylül'e,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Nalan Cihangir

Mart / 2009