



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**İN-VİTRO FERTİLİZASYON SIKLUSLARINDA GÖZLENEN
TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIKLARINDA
CD56 POZİTİF HÜCRELERİN VE CD98 DÜZEYİNİN ÖNEMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tevfik Berk BİLDACI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hulusi Bülent ZEYNELOĞLU

ANKARA – 2011

TEŞEKKÜR

Çok taze bir doktor olarak başladığım asistanlık sürecimde, başkent ailesini tercih etmiş olmama önderlik eden, cerrahi bilgi ve sonsuz deneyimlerini bu uzun ve çetrefilli süreçte bizimle paylaşan, çalışma ve yardım azmi ile sadece asistanlara değil tüm insanlığa ışık tuttuğunu düşündüğüm başta Prof. Dr. Ali Ayhan olmak üzere, tecrübesini ve kadın doğum hekimliği çizgisini bir anne gibi önümüze süren bölüm başkanımız Prof. Dr. Esra Kuşçu'ya, üreme endokrinolojisinde Türkiye'nin tanıdığı ve fikirlerine saygı duyduğu, tez hazırlama sürecimde değerli görüşlerini eksik etmeyen Prof. Dr. Hulusi Bülent Zeyneloğlu'na, maternal fetal tıp kavramını bizlere kazandıran Prof. Dr. Filiz Yanık'a, eğitimimizde emeklerini eksik etmeyen Doç. Dr. Göğşen Önalın'a ve başındaki ünvanı gelecekte de her ne olursa olsun bize güvenen, bilgi paylaşımını hep en üst seviyede tutmaya çalışan, bu işin sadece cerrahi olmadığını, bilimsel çalışmaların önemini zihnimize kazımaya çalışan abim olarak adlandıracığım Dr. Polat Dursun'a, farklı bir çalışma düzenine sahip olmamızdan ötürü dahil olduğumuz tüm merkezlerdeki uzmanlarıma, personel ve hemşire arkadaşlara, çalışma azmi ile yanıp tutuşan tüm intörn arkadaşlara, çok kıymetli ve düzenli bir iş yapan başkent üniversitesi arşiv ve patoloji personeline yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Tezimin zor zamanlarında yanımda olan ve yardımlarını eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Bülent Haydardedeoğlu'na ve insan üstü çalışarak tezi bitirmeme yardımcı olan Doç. Dr. Filiz Aka Bolat'a ayrı bir şekilde teşekkür etmeyi borç bilirim.

Asistanlık dönemi sürecinde, beni bugünlere taşıyan, sonsuz emekleri saymakla bitmeyen, hala devam eden ve hayatımın şeklini çizerken daha nice emeklerine ihtiyaç duyacağım sevgi ve desteğini kendileri ne durumda olurlarsa olsunlar hiç eksik etmeyen anneme, babama ve okyanus aşırı ülkelerden abime teşekkür ederim.

Son olarak benimle hayatı ve tüm zorlukları paylaşan, benimle yaşamayı göze alacak kadar gözü kara olan, sevgisini, desteğini, iyi zamanları ve kötü zamanlarımı paylaştığım ve asistanlığımın son günlerinde bana kendisi gibi güzel bir kız bebek hediye eden sevgili eşim Yelda'ya ve tabiki kızıma teşekkür ederim..

Dr. Tevfik Berk BİLDACI

ÖZET

Giriş

Günümüzde infertil çiftlerin çocuk istekleri önemli bir sağlık sorunu olarak kendisini göstermektedir. Çiftlerin değerlendirilmesi bir süreçtir. Bu süreçte son basamak olan ve ilk kez 1978 yılında başarılı bir şekilde uygulamaya giren in-vitro fertilizasyon insanlık ve üreme endokrinolojisi tarihinde yeni bir çağ açmıştır. İn-vitro fertilizasyon sikluslarında tek embriyo transferi ile %30-40'larda başarı yakalanmaktadır. Önde gelen hız kısıtlayıcı basamaklardan biri implantasyon başarısızlığıdır ve implantasyon başarısızlığına etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Bu çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların klinik olarak endometriyal değerlendirmesinde CD56 ve CD98 moleküler markırlarının rolü araştırılacaktır.

Materyal ve Metod

Çalışmaya Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara ve Adana Hastaneleri Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında 2004-2010 yılları arasında Tüp Bebek Merkezine başvuran tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanısı alan 21 ve kontrol grubu olarak da 15 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların implantasyon evresindeki endometriyal biyopsileri ve klinik verileri retrospektif olarak saptanmış olup, biyopsi materyalleri immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak CD56 ve CD98 ekspresyonları açısından değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

Hastaların klinik verileri karşılaştırıldığında homojen birer grup oldukları saptanmış olup bu gruplar arasında CD56 ve CD98 boyanmaları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$).

Tartışma

Önceki çalışmalarda CD56 boyanma düzeyleri ile implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıpları açısından anlamlı veriler saptanmış olup bu çalışmada da hem CD56 kullanımının hem de CD98 kullanımının klinikte faydalı sonuçlar doğurabileceği belirtilmiştir.

ABSTRACT

Introduction

Today, the children request of infertile couples is a major health problem. Evaluation of couples is a process until to the last step of assisted reproductive techniques which is called in-vitro fertilization. First IVF was succesfully used in 1978 and procedures related with technique gradually evolved in time. Today there is a success rate of 30-40% per IVF cycle with one embryo transfer. The most important speed limiting step on IVF cycles is implantation process which is affected from various different kinds of factors. In this study we aim to investigate the clinical value of immunohystochemical stainings of CD56 and CD98 between recurrent implantaion failure and the control group.

Methods

This is a retrospective study performed for patients applied to Baskent University Ankara and Adana Hospital's IVF clinics between 2004 and 2010. 21 patients were included into the recurrent implantaiton failure while 15 patients were forming the control group. Implantation phase endometrial biopsies of mentioned groups subjected to immunohystochemical staining with CD56 and CD98 and the results evaluated with their past clinical data.

Results

There is a significant differance between two homogenous groups on their staining with CD56 and CD98 ($p<0.05$).

Discussion

Previous studies with CD56 staining levels of meaningful data in terms of implantation failure and recurrent pregnancy loss was also detected in this study. The use of CD56 and CD98 in patients ongoing IVF cycles could lead us to a data that be clinically useful.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO ve ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Normal İmplantasyon	3
2.1.1. İmplantasyon Öncesi, Ovulasyon ve Fertilizasyon	3
2.1.2. İmplantasyon Evresi	3
2.1.3. Anatomik Değişiklikler	3
2.1.4. Hormonal Durum ve Diğer Proteinler	4
2.2. İmplantasyon Başarısızlığı	7
2.2.1. Anne Yaşı, Oosit ve Embriyo Kalitesi	8
2.2.2. İmmünolojik Faktörler	8
2.2.3. Uterin, Tubal ve Peritona Bağlı Faktörler	9
2.3. CD98	9
2.4. CD56 ve Uterin Naturel Killer Hücreler	10
3. MATERYAL ve METOD	13
3.1. Hasta Seçimi ve Çalışma Dizaynı	13
3.2. İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme	17
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	24
6. KAYNAKLAR	29

TABLO ve RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İmplantasyon başarısızlığında etiyolojik faktörler ve nedenleri	7
Tablo 2. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı grubu hastalarının seçimi	14
Tablo 3. Kontrol grubu hastaların seçimi	16
Tablo 4. Her iki grubun IVF parametreleri ortalamaları ve aralarındaki ilişkiler.	21
Tablo 5. CD98 boyanma miktarları, CD98 skoru ve CD56 boyanma yüzdelerinin, yüzdelik karşılıkları puanlama sistemi kullanılarak karşılaştırılması.	22
Tablo 6. CD98 boyanma miktarları, stromal boyanma varlığı ve CD56 boyanma yüzdelerinin gruplar arası farklarının karşılaştırılması	22
Tablo 7. CD56 ve CD98 boyanmalarının gruplar arasında karşılaştırılması	23
Resim 1. NK hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri	10
Resim A. İmplantasyon evresinde sekretuar evrede endometriyum	19
Resim B. Kontrol grubunda endometriyal stromada CD 56 antikoru ile kırmızı kahverengi boyanma gösteren az sayıda hücre	19
Resim C. Çalışma grubunda endometriyal stromada CD 56 antikoru ile kırmızı kahverengi boyanma gösteren yaygın hücre grupları	21
Resim D. Kontrol grubunda CD 98 antikoru endometriyal glandlarda lüminal ve membranöz kırmızı kahverengi güçlü pozitif boyanma	19
Resim E. Çalışma grubunda CD 98 antikoru endometriyal glandlarda lüminal ve membranöz kırmızı kahverengi zayıf pozitif boyanma	19

KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA : Analysis of variance

CD56 : Cluster of Determination 56

CD98 : Cluster of Determination 98

COX : Siklooksijenaz

cPLA₂ : Fosfolipaz A₂

E2 : Estradiol

FSH : Folikül stimüle edici hormon

GnRH : Gonadotropin salgılatıcı hormon

HB-EGF : Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü

HCG : Human chorionic gonadotropin

IL : İnterlökin 1

IVF : İn-vitro fertilizasyon

LH : Lüteinleştirici hormon

LIF : Lösemi inhibe edici faktör

MAG : Mouse ascites golgi

MMP : Matriks metalloproteinaz

MUC : Musin

NK : Naturel Killer Hücreler

PG : Prostoglandin

PKOS : Polikistik over sendromu

PP-14 : Gebelik proteini 14 veya glikodelin

uNK : Uterin naturel killer

1. Giriş

Doğum, yaşamın sürekliliği için temel bir evrimsel süreçtir. Yeni bir yaşamın oluşumu, ilk önce, döllenme ile sonuçlanan bir oosit ile spermin birleşmesine bağlıdır; bu tür bir birleşme sonucu ortaya çıkan zigot, birçok mitotik hücre bölünmelerine uğrar.

İmplantasyon, endokrin, parakrin, otokrin, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan, çok sayıda molekülün fonksiyon gösterdiği karmaşık bir süreçtir. Ancak, bu süreçteki moleküllerin kusursuz etkileşimlerinin detayları ve sırası henüz tam olarak tanımlanamamıştır. İnsanlarda implantasyon aşamasını, embriyo ile uterusun etkileşimlerini moleküler düzeyde incelemek oldukça güç bir iştir. İmplantasyon embriyonun blastosist aşamasında gerçekleşir. İmplantasyon aşamasında zona pellicuda blastosistten ayrılır, blastosist uterus endometriyumu ile yakın fiziksel temas kurar ve uterusla arasında fizyolojik bir bağ kurar. İmplantasyon süreci 3 aşamaya ayrılmıştır: appozisyon, adhezyon ve penetrasyon [1, 2]. Appozisyon, embriyonik trofoektoderm hücrelerinin uterus yüzey epiteline yönelmesinin oluşturduğu bir durumdur. Hatching sürecini takiben ortaya çıkmaya başlar. Appozisyon, adhezyon aşaması ile devam eder. Adhezyon, yüzey epitelinin ve trofoektodermin temas ederek integrinler aracılığı ile bağlantı kurduğu aşamadır. Penetrasyon aşamasında ise, yüzey epiteli trofoektoderm tarafından invazyona uğrar ve embriyo uterus endometriyumu içerisine gömülmeye başlar. Bu over steroidleri bağımlı fenomen sadece implantasyon penceresi olarak adlandırılan ve kendini sınırlayan, endometrial reseptivitenin belirgin olduğu siklusun 20 - 24. günleri arasında gerçekleşmektedir.

İnsanların üremesinde ve IVF (İn-vitro Fertilizasyon) sikluslarında yeterli implantasyon, sınırlayıcı bir faktör olmaktadır. Yardımcı üreme tekniklerindeki majör gelişmelere rağmen taze embriyo transferi sikluslarında klinik gebelik elde etme oranı %31, oosit donasyonlarında bu oran %41 düzeyinde kalmaktadır [3]. Yine IVF sikluslarında ortalama implantasyon oranı %25 düzeyindedir [4]. IVF sikluslarında implantasyon başarısını arttıracak faktörlerin bulunması, bu hız kısıtlayan basamaktaki başarıyı arttıracaktır.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanımı altında IVF tedavisine alınan hastaların başarı şanslarının artırılabilmesi için, bu tanıyı oluşturan etiyolojik faktörlerin aydınlatılması gerekmektedir. Bu noktada, özellikle implantasyon evresinde, endometriyal dokuda süregelen fizyolojik ve / veya patolojik olayların aydınlatılabilmesi için araştırmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak implantasyon evresindeki endometriumda, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanılı hastalar ile kontrol grubu arasında, CD56 ve CD98 molekülleri ekspresyonları açısından fark olup olmadığının saptanmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Normal İmplantasyon

2.1.1 İmplantasyon Öncesi, Ovulasyon ve Fertilizasyon

Primordiyal folikülden preovulatar folikül oluşuncaya kadar yaklaşık 375 günlük bir süreç gerekmektedir. Bu süreç içerisinde oosit önce hipofizer hormonlara yanıtızsız olduğu bir dönemden geçer. Takiben preantral oosit döneminde siklik GnRH salınımlarına cevaben üretilen FSH ve LH hormonlarına bağımlı dönem başlar.(0-14 günler). Bu dönemde oosit kendisini çevreleyen stromal hücrelerin yardımı ile (granüloza ve teka hücreleri) önce sekonder oosit daha sonrasında tersiyer oosit 18-24mm (Graaf folikülü) evrelerine ulaşır. LH pikini takiben 9-12 saat aralığında kumulus – oosit – kompleksinden ayrılan oosit tubal silialar yardımı ile fertilizasyonu takiben implantasyon sürecini başlatmak amacı ile uterusu doğru yönlenecektir [5].

2.1.2 İmplantasyon evresi

İmplantasyon blastosist safhasına gelişen embriyonun reseptif olan endometriuma tutunmasını ve endometriumun içine gömülme sürecini içeren kompleks moleküler bağlantılar ile şekillenen bir grup prosedürü içermektedir (Appozisyon, Adezyon ve Penetrasyon). Endometrium sadece kısa bir süreliğine reseptif hale gelebilmektedir ve implantasyon penceresi olarak adlandırılan ve menstürel siklusun 20-24. günlerine denk gelen bu dönemde implantasyon sürecinin basamakları gerçekleşmektedir [6, 7]. Başarılı bir implantasyon oluşabilmesi için 3 temel öğeye ihtiyaç vardır ki bunlar; progesteron etkisinde, dayanıklı bir endometrium, canlı bir embriyo ve embriyo ile endometrium arasında senkronize bir diyalogdur.

2.1.3 Anatomik değişiklikler

Progesteron etkisi altında ovulasyondan sonraki altıncı günde yüzey epitelinin apikal bölgesinde, pinopodlar diye adlandırılan mikropotrüzyonlar oluşmaktadır. Bu pinopodlar implantasyon penceresinde sadece 24 saat kadar varlığını sürdürerek embriyonun tutunması için uygun ortamı sağlar [8, 9]. HOXA-10 ekspresyonu pinopod oluşumunda önemli bir yere sahiptir. HOXA-10 ekspresyonunun bloke edilmesi ile pinopod oluşumu ileri derece azalmaktadır [10]. Yine

sekretuar fazda implantasyon sırasındaki stromal ödeme cevap olarak beliren ilk belirti olan ve kapiller permeabiliteyi arttıran yaygın bir damar ağı endometriumun yüzey katmanlarında belirmeye başlar [11]. Bu oluşum bize vasküler değişikliklerin implantasyonda önemli bir rol aldığını belirtmektedir.

2.1.4 Hormonal Durum ve Diğer Proteinler

Endometrial glandların mid-luteal fazdaki sekretuar maturasyonu için dolaşımdaki progesteronun östrojene olan oranının belirli bir düzeyde tutulması gerekmektedir. Aynı zamanda bu dönemdeki yüksek östrojen seviyeleri implantasyonu engellemektedir [12-14]. Progesteronun blastosist implantasyonu için vazgeçilmez olduğu; dolaşımdaki progesteronun spesifik antikörler eklenerek nötralizasyonu ile [15], biyosentezinin inhibe edilmesi ile, hedef organ düzeyinde progesteron etkisinin reseptör blokörleri veya antiprogesteronlar kullanılarak engellenmesi ile [16, 17] kanıtlanmıştır. Sonuç olarak endometriumun reseptif döneminde progesteron vazgeçilmez iken, östrojen gerekli görülmemektedir.

Kalsitonin sentezinin de progesteronun etkisi altında reseptivite döneminde artmış olduğu saptanmıştır. Bu artışın Ca^{++} kanalları sayesinde sinyal iletimine katkıda bulunarak appozisyonu sağlaması ile reseptiviteyi arttırdığı düşünülmektedir [18].

Siklik regüle olan hormonlar dışında birçok protein yapının da implantasyon döneminde etkili oldukları bilinmektedir. Hücre – hücre ve hücre - matriks etkileşimine katkıda bulunarak hücre migrasyonunda ve diferensiyasyon sinyallerinin iletiminde görev alan $\alpha_v\beta_3$ ve $\alpha_4\beta_1$ gibi hücre adezyon molekülleri implantasyon penceresi döneminde insan endometriumunda saptanmıştır [19]. $\alpha_v\beta_3$ ve ligandı olan osteopontin embriyonik tutunma için potansiyel birer reseptör olarak görülmektedirler [20]. $\alpha_v\beta_3$ ekspresyonuna progesteron, HOXA-10 ve embriyonik IL-1 pozitif yönde katkı sağlarken, aşırı yüksek E2 düzeyleri integrinlerin ekspresyonunu azaltırlar [21, 22].

Diğer bir hücre adezyon molekülü olan selektinler de implantasyonda önemli rol oynamaktadır. Blastosistin tüm yüzeyinde L-selektin'in yaygın boyanması saptanmıştır. Benzer şekilde L-

selektin reseptör ligandları MECA-79 ve HECA-452 de maternal yüzeyde özellikle implantasyon döneminde eksprese edilmektedir [23].

Prostaglandinlerin (PG) ovulasyon, implantasyon ve mensturasyonda önemli roller oynadıkları bilinmektedir [24]. Siklooksigenaz-1 (COX-1) ve siklooksigenaz-2 (COX-2) enzimlerinin oluşumunda rol aldıkları ve progesteronun siklik değişimlerine cevap veren prostaglandin seviyeleri uterin kavite sıvısında da siklik değişiklikler gösterir [25]. Prostaglandinlerin oluşumunda rol alan enzimlerden fosfolipaz A₂ (cPLA₂) ve COX-2 yi taşımayan farelerde yapılan çalışmalar implantasyon açısından önemli bilgiler sağlamıştır. Bu enzimlerden herhangi birinin eksikliği durumunda prostaglandin sentezi aksamakta gecikmiş implantasyona bağlı gebelik başarısızlıkları oluşmakta, benzer şekilde lizofosfatidik asit reseptör 3 eksikliğinde de cPLA₂ eksikliğine benzer bir durum gelişmektedir. Dışarıdan verilen PG ile doğru zamanda implantasyonun sağlandığı gösterilmiştir [26, 27].

Müsin molekülü insan ve fare endometriumlarının apikal yüzeylerinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı yapılardır. Bu moleküllerin içerisinde iki tanesi, MUC-1 ve MAG (Mouse ascites golgi) öne çıkmaktadır. MUC-1 pencere döneminde embriyo implantasyonuna bir bariyer oluştururken, bu molekülün luminal yüzeyde yoğunluğunun azalması ile implantasyonun kolaylaştığı belirtilmiştir. MAG ise implantasyonun erken döneminde (18-19.gün) belirginleşmekte olup, nedeni izah edilemeyen infertilitesi olan hastaların %60 kadarında anormal MAG ekspresyonu gözlemlenmiştir. İmplantasyon başarısı için bir markır olarak kullanılması önerilmiştir [28].

Özellikle gebelikte ve luteal fazda endometrium fonksyonlarını yansıtan PP-14 (Pregnancy protein 14 veya glikodelin) açıklanamayan infertilitesi olan IVF hastalarında implantasyon başarısını saptamak amacı ile kullanılmıştır. Embriyo transferini takiben 8. günde alınan serum örneklerinde bakılan glycodelin düzeyi gebe kalanlarda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır [29].

Hücre yüzey reseptörleri ile ilişkide bulunan ve güçlü bir hücreler arası sinyal regülatörü olan glikoprotein yapısındaki sitokinler, blastosist formasyonunda ve implantasyon aşamasında önemli bir rol üstlenmektedir. Blastosistin endometrial kaviteye girmesi trofoblastlardan endometrial reseptiviteyi sağlayacak çeşitli sitokinlerin salınmasını sağlamaktadır. Memelilerde bu

sitokinlerin etkilerinin tam veya parsiyal olarak engellenmesi implantasyon başarısızlığına veya anormal plesenta formasyonuna yol açmaktadır [30, 31].

Proliferasyon, diferensiyasyon ve hücre sağkalımı ile ilgili otokrin ve parakrin etkisi saptanan lösemi inhibe edici faktör (LIF) eksikliği durumunda farelerde implantasyonun oluşmadığı, LIF desteğinin verildiği durumda ise normal implantasyonun yeniden sağlandığı belirtilmiştir [32]. Yakın zamanda LIFin adezyon ve invazyon safhasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [33]. Klinik araştırmalarda rekombinant LIF çalışmaları implantasyonu arttırmak amacı ile yapılmakta olup gelecekte bu tür çalışmalar çok önemli roller oynayacaktır [34].

IL-6 ekspresyonu özellikle mid luteal dönemde artan ve daha sonra geç luteal dönemde azalan bir salgılanma paterni izler ve epiteliyal glandüler hücrelere lokalize halde saptanır. IL-6 reseptörü de tüm menstürel siklus sırasında sabit bir şekilde eksprese edilir ve endometrial reseptivitede ve implantasyon sürecinde rol almaktadır [35, 36]. IL-6 ekspresyonunun implantasyon penceresi döneminde fazla olması ve hem blastosistin hem de endometriumun IL-6 reseptörlerini içeriyor olması IL-6'nın implantasyondaki otokrin/parakrin etkisini göstermektedir. IL-6 geninin hedeflenerek tahrip edilmesini takiben fare blastosistinin implantasyonu bozulmamış olup implante olan blastosistin gelişmediği saptanmıştır [37]. Tekrarlayan düşükleri olan hastalarda da mid-luteal endometrial IL-6 ekspresyonunun baskılanmış olduğu ortaya çıkarılmıştır [38]. LIF ve IL-6'nın birlikte dahil olduğu ve sinyal iletiminde gp130 aksesuar sinyal iletim alt ünitesi kullanan aileye IL-11 de dahildir ve IL-11 ile IL-11 reseptörü de son dönemde insan endometriumunda saptanmıştır. Endometriumdaki tüm esas hücre tipleri siklik düzende IL-11 eksprese etmektedir.

Matriks metalloproteinazları (MMP) ekstraselüler matriksin yıkımında ve yeniden yapılandırılmasında önemli bir görev üstlenirler. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 ve MMP-10 endometriumda saptanmışlardır [39]. Sitokinler dışında TGF beta gibi çeşitli büyüme faktörleri otokrin ve parakrin etki göstererek proteaz ve anti-proteazların ekspresyonu ile implantasyonda rol oynamaktadırlar. Fare deneylerinde heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) implantasyonda çok önemli bir görev aldığı saptanmıştır. İnsan

endometriumunda da HB-EGF'nin implantasyon döneminde eksprese edildiği görülmüştür [40, 41].

2.2 İmplantasyon Başarısızlığı

İmplantasyon başarısızlığı için net bir tanım olmasa da sıkça kullanılan kriterler ard arda üç kez yapılan IVF uygulamasında (bazı otörlerce 5 adet kaliteli veya toplamda 10 adet embriyo kullanılmasına rağmen) embriyo implantasyonunun başarısız olmasıdır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığındaki nedenler açısından farklı görüşler mevcuttur. Bir grup araştırmacı tekrarlayan implantasyon başarısızlığı için iyi kalitede embriyoların transfer edilmeleri ve embriyo kalitesinin kötü olduğu durumda implantasyon başarısızlığından bahsedilmemesi gerektiği görüşündeyken diğer bir grup ise iyi kalitede embriyo üretememenin bile başlı başına implantasyon başarısızlığı nedeni olması gerektiğini savunmaktadır. İmplantasyon başarısızlığında rol oynayan faktörlerin başlıcaları tablo 1 de özetlenmektedir.

Tablo 1: İmplantasyon başarısızlığında etiyolojik faktörler ve nedenleri.

Etiyolojik Faktörler	Nedenleri
Anne yaşı, oosit ve embriyo kalitesi	Düşük over rezervi ve yaş bağlantılı kromozomal anomaliler Polikistik over sendromu
İmmünolojik faktörler	Antifosfolipid antikorları Oto-immün hastalıklar Endometriyal sitokinlerin ve naturel killer hücrelerin anormal ekspresyonu
Endometriyal reseptivite	Endometriyal östrojen ve progesteron reseptörlerinin anormal ekspresyonu Endometriyal integrinlerin ve pinopodların anormal ekspresyonu
Uterin, Tubal ve Peritoneal faktörler	Endometrial polipler Intramural fibroidler Hidrosalpinks Endometriozis Enfeksiyon

2.2.1 Anne Yaşı, Oosit ve Embriyo Kalitesi

Artan anne yaşının üreme performansına olan olumsuz etkisi bir gerçektir. 35 yaşından sonra hem over rezervinin azalması hem de sex kromozomları dahil 13,16,18,21 ve 22. kromozomlarda oluşan anöploidilere daha açık olunması IVF sikluslarında implantasyon başarısızlığı şansını arttırmaktadır [42]. İmplantasyon başarısızlığı saptanan hastalarda preimplantasyon genetik tanı ve anöploidi taraması sonrası blastosist transferi tartışılmış olmakla birlikte yapılan bir çalışmada bu yöntem ile karşılaştırılan iki yaş grubu (25-40 yaş ve 41 yaş üstü) arasında implantasyon başarısında anlamlı bir fark saptanmamıştır [42].

Normal foliküler fazda oositler, kumulus hücrelerindeki LH reseptörlerini kontrol ederek erken maturasyonu ve prematür lüteinizasyonu engeller. Polikistik over sendromu olgularında prematür LH piklerinin olması bu süreci sekteye uğratmaktadır. Yapılan bir çalışmada IVF protokollerinde LH piklerinin önlenmesi ile PKOS hastaları ile kontrol grubu arasında IVF sonuçları açısından fark tespit edilmemiştir [43]. IVF uygulanacak olan PKOS hastalarında metformin kullanımı ile plaseboya göre 2 kat fazla 12 hafta gebelik sağlanması ise, metforminin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan PKOS hastalarında da benzer sonuca ulaşılabilineceğini düşündürmektedir [44].

2.2.2 İmmunolojik Faktörler

Atıfosfolipid antikor sendromu venöz ve arteriyel tromboembolik olaylar ile karakterize, kardiyovasküler dermatolojik, norolojik sistemleri etkileyen, tekrarlayan implantasyon ve üreme başarısızlığına, tekrarlayan düşüklere yol açan multisistemik bir bozukluktur. Tekrarlayan düşüklere için tedavisinde düşük doz aspirin ile oldukça büyük bir mesafe katedilmiş olmasına rağmen aynı başarı tekrarlayan implantasyon başarısızlığı için elde edilememiştir [45, 46].

İnterlökin ailesinden inflatauvar yanıt öncüllerinden TNF- α ve IFN- γ nın endometrial aşırı ekspresyonunun implantasyon başarısızlığında rol oynadığı gösterilmiştir [47].

2.2.3 Uterin, Tubal ve Peritona Bağlı Faktörler

İmplantasyon başarısızlığı ile direkt olarak ilişkilendirilemeyecek olsa da polipler, submuköz myomlar ve şinesinin tekrarlayan IVF başarısızlığı ile ilişkisi olduğuna dair yazılmış makaleler bulunmaktadır. Submuköz myomların özellikle IVF tedavisi sırasında büyüme eğiliminde ise, bir sonraki IVF tedavisi öncesi çıkarılmasını önerenler bulunmaktadır. Benzer şekilde hidrosalpinksin IVF başarısını yarı yarıya azalttığı ve var olan hidrosalpinksin kaldırılması ile başarının arttığı bildirilmiştir. Güncel kanıta dayalı tıp, hidrosalpinks varlığında IVF öncesi unilateral veya bilateral salpenjektomi yapılmasını önermektedir [48].

Adenomyozis de tek başına tekrarlayan implantasyon başarısızlığında etken olabileceğini belirten yayınlar vardır. 152 infertil hastada yapılan bir çalışmada sub-endometriyal bağlantı zonu kalınlığı ölçülmüş olup bu alanda kalınlaşma saptanan hastaların IVF implantasyon başarıları anlamlı olarak düşük saptanmıştır [49].

2.3 CD 98

CD 98, aminoasit ve hormon transportunda, hücre birleşmesinde ve integrin bağımlı yayılmaya neden olduğu bilinen, birden çok fonksiyonlu, tüm insan dokularında; özellikle akciğer, böbrek, dalak, over, testis ve plesenta gibi organlarda kendisini gösteren, bir tip 2 glikoproteindir [50-52]. Mutant CD 98 alele sahip fareler embriyonik gelişme safhasında (ortalama 7-9 gün) ölürken, total gen delesyonuna bağlı eksikliği ise daha erken dönemlerde ölümcüldür [53]. Molekül transportundaki görevini $\beta 1$ integrinler ile ilişkiye girerek yürütür. $\beta 1$ integrinlerin de CD 98 gibi hücre bölünmesinde ve canlılığın devamında rolleri büyüktür ki; benzer şekilde $\beta 1$ integrin eksikliği de implantasyondan hemen sonra bölünemeyen hücreler ve ölüm ile kendisini gösterir [54].

CD 98 ekspresyonu sadece implantasyon penceresine özgü olup, gonadal steroid hormonlar ve hCG ile stimule edilebiliyor olması implantasyon sürecinde önemli bir yere sahip olabileceğini göstermektedir. Yine bir çalışmada endometriyal hücrelerin bulunduğu ortama blastosistin de dahil edilmesi ile parakrin etki ile CD 98 de aşırı dereceli bir çoğalma saptanmıştır. Fare üzerinde

yapılan deneylerde lentivirüsler aracılığı ile CD 98 gen ekspresyonunun baskılanması ile blastosist adezyonuna darbe vurulmuş olup, tam tersi olarak da CD 98 ekspresyonunun 2-10 kat artırılması ile 24 saat içerisinde %100'e yakın implantasyon sağlanmıştır [55].

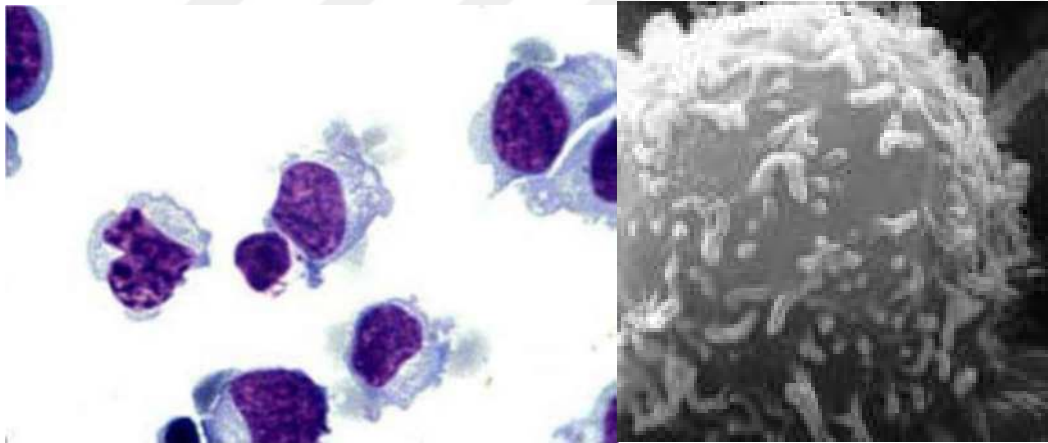
2.4 CD56 ve Uterin Naturel Killer Hücreler

Naturel Killer (NK) hücreleri morfolojik olarak azurofik granüller içeren büyük sitoplazmalarıyla karakterize olup; bazen large granuler lenfosit (LGL) adını alırlar (resim 1).

Periferik ve uNK hücrelerinin karakteristik özellikleri CD56 antijenine sahip olmalarıdır. CD57 insan NK hücrelerinin ilk tanımlanan marker olsa da daha sonraları geliştirilen CD56 ve CD16 NK hücrelerin tanımlanmasında daha sık kullanılmıştır. NK hücreleri iki şekilde gösterilebilir.

- 1- CD16 negatif CD56 pozitif NK hücreleri (CD56 parlak)
- 2- CD16 pozitif CD56 pozitif NK hücreleri (CD56 sönük)

Resim 1 : NK hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.



NK hücrelerin özelliği, bağışıklık sistemi T hücrelerinden salgılanan antikorlar yokluğunda hedefine spesifik olarak yönlenebilmesi ve elimine edebilmesidir. Normal hücreler membran proteinleri sayesinde NK hücreleri ile iletişime geçip onları inaktif bir durumda tutabiliyorken, anormal hücreler ve kendi bedeninin parçası olmayan hücreler NK'leri aktive edebilmektedir.

NK hücrelerin gebelik üzerinde belirleyici bir rolü olduğu artık yavaş yavaş benimsenmektedir. Menstürel siklusun ikinci döneminde progesteron etkisi altında özellikle LH pikini takip eden 6-7. günlerde NK hücreleri hızla çoğalmaya başlar. Siklusun mid-luteal fazındaki uNK

hücrelerindeki artışların progesteron tarafından kontrol edildiği düşünülmüştür. Bununla birlikte uNK hücreleri progesteron reseptörü içermezken, prolaktin reseptörü, östrojen reseptörü ve glukokortikoid reseptörü içerirler [56].

CD56+ hücreler erken gebelik döneminde invaze olan trofoblast hücreleri ile maternal desidua arasındaki sınırdaki beliren lenfositlerin %70 ini oluşturmaktadır [57]. İlginç olarak endometriumdaki sayıları ve etkileri artmasına rağmen, periferik kandaki sayıları düşmektedir [58]. Bu bulguya dayanarak ve farklı görevleri olması göz önüne alınarak, iki hipotez ortaya atılmıştır; birincisi endometriyal anjiogenez artmasına bağlı olarak uterin naturel killer (uNK) hücrelerin periferik kandaki NK hücrelerin belirli bir havuzundan seçildiği, ikincisi ise, uNK hücrelerin kanda bulunan NK hücrelerinden tamamen farklı bir kökenden geliyor olabileceğidir. uNK hücrelerinin halihazırda gebe olmayan endometriumda bulunması ve anjiogenez faktörlerinin sentezi ve salgılanması ile neovaskülarizasyonu tetikleyebilmesi ikinci hipotezi desteklemektedir. Bu hipotezi destekleyen bir diğer bulgu ise uterin arter doppler rezistansının fazla olduğu tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda uNK hücrelerinin endometriumda fazla olarak saptanmış olmasıdır [59]. Uterin NK hücrelerinin sitoplazmik içerikleri de periferik dolaşımdaki NK hücrelerinin içeriklerine benzemektedir; ancak uNK hücreleri kandaki NK hücrelerinin aksine fetal kökenli hücreler söz konusu olduğunda çok daha ‘barışçıl’ bir tutum sergilemektedirler. Endometrium IL-2 açısından bir serbest bölge niteliği taşımaktadır. Bu özellik fetal dokuların kabulünde çok önemli bir rol oynamaktadır çünkü IL-2 varlığında uNK hücreleri aktive olabilmektedir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıplarındaki etiyolojileri açıklığa kavuşturmak için özellikle CD16- ve CD56+ hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda, mid luteal dönemde alınan endometriyal dokudaki CD56+ hücre sayıları, implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kaybı olan gruplarda, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır [60-62]. Takiben CD56+ hücre sayısının implantasyon başarısında tek başına yeterli olmadığı, lenfositlerin erken dönem hücre aktivasyon belirteci olarak saptanan CD69’un değerlendirmesi gerektiği belirtilmiştir. CD69 ile yapılan çalışmalarda proliferasyon fazına göre sekretuar fazda endometriumda daha çok saptanmıştır [63]. CD69 ile ilgili tekrarlayan

implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilgili yayınlar bulunmakta olup bu yayınlarda herhangi anlamlı bir fark elde edilememiştir [61, 64].



3. MATERYAL ve METOD

3.1.Hasta Seçimi ve Çalışma Dizaynı

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik kurulu tarafından onaylanmış (proje no: KA11/120) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Yardımcı Üreme Teknolojileri ve Tüp Bebek Ünitesi ile Başkent Üniversitesi Adana Uygulama Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Yardımcı Üreme Teknolojileri ve Tüp Bebek Ünitesinde Mart 2011 – Ekim 2011 tarihleri arasında yürütülmüştür.

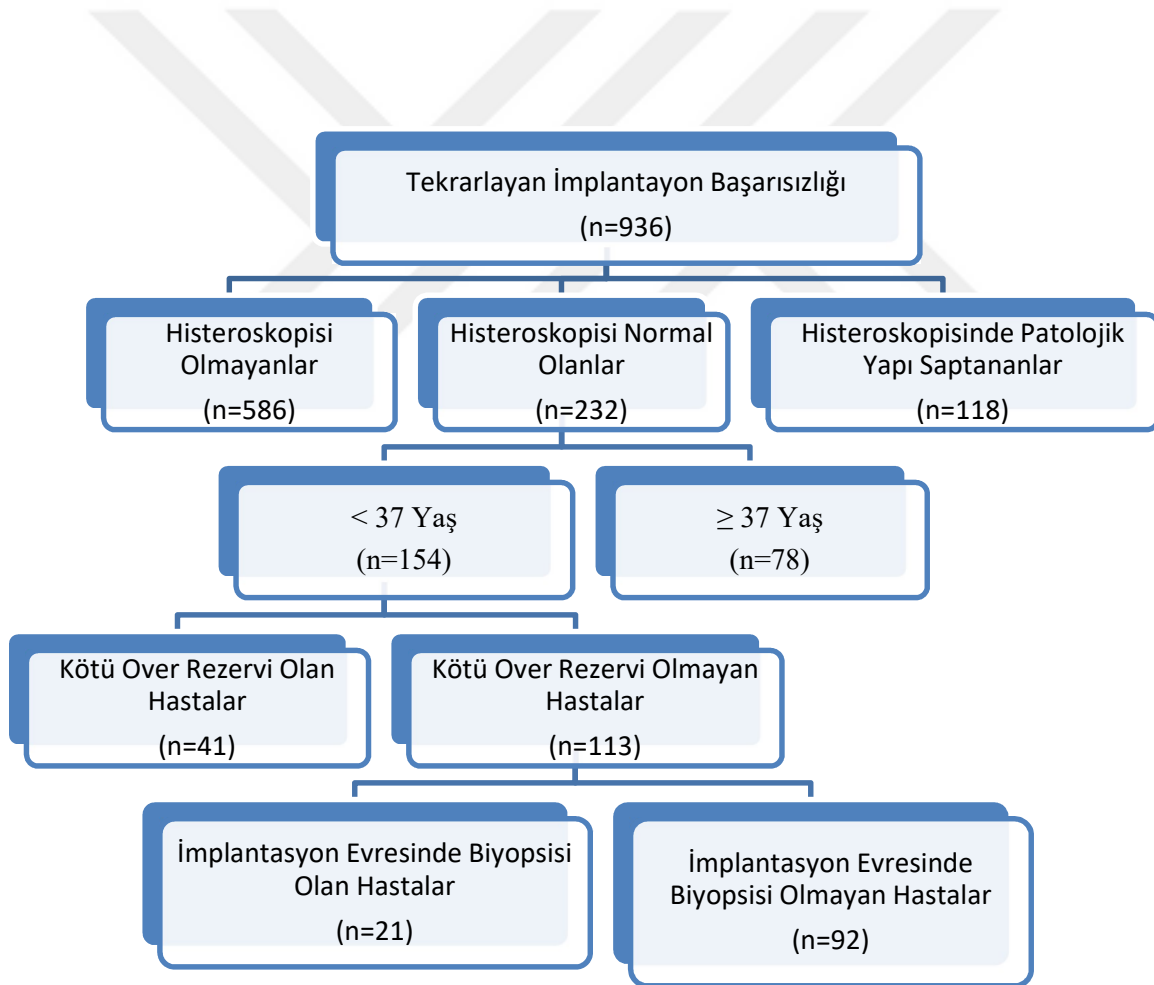
Çalışmada çalışma grubu ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Her iki merkezden 2004 ile 2010 yılları arasında olmak üzere toplamda 6260 hastanın IVF siklus verilerine ulaşılmış olup; bu hastalara uygulanan 8520 siklus verisi bilgisayar bazlı datalardan retrospektif olarak incelenmiştir.

Çalışma grubundaki hastalar tekrarlayan implantasyon başarısızlığı hastaları olarak tanımlanmıştır ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanım kriteri olarak yapılan en az 3 IVF siklusunu ve toplamda en az 8 embriyo verilmesini takiben herhangi bir klinik gebelik (bHCG pozitifliği dahil) elde edilememiş olması alınmıştır. 6260 hastanın 936 tanesinde tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olduğu saptanmış olup, bu hastalardan siklus öncesi histeroskopisi yapılmamış olan 586 tanesi ve histeroskopisi yapılmış olup da histeroskopisinde patolojik oluşum (polip, septum, adezyon) saptanan 118 tanesi çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamızda kötü over rezervi şöyle tanımlanmıştır: Bir siklusta toplam doz olarak 3000Ü üzeri rFSH gereksinimi olmuş olması ve/veya OPU sonrası elde edilen metafaz II oosit sayısının 6'nın altında olması olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, 41 hasta kötü over rezerv tanıları olması nedeni ile çalışma dışında bırakılmış, 37 yaş ve üzeri olan 78 hasta, ileri yaşın embriyo implantasyonu üzerine olan olumsuz etkilerini dışlamak amacı ile çalışma grubu dışında bırakılmıştır.

Kalan 113 hastanın patolojik verileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Bu hastaların 67 tanesinin alınmış patolojik preparatlarının olduğu ve bu preparatlardan da sadece 21 tanesinin, Noyes kriterleri [65] ile belirlenen, çalışma grubuna uygun post ovulatuvar 5-10. günlerde (adetin 19-24. günleri – implantasyon penceresi) alınmış olduğu saptanmıştır (tablo 2).

Tablo 2 : Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı grubu hastalarının seçimi.

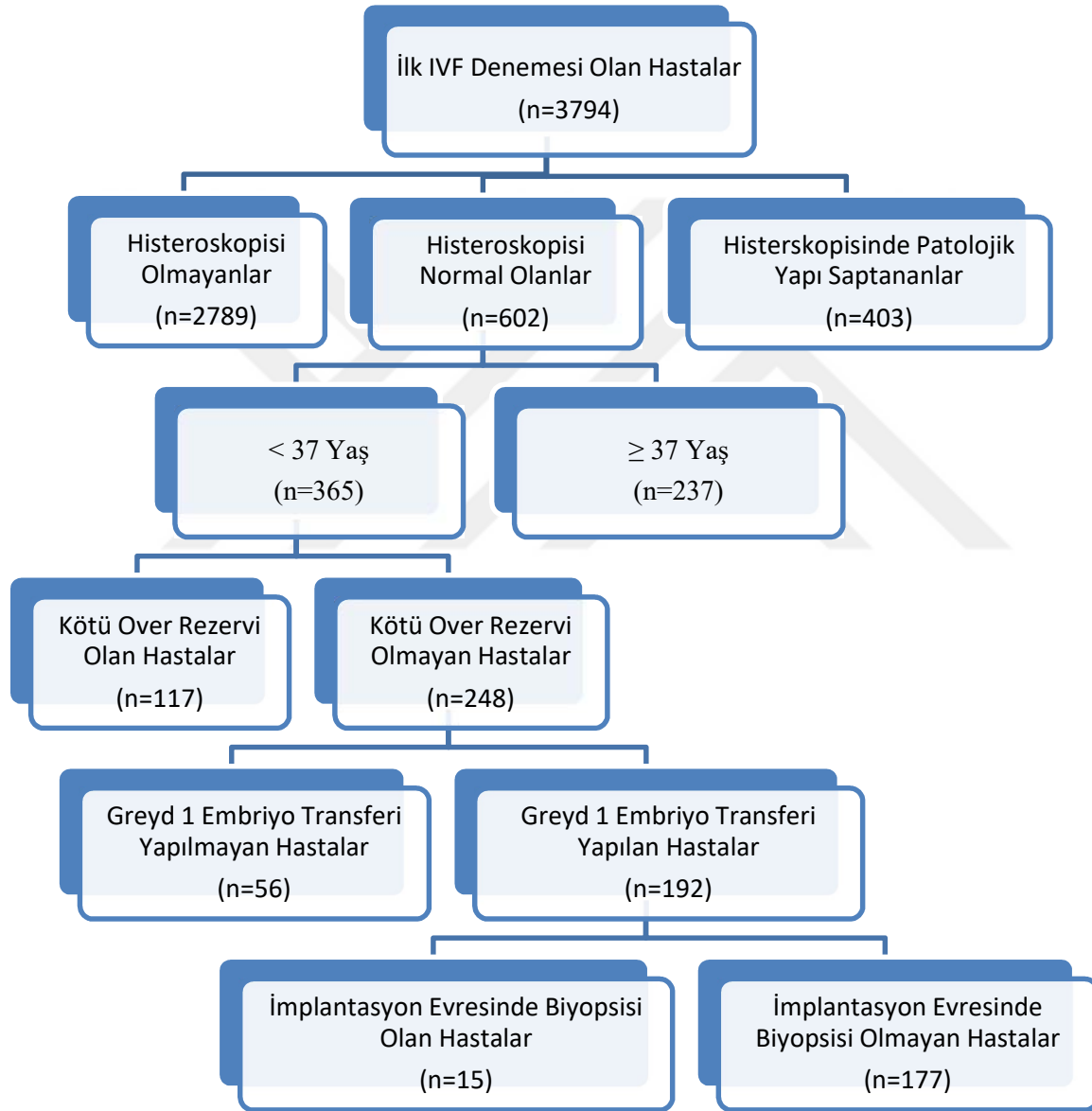


Çalışmanın kontrol grubu olarak belirlenen hastalar retrospektif bilgisayar data sisteminden taranarak çıkarılmıştır. Kontrol grubuna daha önce IVF dışında herhangi bir yöntem ile gebe kalamayan, biyopsi alınan luteal fazı takip eden siklusta IVF ile gebe kalan ve 12 hafta üzeri gebelik elde edilen hastalar dahil edilmiştir. Bu hastalardan endometriyal biyopsi IVF uygulamasından bir önceki siklusta implantasyon penceresi döneminde, histeroskopik görüntüleme altında alınmıştır. İlk kez IVF tedavisine başvuran 3794 hastanın 2789 tanesi histeroskopisi yapılmamış olduğundan ve 403 tanesi de histeroskopisinde patolojik özellikler saptanmış olduğundan çalışma dışında tutulmuştur.

237 hasta 37 yaş ve üzeri olması dolayısı ile ve 117 hasta kötü over rezervi olması nedeni ile çalışmadan çıkarılmıştır. Kontrol hastalarının en iyi kalitede embriyo almış olmasına dikkat edilmiştir. Embriyo kalitesi; içerdiği blastomer sayısına, blastomerlerin düzenliliğine ve boyutlarına, fragmantasyon derecesine ve çekirdeklerinin özelliklerine göre yapılmış olan greytleme sistemi göz önünde tutularak değerlendirilmiştir [66]. Kontrol grubunda en az 2 adet greyd 1 “top quality embryo” embriyo transferi yapılan hastalar seçilmiştir. 56 hasta kötü embriyo kalitesi nedeni ile çalışma dışı bırakılmıştır.

Kalan 192 hastanın sadece 15’inin implantasyon penceresine uygun endometriyal biyopsi materyalleri olduğu patoloji tarafından teyit edilmiş ve çalışmanın kontrol grubuna bu 15 hasta dahil edilmiştir (tablo 3).

Tablo 3 : Kontrol grubu hastaların seçimi



Hastaların implantasyon sürecini etkileyebilecek sistemik hastalığı olan (diabetes mellitus, tiroid fonksiyon bozukluğu, SLE, antifosfolipid antikor sendromu vb...), patolojilerinde endometrit saptanmış olan ve belirtilen son adet tarihi ile, noyes kriterleri kullanılarak belirlenen endometrial örnek günleri arasında uygunluk olmayan hastalar çalışma dışarısında bırakılmıştır.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme

Hastaların endometriyumlarından alınan biyopsi örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit tespitine konulmuş ve rutin doku takip prosedürü sonrası parafin bloklara gömülerek 5 µm'lik hemotoksilen eozin boyalı kesitler hazırlandı ve hazırlanan bu kesitler ışık mikroskopik düzeyde Noyes kriterleri [65] altında değerlendirildi (resim 2).

İmmünohistokimyasal inceleme için, endometriyum biyopsi örneklerinin gömüldüğü parafin bloklardan Poli-L-lizin kaplı lamlara 5 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler CD 56 pozitif hücrelerin saptanabilmesi için deparafinizasyonu takiben, "Autostainer Link 48 (DAKO) sisteminde CD56 primer antikor (7.0 ml, kullanıma hazır, Code IR628, Clone 123C3, DAKO, USA) kullanılarak boyandı.

CD 98 için Poli-L-lizin kaplı lamlara alınan 5 µm'lik kesitlere streptavidin-biotin-immunperoksidaz yöntemi ile CD 98 N1C2 (dilüsyon 1:200, katalog GTX 104108, Gene Text, Inc) ile primer antikor uygulandı ve CD 98 antikoru inkübasyon için +4 °C'de bir gece bekletildi.

CD 56 antikor salınımı semikantitatif olarak değerlendirildi. CD 56 antikoru boyanma paternini belirlemek için, endometriyal stromada kırmızı kahverengi boyanma gösteren hücrelerin yaygınlığı değerlendirildi. Stroma içerisinde yaygın şekilde boyanan hücrelerin yüzdesel değerlerinin karşılıkları olarak 0 - 4 arasında skorlar verildi. Endometriyal stromada boyanma yok (0) olarak , endometriyal stromada %1-25 oranında boyanma yaygınlığı gösteren hücreler (1) olarak, endometriyal stromada %26-50 oranında boyanma yaygınlığı gösteren hücreler (2) olarak, endometriyal stromada %51-75 oranında boyanma yaygınlığı gösteren hücreler (3) olarak ve endometriyal stromada %≥76 boyanma yaygınlığı gösteren hücreler (4) olarak değerlendirildi (resim 3 - 4).

CD 98 antikoru için ise endometriyal glandlarda luminal yüzeyde ve membranöz, kırmızı kahverengi boyanma pozitif kabul edildi ve boyanma şiddeti ile boyanma yüzdesi birlikte değerlendirildi (resim 5 – 6).

Boyanma şiddeti değerlendirmesinde kullanılan kriterler:

Boyanma yok = 0

Zayıf boyanma = 1

Orta derecede boyanma = 2

Şiddetli boyanma = 3

Boyanma yüzdesi değerlendirilmesinde kullanılan kriterler:

%0 = 0

%1 – 25 = 1

%26 – 50 = 2

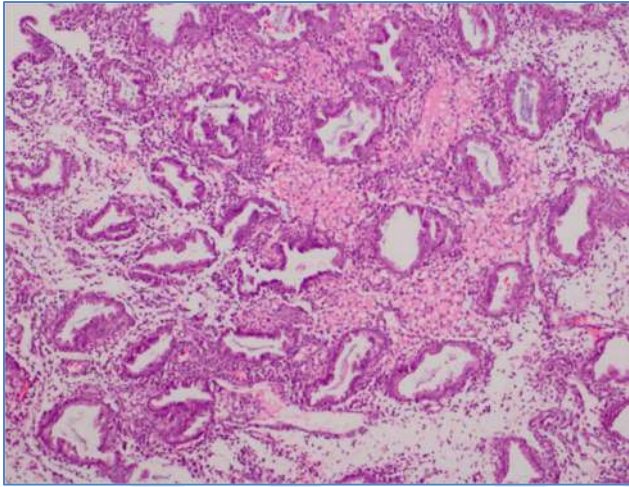
%51 – 75 = 3

%≥76 = 4 olarak değerlendirildi.

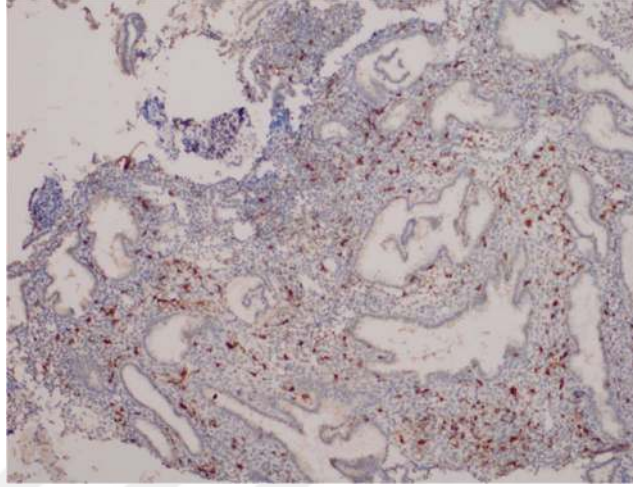
Bu boyanma paternine göre maksimum skor 12 (%75'den fazla ve güçlü kırmızı kahverengi membranöz boyanma) ve minumum skor ise 0 (boyanma izlenmeyen) olabilecek şekilde değerlendirildi. CD98 boyanması sırasında stromal tutulum (+) veya (-) olarak değerlendirilmiştir.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde uygun olan yerlerde “independent samples T test”, “one way ANOVA” ve “chi-square” kullanılmıştır. İstatistiksel analizde SPSS 17.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

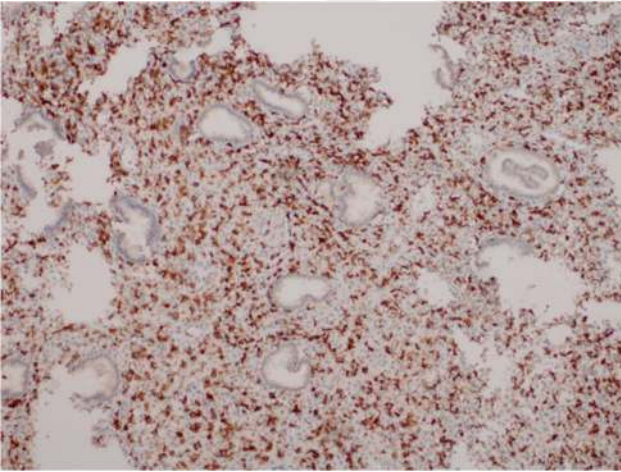
Resim A



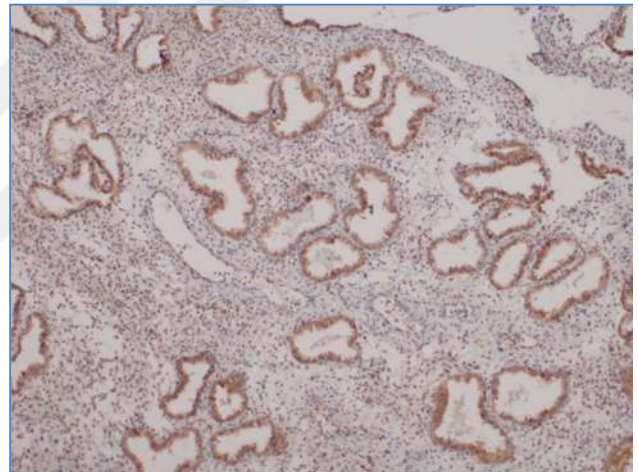
Resim B



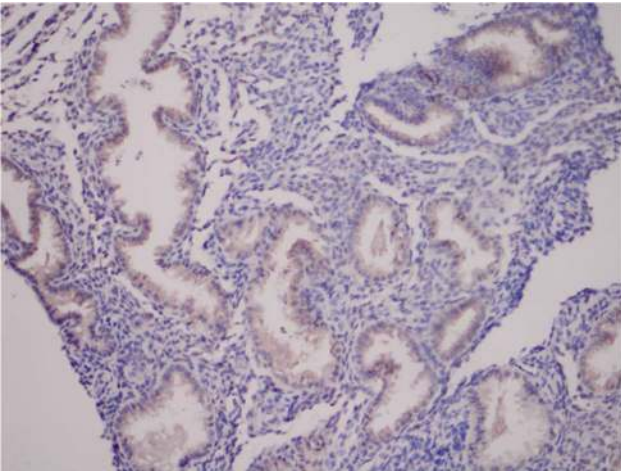
Resim C



Resim D



Resim E



Resim A : İmplantasyon evresinde sekretuar evrede endometriyum (H&E x 100).

Resim B : Kontrol grubunda endometriyal stromada CD 56 antikoru ile kırmızı kahverengi boyanma gösteren az sayıda hücre (İmmunohistokimya x100).

Resim C : Çalışma grubunda endometriyal stromada CD 56 antikoru ile kırmızı kahverengi boyanma gösteren yaygın hücre grupları ((İmmunohistokimya x100).

Resim D : Kontrol grubunda CD 98 antikoru endometriyal glandlarda lüminal ve membranöz kırmızı kahverengi güçlü pozitif boyanma (İmmunohistokimya x100).

Resim E : Çalışma grubunda CD 98 antikoru endometriyal glandlarda lüminal ve membranöz kırmızı kahverengi zayıf pozitif boyanma (İmmunohistokimya x200).

4. BULGULAR

Demografik özellikler açısından her iki grup karşılaştırıldığında; çalışma grubundaki hastaların yaş ortalamaları 31.9 ± 2.7 iken, kontrol grubundaki hastaların yaş ortalamaları 28.5 ± 3.5 olarak saptanmıştır ($p=.002$). Çalışma grubundaki hastaların infertilite süreleri ortalamaları 4.8 ± 2.6 iken bu değer kontrol grubunda 8.4 ± 3.9 olmuştur ($p=.004$). Vücut kitle endeksi (BMI) açısından çalışma grubundaki hastaların ortalaması 24.9 ± 4.4 iken, kontrol grubunda ortalama değer 23.6 ± 3.3 olarak saptanmıştır ($p=.419$).

Uygulanan IVF prosedürleri açısından grupların karşılaştırılması tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 4 : Her iki grubun IVF parametreleri ortalamaları ve aralarındaki ilişkiler.

	Çalışma grubu	Kontrol grubu	P değeri
Toplamda Transfer Edilen Embriyo Sayısı	11.95 ± 3.81	2.80 ± 0.56	$<.001^*$
D3 FSH Seviyesi (mIU/mL)	5.97 ± 1.53	4.91 ± 1.21	$.043^*$
Antral Folikül Sayısı	6.61 ± 2.50	7.7 ± 3.20	$.299$
5.gün E2 Seviyesi (pg/mL)	361.9 ± 222.1	420.4 ± 219.5	$.453$
HCG Günü E2 Seviyesi (pg/mL)	1899.1 ± 1018.3	2114.3 ± 1007.1	$.547$
HCG Günü Progesteron Seviyesi (ng/mL)	0.744 ± 0.53	0.671 ± 0.320	$.635$
HCG Günü Endometriyal Kalınlık	11.02 ± 2.10	11.54 ± 2.80	$.531$
Toplanan Oosit Sayısı	15.4 ± 6.0	15.4 ± 6.6	$.914$
Metafaz II Oosit Sayısı	12.6 ± 4.9	12.4 ± 5.9	$.905$
Fertilizasyon Oranı	66.3 ± 20.1	73.7 ± 21.6	$.302$
Tedavi Süresi (gün)	9.19 ± 1.60	8.40 ± 1.24	$.495$
Biyopsi Alınan Luteal Fazı Takip Eden Siklуста Gebelik Oranları	%0	%100	$<.001^*$

**İstatistiksel olarak anlamlı fark elde edilen değerlendirme.*

Bu hastalardan alınan endometriyal örnekler üzerinde yapılan endometriyal günlendirme işleminin çalışma grubu için ortalama değeri 21.14 ± 1.65 (19 – 24 arası) iken, kontrol grubu için ortalama değer 21.33 ± 1.91 (19 – 24 arası) olarak saptanmıştır.

CD56 ve CD98 antikorlarının her iki grubada uygulanmasını takiben elde edilen sonuçlar, hem puanlama sistemi kullanılması varlığında hem de gruplama altında, istatistiki anlamlılık özellikleri ile birlikte, tablo 3 ve 4 de özetlenmiştir.

Tablo 5 : CD98 boyanma miktarları, CD98 skoru ve CD56 boyanma yüzdelерinin, yüzdelik karşılıkları puanlama sistemi kullanılarak karşılaştırılması.

	Çalışma grubu	Kontrol grubu	P Değeri
CD56 Boyanma Yüzdesi	2.00 ± 0.77	1.20 ± 0.41	.001*
CD98 Boyanma Yüzdesi	2.33 ± 0.79	3.47 ± 0.64	<.001*
CD98 Boyanma Şiddeti	1.57 ± 0.50	2.40 ± 0.50	<.001*
CD98 Skoru	3.62 ± 1.53	8.20 ± 1.89	<.001*

**İstatistiksel olarak anlamlı fark elde edilen değerlendirme.*

Tablo 6 : CD98 boyanma miktarları, stromal boyanma varlığı ve CD56 boyanma yüzdelерinin gruplar arası farklarının karşılaştırılması

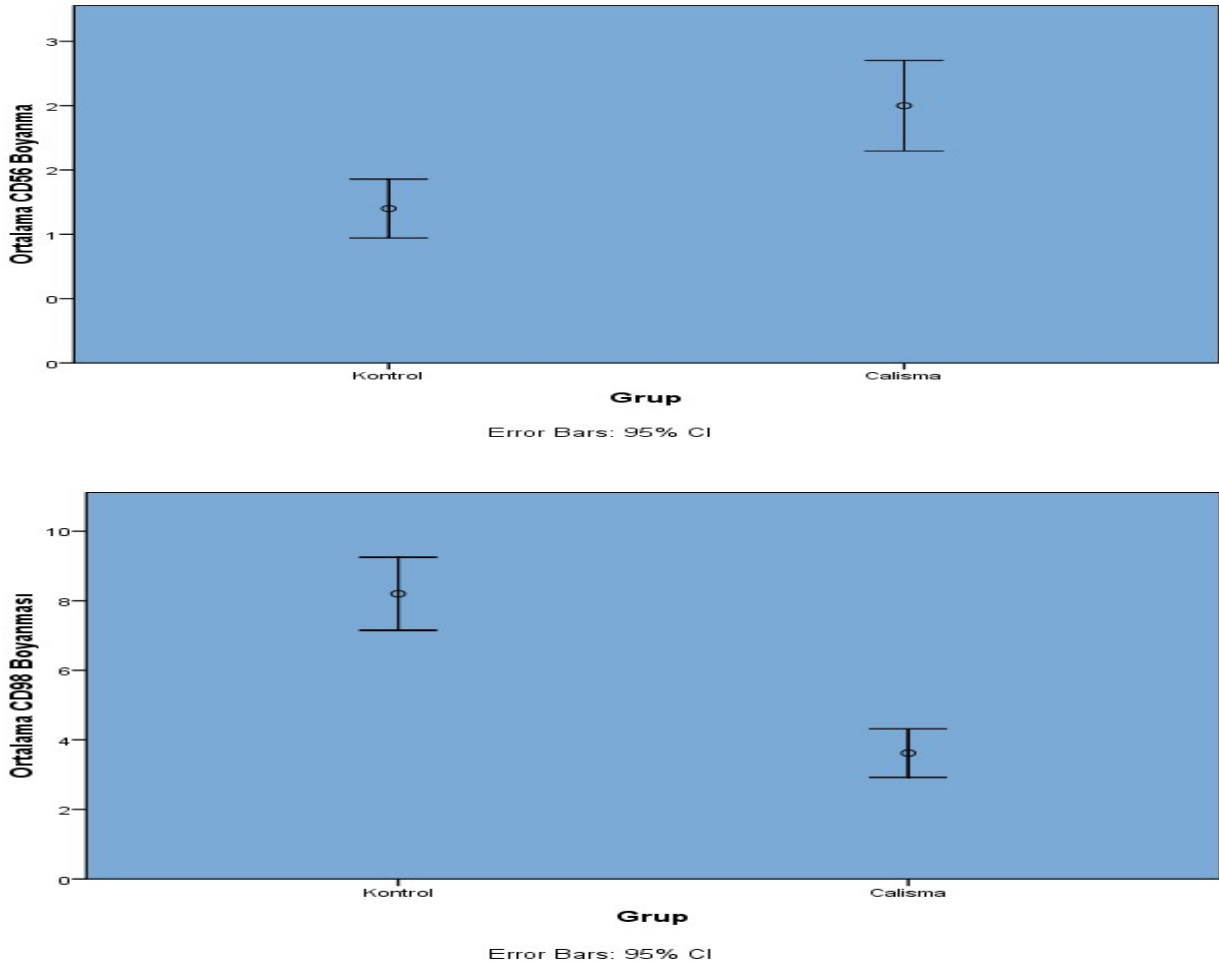
	Gruplar	Çalışma grubu	Kontrol grubu	P Değeri
CD56 Boyanma Yüzdesi	1 (%1-25)	%33.3	%80	.002*
	2 (%26-50)	%42.9	%20	
	3 (%51-75)	%28.6	%0	
CD98 Boyanma Şiddeti	1	%42.9	%0	<.001*
	2	%57.1	%60	
	3	%0	%40	
CD98 Boyanma Yüzdesi	1 (%1-25)	%9.5	%0	<.001*
	2 (%26-50)	%57.1	%6.7	
	3 (%51-75)	%23.8	%40	
	4 (%76-100)	%9.5	%53.3	
CD98 Stromal Boyanma	Var	%9.5	%20	.337
	Yok	%90.5	%80	

**İstatistiksel olarak anlamlı fark elde edilen değerlendirme.*

CD56 ile yapılan boyamanın sonuçları iki farklı değerlendirme yöntemi ile analiz edilmiştir. Yüzdelik karşılıklara puan verilmesi ile yapılan değerlendirmede çalışma grubu endometriyal dokularının CD56 ile boyanmasının ortalama değeri kontrol grubundan daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Boyanma yüzdelerinin gruplar halinde yapılan karşılaştırılmasında ise çalışma grubundaki CD56 (+) hücreler, kontrol grubuna göre belirgin olarak daha fazla saptanmıştır ($p<0.05$).

Yüzdeliklerin puanlanması ile elde edilen CD98 skorum sisteminde elde edilen ortalamalarda her iki grup arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Endometriyal glandlarda CD98 boyanma şiddeti ve CD98 boyanma yüzdesi ortalamaları arasında, hem puanlama hem de grupların karşılaştırılması yöntemleri ile analiz edildiğinde, anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0.05$).

Tablo 7 : CD56 ve CD98 boyanmalarının gruplar arasında karşılaştırılması ($p<0.05$)



5. TARTIŞMA

Bu güncel çalışmada, luteal fazda yapılan endometriyel biyopsilerle histopatolojik değerlendirmede; hücre içi transportta kullanılan mekanizmaların önemli basamaklarında görevli olan glikoprotein yapıdaki CD98 ve bağışıklık sisteminin yapı taşlarından olan NK hücrelerinin dokularda tespitinde önemli rol oynayan antijenik CD56 yapısına karşı geliştirilen antikorlar kullanılmıştır. Bu antikorlar ile yapılan boyamalar sonucunda, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan olgularda CD56'nın kontrol grubuna göre daha fazla, CD98'in ise kontrol grubuna göre daha az eksprese edildiği saptanmıştır.

Çalışma grubu ve kontrol grubu IVF tedavisi parameteleri açısından homojen olarak seçilmiştir. Bu retrospektif verilerde hasta seçiminde kötü over rezervi ve ileri yaş dışlanmıştır. Her iki grubun benzerliğinin en iyi göstergesi de adetli dönemde bakılan ve over rezervini en iyi değerlendiren antral follikül sayılarının her iki grupta aynı olmasıdır. Parametreler arasında toplamda transfer edilen embriyo sayısı ve 3. gün FSH düzeyi dışında istatistiksel anlamlı fark olmaması bunu göstermektedir. Toplamda transfer edilen embriyo sayısının birbirinden farklı olması zaten istenen bir bulgudur. 3. gün FSH düzeyleri arasında fark çıkmış olsa da dikkat edilecek olursa bu hastaların antral folikül sayıları ve tedavi süreci sonunda elde edilen metafaz II oosit sayılarının benzer olması bu hastalarda klinik olarak bir fark olmadığını göstermektedir.

CD98 ile ilgili bilgiler sınırlı miktardadır ve güncel olarak elimize ulaşmaktadır. Dominguez ve arkadaşlarının iki farklı hücre kültürü üzerinde yaptığı çalışmada CD98 implantasyonun adezyon safhası ile yakından ilişkili bulunmuş ve CD98 plazma membranı ekspresyonunun %30 kadar azaltılması blastokist adezyonunda belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [55]. Bu çalışmada da tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grupta CD98 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı izlenmekte olup bu bulgunun Dominguez ve arkadaşlarının belirttiği gibi adezyon safhasının sekteye uğramasına ikincil sonucun klinik yansıması olarak kabul edilebilir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile tekrarlayan gebelik kayıplarını aynı patogeneze sahip değişik süreçler olarak tanımlayan otörler bulunmaktadır. Özellikle CD56 için yapılan ilk

araştırmaların gebelik kayıplarına yönelik olması, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı çalışmalarının bu temele oturtulmasını sağlamıştır. Quenby ve arkadaşlarının öncülük ettiği bu çalışmalarda ilgili gruplardan alınan örneklerde CD56 düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanmış olsa da bu hücrelerin tekrarlayan gebelik kayıplarındaki olası rolleri henüz aydınlatılamamıştır [61, 62]. İmplantasyon evresi dönemini kapsayan bu çalışmamızda, yine CD56 düzeyinin çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek saptanması, patogeneizde gebelik kayıpları ile benzer bir mekanizmanın paylaşıldığı fikrini doğrulamaktadır. Quenby ve arkadaşlarının patogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmasında uNK hücrelerinin artışı ile endometrial kan damarı ve lenfatik damar oluşumu, endometriyal ödem oluşumu arasında korelasyon saptanmış olup bu mekanizmanın implantasyon döneminde maternal kan sirkulasyonunu arttırarak oksidatif stress miktarını arttırdığı ve implantasyon başarısızlığına yol açtığı öngörölmüştür [59].

Bu çalışmada elde edilen sonuçları destekleyen immünohistokimyasal teknik ile hazırlanmış birçok çalışma bulunmaktadır [64, 67]. Sadece Matteo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CD56+ hücrelerin düzeyi açısından, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan grup ve kontrol gurubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır [68]. Bu araştırmada CD56 düzeyleri akım sitometrisi ile değerlendirilmiş olup bu işlem sırasında sadece endometrial stromal CD56+ hücreler değil, dokuların parçalanarak akım sitometrisi uygulanmasını takiben damar yapıları içerisindeki CD56+ hücreler de sayıma dahil olmuş olabileceğinden böyle bir sonuç ıkımış olduğu düşünölmektedir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığını etkileyen faktörlere daha önce değinilmiştir ve bu faktörlerin tedavisine yönelik girişimler birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir. Uterin anatomik faktörlerin başında endometriyal polipler, septum, hidrosalpinks gibi etmenler gelmektedir. Polipler ile ilgili yapılan bir çalışmada, poliplerin büyüklüğünün önemi olmadan histeroskopik polipektomi yapılan grupta, yapılmayan gruba göre klinik gebelik oranlarında anlamlı farklılık saptanmıştır [69]. Benzer şekilde 192 hidrosalpinks olan olguda Strandell ve arkadaşları hidrosalpinks olan tüpün alınması ile IVF sikluslarında canlı doğum oranının anlamlı bir şekilde arttığını ortaya koymuştur [70]. Benzer şekilde başarılı bir gebelik elde edilmek isteniyorsa IVF siklusları öncesinde hidrosalpinksin endometriyal kavite ile bağlantısının kesilmesinin gerekliliği konusunda ölkemizden de önemli yayınlar bulunmaktadır [71]. Bu

gelişmeler ışığında özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgularda cerrahi müdahale önerilmektedir. Bu çalışmaya seçtiğimiz hastaların tamamına histeroskopi yapılmış olup, herhangi bir patolojik oluşum saptanmayanlar dahil edilmiştir. Bu seçim kriteri ile polip, adezyon ve septum varlığının implantasyon başarısızlığına olan olası etkileri önlenmek istenmiştir.

Tüm hastalara histeroskopi yapmak hem ekonomik açıdan oldukça maliyetli hem de invazif bir tanı ve tedavi metodudur. Sadece histeroskopi ile tanı konulan hastaların seçimi bu çalışmanın güçsüz bir tarafı olan hasta sayısının azlığını ortaya çıkarmıştır. Hasta sayısının az olmasını sağlayan en önemli etmenlerden biri de hastaların seçimindeki yaş kriteri olmuştur. Bilindiği gibi ilerleyen yaş ile embriyolarda kromozomal anomali ve gen mutasyonları saptanma riski artmaktadır. Goodman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kodon 72 de saptanan p53 proteininin arjinin ve prolin aminoasitleri açısından homozigotik ve heterozigotik genotipe sahip olması tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve kontrol grubu arasında farklı saptanmıştır [72]. Benzer etkileri çalışma dışarısında tutabilmek amacı ile çalışmaya yaş sınırlaması getirilmiştir ki; hasta sayısını önemli ölçüde azaltmıştır.

Histeroskopi yapılan hastalarda veya alınan endometriyal biyopsilerde rastlantısal olarak saptanan endometrit bulgusu tekrarlayan implantasyon başarısızlığında önemli bir faktördür. Johnston-MacAnanny ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı saptanan olguların %30 kadarında kronik endometrit saptanmış olup kronik endometrit saptanan grubundaki implantasyon oranı kontrol grubuna göre daha düşük saptanmıştır [73]. Bu çalışmamızda NK hücreler ile ilgili verilerde yanlılık olmaması açısından biyopsi materyalinde endometrit saptanan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

Kötü over rezervi ve implantasyon başarısızlığı arasında yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bazı otörlerce kötü over rezervi ve embriyo kalitesindeki düşüş birbirleri ile paralel gitmektedir. İyi kalitede embriyo üretememnin bile infertil bir hastada tek başına tekrarlayan implantasyon başarısızlığına neden olabileceğini öne sürenler bulunmaktadır. Tabiki ileri yaş da bu faktöre katkıda bulunmaktadır. Opsahl ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada kötü over rezervi ve FSH yüksekliği olan hastalara donör oosit ile geliştirilen embriyoları transfer etmiş ancak klinik

gebelik elde edememiştir [74]. Ata ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kötü over rezervi olgularında naturel siklus IVF denemesinin diğer protokollere göre daha uygun olacağı sonucuna varmışlardır [75]. Bu sonuçlardan kötü over rezervi olan hastalarda implantasyon için uygun bir endometriyum varlığı olmadığı öne sürülebilir.

Trombofili varlığının tekrarlayan implantasyon başarısızlığına olan olası katkısı araştırılmaktadır. Qublan ve arkadaşları 83 adet tekrarlayan implantasyon başarısızlığı tanısı olan hastaya düşük molekül ağırlıklı heparin uygulamışlar ve plaseboya göre implantasyon ve gebelik oranlarında anlamlı bir yükseklik yakalamışlardır [76]. Bu sonuçlar Stern ve arkadaşlarının anti nükleer antikor ve anti fosfolipid antikorları yüksek olan hasta grubunda yaptığı çalışmada desteklenmemektedir. İmplantasyon ve gebelik oranları arasında fark saptanmamıştır [46]. Bu çalışmada trombofilinin implantasyon başarısına olası etkisi gözardı edilmiş olup hastaların kullandığı trombofili tedavileri çalışma dışında tutulmuştur.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının tedavisinde NK hücrelerine yönelik girişimler denenmiştir. Würfel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada G-CSF kullanılarak tekrarlayan implantasyon başarısızlığı hastalarında gebelik oranlarını arttırdığını belirtmiş olup, gebelik oranını embriyo transferi gününde tek doz 300µg G-CSF kullanan grupta %43 plasebo grubunda %20 olarak belirtmiştir [77]. NK hücrelerine özgül Schlahsa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, G-CSF stimülasyonunu takiben NK hücre sıklığında belirgin bir azalma saptanmıştır [78]. G-CSF ile ilgili sonuçlar bu çalışmamızda belirttiğimiz CD56 yüksekliğinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile ilişkili olduğu sonucu ile birleştirilirse prospektif kontrollü çalışmalara yol açılacaktır.

Bu çalışmanın retrospektif olarak değerlendirilmesi çalışmanın güçsüz tarafını oluşturmaktadır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı grubunda CD56 açısından saptanan sonuçların literatüre uygunluk göstermesi klinik değerlendirmenin ve diğer faktörlerden arındırılmış hasta seçiminin doğru yapıldığını göstermektedir. İmplantasyon evresindeki endometriyumun fonksiyonel olarak CD98 ve CD56 benzeri markırlar üzerinden değerlendirilmesi güncelliğini kaybetmeyen bir konu olup araştırmaya açıktır. Bu ve benzeri çalışmaların daha büyük gruplar ile ve prospektif olarak desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır; ancak ülkemizde IVF komplikasyonlarını azaltmak amacı

ile tek embriyo transferi uygulamasının olduğu dönemimizde, implantasyon başarısızlığı ile ilgili özellikle prospektif ve yeterli sayıda hasta popülasyonuna sahip bir çalışma yapmak giderek zorlaşmaktadır.

CD56 ile endometriyum değerlendirilmesinin yavaş yavaş IVF hastalarında klinik kullanıma girmesi, diğer immünohistokimyasal markırların önünü açacaktır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre biz de CD98'in ileriki dönemde klinikte kullanılabilecek bir implantasyon markırı olacağı görüşündeyiz.



6. KAYNAKLAR

1. Enders AC, S.S., *A morphological analysis of the early implantation stages in the rat.* . Am J Anat, 1967. **120**: p. 185-226.
2. Enders AC, S.S., *Cytological aspects of trophoblastuterine interaction in early implantation.* Am J Anat, 1969. **125**: p. 1-29.
3. Nyboe Andersen, A., et al., *Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).* Hum Reprod, 2009. **24**(6): p. 1267-87.
4. de los Santos, M.J., et al., *Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture.* Placenta, 2003. **24 Suppl B**: p. S13-9.
5. Cicek MN, M.M., *Klinikte Obstetrik ve Jinekoloji.* 2007.
6. Martin, J., et al., *Human endometrial receptivity: gene regulation.* J Reprod Immunol, 2002. **55**(1-2): p. 131-9.
7. Dimitriadis, E., et al., *Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation.* Hum Reprod Update, 2005. **11**(6): p. 613-30.
8. RG, E., *Physiological and molecular aspect of implantation.* Human Reproduction, 1995. **10**: p. 1-13.
9. Nikas G, D.P., Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, and P.A. Michalas S, *Uterine pinopodes as markers of the nidation window in cyclic women receiving exogenous oestradiol and progesterone.* Human Reproduction, 1995. **10**: p. 1208-1213.
10. Bagot, C.N., H.J. Kliman, and H.S. Taylor, *Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation.* Dev Dyn, 2001. **222**(3): p. 538-44.
11. Johannisson, E., et al., *Endometrial morphology and peripheral hormone levels in women with regular menstrual cycles.* Fertil Steril, 1987. **48**(3): p. 401-8.
12. Chen, Q.J., et al., *Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin beta3 and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase.* Fertil Steril, 2008. **89**(5 Suppl): p. 1357-63.
13. Chen, Q.J., et al., *Effects of ovarian high response on implantation and pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation (with GnRH agonist and rFSH).* Acta Obstet Gynecol Scand, 2007. **86**(7): p. 849-54.
14. Lutjen, P., et al., *The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure.* Nature, 1984. **307**(5947): p. 174-5.
15. Rider, V., et al., *Anti-fertility effect of passive immunization against progesterone is influenced by genotype.* J Endocrinol, 1986. **108**(1): p. 117-21.
16. Gemzell-Danielsson, K., et al., *Early luteal phase treatment with mifepristone (RU 486) for fertility regulation.* Hum Reprod, 1993. **8**(6): p. 870-3.
17. Swahn, M.L., K. Gemzell, and M. Bygdeman, *Contraception with mifepristone.* Lancet, 1991. **338**(8772): p. 942-3.
18. Kumar, S., et al., *Progesterone induces calcitonin expression in the baboon endometrium within the window of uterine receptivity.* Biol Reprod, 2003. **68**(4): p. 1318-23.
19. Tabibzadeh, S., Q.F. Kong, and A. Babaknia, *Expression of adhesion molecules in human endometrial vasculature throughout the menstrual cycle.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(4): p. 1024-32.

20. Apparao, K.B., et al., *Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4991-5000.
21. Lessey, B.A., *Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 809-15.
22. Grosskinsky, C.M., et al., *Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(6): p. 2047-54.
23. Genbacev, O.D., et al., *Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface*. Science, 2003. **299**(5605): p. 405-8.
24. Jabbour, H.N. and K.J. Sales, *Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(8): p. 398-404.
25. Gemzell-Danielsson, K. and M. Hamberg, *The effect of antiprogesterin (RU 486) and prostaglandin biosynthesis inhibitor (naproxen) on uterine fluid prostaglandin F2 alpha concentrations*. Hum Reprod, 1994. **9**(9): p. 1626-30.
26. Song, H., et al., *Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development*. Development, 2002. **129**(12): p. 2879-89.
27. Ye, X., et al., *LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 104-8.
28. Catalanotti, J.S., et al., *Mouse ascites Golgi mucin expression abnormalities in natural cycle endometrial biopsies predict subsequent in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) failure in patients with previous IVF-ET failures*. Fertil Steril, 2006. **85**(1): p. 255-8.
29. Suzuki, Y., et al., *Clinical applications of serum placental protein 14 (PP14) measurement in the IVF-ET cycle*. J Obstet Gynaecol Res, 2000. **26**(4): p. 295-302.
30. Simon, C., et al., *Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(8): p. 2607-16.
31. Guzeloglu-Kayisli, O., U.A. Kayisli, and H.S. Taylor, *The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(1): p. 62-79.
32. Stewart, C.L., *The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **734**: p. 157-65.
33. Dimitriadis E, N.G., Hannan N, Paiva P, Salamonsen LA, *Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface*. Int J Dev Biol, 2010. **54**: p. 313-322.
34. Brinsden PR, N.G., Engrand P, Pinkstone S, Lancaster S, Macnamee MC, De Moustier B, *Does recombinant leukemia inhibitory factor improve implantation in women with recurrent failure of assisted reproduction treatment?*, in ESHRE Annual Meeting. 2003: Madrid, Spain.
35. Tabibzadeh, S., et al., *Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window*. Hum Reprod, 1995. **10**(10): p. 2793-9.
36. Tabibzadeh, S. and A. Babaknia, *The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion*. Hum Reprod, 1995. **10**(6): p. 1579-602.
37. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
38. Lim, K.J., et al., *The role of T-helper cytokines in human reproduction*. Fertil Steril, 2000. **73**(1): p. 136-42.
39. Nardo, L.G., et al., *Pinopode expression during human implantation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **101**(2): p. 104-8.

40. Birdsall, M.A., et al., *Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(1): p. 31-4.
41. Hang, L., et al., *Cytokine repertoire of epithelial cells lining the human urinary tract*. J Urol, 1998. **159**(6): p. 2185-92.
42. Taranissi, M., et al., *Influence of maternal age on the outcome of PGD for aneuploidy screening in patients with recurrent implantation failure*. Reprod Biomed Online, 2005. **10**(5): p. 628-32.
43. Heijnen, E.M., et al., *A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(1): p. 13-21.
44. Tang, T., et al., *The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment*. Hum Reprod, 2006. **21**(6): p. 1416-25.
45. Empson M, L.M., Craig J, Scott J, *Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant*. Cochrane Database Syst Rev, 2005. **CD002859**.
46. Stern, C., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies*. Fertil Steril, 2003. **80**(2): p. 376-83.
47. Ng, S.C., et al., *Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2002. **48**(2): p. 77-86.
48. Johnson, N.P., W. Mak, and M.C. Sowter, *Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(3): p. CD002125.
49. Maubon, A., et al., *Uterine junctional zone at magnetic resonance imaging: a predictor of in vitro fertilization implantation failure*. J Obstet Gynaecol Res, 2010. **36**(3): p. 611-8.
50. Chillaron, J., et al., *Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(6): p. F995-1018.
51. Tsurudome, M. and Y. Ito, *Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(3): p. 167-96.
52. Fenczik, C.A., et al., *Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 81-5.
53. Tsumura, H., et al., *The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 847-51.
54. Stephens, L.E., et al., *Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1883-95.
55. Dominguez, F., et al., *Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13380.
56. Henderson, T.A., et al., *Steroid receptor expression in uterine natural killer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 440-9.
57. Bulmer, J., *Cellular constituents of human endometrium in the menstrual cycle and early pregnancy*. . Reproductive Immunology. 1996: Reproductive Immunology. Blackwell Science, Oxford, .
58. Beer, A.E., J.Y. Kwak, and J.E. Ruiz, *Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles*. Am J Reprod Immunol, 1996. **35**(4): p. 376-82.
59. Quenby, S., et al., *Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure*. Hum Reprod, 2009. **24**(1): p. 45-54.
60. Ledee-Bataille, N., et al., *Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure*. Fertil Steril, 2005. **83**(3): p. 598-605.

61. Tuckerman, E., et al., *Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage*. Hum Reprod, 2007. **22**(8): p. 2208-13.
62. Quenby, S., et al., *Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage*. Hum Reprod, 1999. **14**(9): p. 2386-91.
63. Zabinska-Popiela, M., et al., *[Comparative analysis of CD56 lymphocytes and CD69 antigen expression in endometrium during decidualization]*. Przegl Lek, 2006. **63**(4): p. 176-8.
64. Tuckerman, E., et al., *Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF*. J Reprod Immunol, 2010. **87**(1-2): p. 60-6.
65. Noyes RW, H.A., Rock JR, *Dating the endometrial biopsy*. Fertil Steril, 1950. **1**: p. 3-25.
66. Hardarson, T., et al., *Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation*. Hum Reprod, 2001. **16**(2): p. 313-8.
67. Lukassen, H.G., et al., *Hormonal stimulation for IVF treatment positively affects the CD56bright/CD56dim NK cell ratio of the endometrium during the window of implantation*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(7): p. 513-20.
68. Matteo, M.G., et al., *Normal percentage of CD56bright natural killer cells in young patients with a history of repeated unexplained implantation failure after in vitro fertilization cycles*. Fertil Steril, 2007. **88**(4): p. 990-3.
69. Perez-Medina, T., et al., *Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study*. Hum Reprod, 2005. **20**(6): p. 1632-5.
70. Strandell, A., et al., *Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2762-9.
71. Zeyneloglu, H.B., *Hydrosalpinx and assisted reproduction: options and rationale for treatment*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2001. **13**(3): p. 281-6.
72. Goodman, C., R.S. Jeyendran, and C.B. Coulam, *P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure*. Fertil Steril, 2009. **92**(2): p. 494-8.
73. Johnston-MacAnanny, E.B., et al., *Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2010. **93**(2): p. 437-41.
74. Opsahl, M.S., et al., *Donor oocyte cytoplasmic transfer did not enhance implantation of embryos of women with poor ovarian reserve*. J Assist Reprod Genet, 2002. **19**(3): p. 113-7.
75. Ata, B., et al., *Embryo implantation rates in natural and stimulated assisted reproduction treatment cycles in poor responders*. Reprod Biomed Online, 2008. **17**(2): p. 207-12.
76. Qublan, H., et al., *Low-molecular-weight heparin in the treatment of recurrent IVF-ET failure and thrombophilia: a prospective randomized placebo-controlled trial*. Hum Fertil (Camb), 2008. **11**(4): p. 246-53.
77. Wurfel, W., et al., *[Improving treatment outcome by LeukoNorm Cytochemia in patients with multiple, failed IVF or ICSI treatment cycles]*. Zentralbl Gynakol, 2001. **123**(6): p. 361-5.
78. Schlahsa, L., et al., *Granulocyte-colony-stimulatory factor: a strong inhibitor of natural killer cell function*. Transfusion, 2011. **51**(2): p. 293-305.