

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**İNCE ENDOMETRİUM TEDAVİSİNDE GRANULOSİT
KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖR(G-CSF)'ÜN RATLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. GİZEM IŞIK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MESUT ÖKTEM

ANKARA
AĞUSTOS 2016

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**İNCE ENDOMETRİUM TEDAVİSİNDE GRANULOSİT
KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖR(G-CSF)'ÜN RATLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. GİZEM IŞIK

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MESUT ÖKTEM

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01.2011/01 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
AĞUSTOS 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	iii
KISALTMALAR	iv
TABLolar.....	v
ŞEKİLLER	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnfertilite	3
2.1.1 Kadın İnfertilitesi	4
2.1.2.IVF tedavisinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı.....	8
2.2. İmplantasyon ve Endometrial Reseptivite	9
2.2.3. İnce Endometrium Tedavisi	14
2.3. Granülosit Koloni Stimüle edici Faktör(G-CSF) ve Reseptörü(G-CSF-R) 18	
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. Hayvan Deneyi Protokolü.....	20
3.1.1. İnce Endometrium’lu Grup 1(Deney Grubu: İnce Endometrium+G-CSF)	20
3.1.2. İnce Endometrium’lu Grup 2 (Kontrol Grubu: İnce Endometrium+ Serum fizyolojik)	21
3.1.4. Normal Endometrium ile Grup 4(Normal Endometrium + Serum Fizyolojik).....	22
3.2. Uterus Duvar Kalınlığı ve Endometrium Kalınlığının Değerlendirilmesi .	23
3.2.1 Histokimyasal Takip ve Yöntem.....	23
3.2.2. Masson’s Trikrom Üçlü Boyama Yöntemi:.....	24
3.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem	25

3.2.4. TUNEL yöntemi	26
3.3. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Uterus Duvar Kalınlığı ve Endometrium Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	29
4.2. Mason Trikrom Boya Bulguları.....	33
4.3. Fibronektin Bulguları.....	34
4.4. TUNEL Bulguları	35
4.5. PCNA Bulguları.....	37
4.6. VEGFR2 Bulguları	38
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ	48
7. KAYNAKLAR.....	50
8. ÖZET	61
9. SUMMARY	62
10. EKLER	63
10.1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı	63
11. ÖZGEÇMİŞ.....	64

TEŞEKKÜRLER

Asistanlık hayatım boyunca bilgi ve birikimlerini esirgemeyen, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mesut ÖKTEM'e, bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Anıl ONAN'a, gönül bağımın baki kalacağını bildiğim tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük emekleri olan Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, ve Arş Gör. Dr. Sanem SARIBAŞ'a teşekkür ederim.

5.5 yıllık asistanlık dönemimde birlikte çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma, şuan Gazi'de olmayan eğitimimde etkileri büyük olan benim için hep birer abi ve abla olarak kalacak uzmanlarımıza teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın tüm zor günlerinde hep yanımda olan, tam destekle hep varlıklarını hissettiğim canım ailem; annem Nurşen Işık'a, ablam Selen Adiloğlu'na ve abim İlgar Adiloğlu'na teşekkür ederim.

KISALTMALAR

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

IVF: İn vitro fertilizasyon

G-CSF: Granulosit koloni stimule edici faktör

G-CSFR: Granulosit koloni stimule edici faktör reseptörü

WOI: Window of Implantation

IGFBP-1: İnsulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1

MMPs: Matriks metalloproteinazlar

TGFβ: Transforming büyüme faktörü β

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

VEGFR: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü

NK: Natural Killer

LIF: Lökemi İnhibitör Faktör

H&E: hematoksilin, eozin

PBS: Phosphate Buffer Saline

DAB: Diaminobenzedin

PCNA: proliferation cell nuclear antigen

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl tranferase dUTP nick end labelly

TABLÖLAR

Tablo 1 İnfertilite Nedenleri.....	3
Tablo 2. Endometrial implantasyonda rol oynayan Faktörler.....	10
Tablo 3.Embryo İmplantasyon Modeli	17
Tablo 4.Endometrial duvar kalınlıkları ve uterus duvar kalınlıkları karşılaştırmaları.....	32
Tablo 5.İmmunohistokimyasal boyama kalitatif karşılaştırmaları.....	41

ŞEKİLLER

Şekil 1: Embryo-endometriyal implantasyon modeli: moleküler düzeyde.....	11
Şekil2: Embryo-endometriyal implantasyon modeli.....	12
Şekil3,4,5,6: Rat deney gruplarında endometriyal kollojen lif dağılımı.....	33
Şekil7,8,9,10: Rat deney gruplarında endometriyal fibronektin tutulumu.....	34
Şekil11,12,13,14: Rat deney gruplarında endometriyal TUNEL pozitif hücreler.....	36
Şekil15,16,17,18: Rat deney gruplarında endometriyal PCNA pozitif hücreler.....	38
Şekil 19,20,21,22: Rat deney gruplarında endometriyal VEGFR2 tutulumu.....	39

1. GİRİŞ

Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ine infertilite tanısı konmaktadır.

İnfertilite tedavisinde son basamağı Yardımcı Üreme Teknikleri(YÜT), İn vitro fertilizasyon(IVF) oluşturmaktadır. IVF hastalarında yeterli endometrial kalınlık gebelik başarısı için önemlidir.

Sağlıklı bir gebelik gelişimi için uygun zigotun gelişmesinin yanı sıra zigotun uterin kaviteye ulaşması ve düzgün implantasyonu önemlidir. İmplantasyon için endometriumun sekretuar fazda olmasının yanı sıra progesteron varlığı, hücrelerin glikojen ve lipidden zengin olması, endometrial kalınlığın 10-14mm civarında olması ve birçok hormonal ve biyokimyasal faktör gereklidir[1].

Endometrial reseptivite modellerinin çalışılması, açıklanamayan infertilite ve gebelik kayıpları nedenlerinin anlaşılması için yararlıdır. Endometrial kalınlık reseptivite için önemli bir belirteçtir, bir çok çalışmada endometriyal kalınlık ve implantasyon oranları değerlendirilmiştir. Folliküler fazda transvajinal ultrasonografi ile yapılan ölçümlerle endometrial kalınlık kararı verilmektedir. İnce endometrium sınırlarını belirleyen kesin konsensus bulunmamakla birlikte ince endometrium kabul etmek için folliküler fazda yapılan ölçümlerde endometriumun 7 mm altı olması genel kabul görmektedir[2].

İnce endometriuma sahip tekrarlayan IVF başarısızlıkları olan hastalarda endometrial kalınlığı arttırmak için olanaklar kısıtlıdır. İmplantasyon

başarısızlıkları IVF'in en önemli kısıtlayıcı basamaklarından[3]. İmplantasyon mekanizmasında rol oynayan belirteçler aydınlatılmadıkça implantasyon başarısızlığında optimal tedavi sağlanamamaktadır

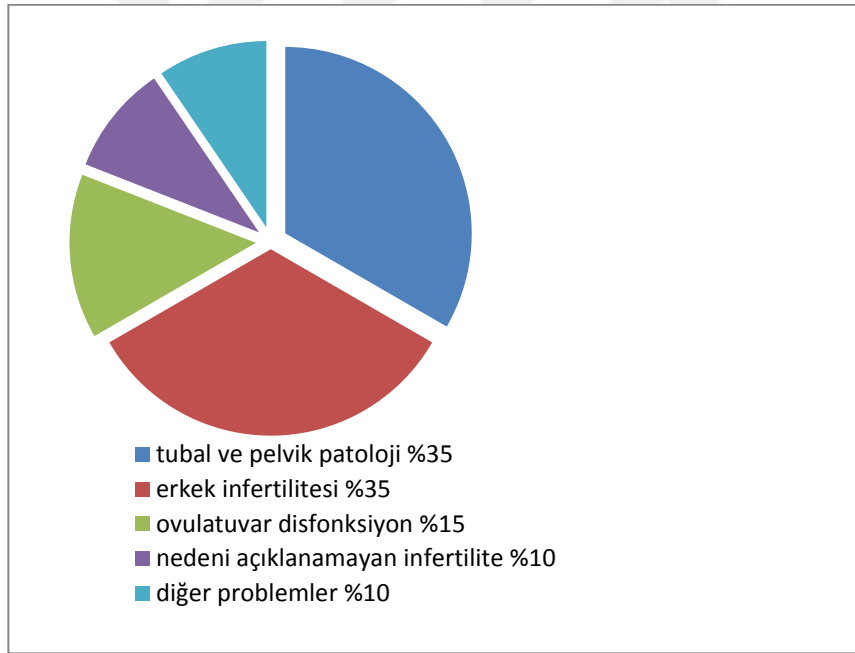
Günümüzde yapılan klinik çalışmalarda IVF tedavisi altındaki endometrial kalınlık 7mm altında olan hastalara subkutan ya da intravajinal granulosit koloni stimule edici faktör(G-CSF) uygulanmakta ve gebelik oranlarının arttığı izlenmektedir.[4] Yapılan çalışmalarda G-CSF uygulamasının endometrial kalınlığı arttırdığı izlenmektedir. Zamanlaması ve uygulama şekli için daha fazla çalışma yapılması gerektiği belirtilmektedir. Zhao ve arkadaşları yaptıkları hayvan deneyi çalışmasında subkutan olarak uyguladıkları G-CSF'in endometrial kalınlığı arttırdığını göstermişlerdir.[5]

Bu çalışmada rat modellerinde ince endometrium oluşturarak uygulanan G-CSF ile endometriyal kavitede meydana gelen histopatolojik değişiklikler değerlendirildi. Aynı uygulama ince endometrium oluşturulmayan rat grubunda da değerlendirildi. Amaç G-CSF uygulamasının etkilerini histolojik olarak değerlendirerek tedavinin başarı oranına objektif bir bakış açısı getirmektir. Bu nedenle çalışma 24 rat üzerinde yapılmış olan kontrollü hayvan deneyi olarak dizayn edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

35 yaş altında olan kadınlarda korunmasız bir yıl boyunca, 35 yaş üzerinde korunmasız 6 y süresince düzenli ilişkiye rağmen gebe kalınmaması infertilite olarak tanımlanır. [6] Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ine infertilite tanısı konmaktadır. İnfertilite nedenlerinin %35'ini tubal pelvik patolojiler oluşturmaktadır, %35'inde erkek infertilitesi izlenmektedir, %10 hastada açıklanamayan infertilite izlenmektedir(tablo 2). [1]



Tablo 1 İnfertilite Nedenleri

İnfertilite tanı ve tedavi aşamasında çiftlerin birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Bir yıldan uzun süredir korunmasız ilişkiye rağmen gebelik olmayan çiftlerde değerlendirilme önerilmelidir. Menstrual siklusları düzensiz olan, pelvik enfeksiyon, endometriyozis öyküsü olan, pelvik cerrahi geçiren, erken menapoz

aile öyküsü olan, pelvik radyasyon öyküsü gibi fertilitiyi olumsuz etkileyecek hikayesi bulunan hastalarda ve erkek faktörü kötü sperm kalitesi, testiküler travma, geçirilmiş ateşli hastalık ve diğer cinsel işlev bozukluğu hikayesi olan hastalarda değerlendirilmesi erken başlatılmalıdır [7]

2.1.1 Kadın İnfertilitesi

İnfertil çiftlerde %35 erkek infertilitesi neden iken %35 tubal ve pelvik patolojiler, %15 ovulatuvar disfonksiyon izlenir, servikal ve uterine patolojiler infertilitenin nadir nedenleridir, %10 hastada ise herhangi bir neden izlenememektedir.[1]

Kadın faktörünün değerlendirilmesinde kapsamlı hikaye alınması, fizik muayene yapılması, hormon testleri yapılması, görüntüleme yöntemleri ile değerlendirme ve gerek görüldüğü durumda genetik testlerin yapılması önemlidir.

2.1.1.1. Kadın İnfertilitesi Nedenleri

2.1.1.1.1 Ovulatuvar Faktör

İnfertil çiftlerde %15 ovulatuvar disfonksiyon izlenmektedir, kadın infertilite nedenlerine tek başına bakıldığında ovulatuvar disfonksiyon %40 oranında izlenir. [7]

Ovulatuvar disfonksiyon oligoovulasyon ya da anovulasyon olarak izlenebilmektedir, bu da kliniğe irregüler menstrual siklus bozuklukları (oligomenore) veya amenore olarak yansımaktadır. Tiroid hastalıkları, hiperprolaktinemi, hipofizer ve ovaryen tümörler, yeme bozuklukları, aşırı egzersiz, kilo kayıpları, polikistik over sendromu ve obezite anovulasyon ile ilişkili bulunmuştur.[8]

Yaş oosit rezervi için önemli faktördür. Yaşla birlikte oositlerin hem sayısında hem de kalitesinde azalma izlenmektedir. 30'lu yaşlardan sonra siklus başına follikül kayıp oranı hızla artmaktadır.[9] Sigara içmek, radyasyon, kemoterapi, otoimmün hastalıklar follikül kaybını arttıran diğer faktörlerdir.[10]

Over rezervi, biyokimyasal ve ultrasonografik belirteçlerle belirlenebilir. Biyokimyasal olarak bazal serum folliküler stimulan hormon (FSH), bazal estradiol (E2), bazal Anti-Mülleryen Hormon testleri kullanılmaktadır. Dinamik biyokimyasal testlerde bulunmaktadır; bunlar Klomifen Sitrat Challenge testi , Gonadotropin releasing hormon agonisti Stimulasyon Testi(GAST), Eksojen FSH Overyan Rezerv Testi(EFORT)dur. Ultrasonografik belirteçler olarak antral follikül sayısı, over volümü, ovaryan stromal kan akımı kullanılabilir.[11]

Anovulasyon sebepleri ve over rezervi değerlendirildikten sonra sebebe yönelik ve hastanın kliniğine yönelik uygun tedavi protokolleri oluşturulabilmektedir.

2.1.1.1.2. Tubal ve Pelvik Patolojiler

İnfertilite nedenlerinin %35'ini tubal pelvik patolojiler oluşturmaktadır. Kadın infertilitesinin de yaklaşık %40'ından sorumludur. Tubal ve Pelvik patoloji alt başlıkları arasında Konjenital uterin malformasyonlar, leiomyomlar, intrauterin adezyonlar, endometrial polipler, kronik endometrium, tubal tıkanıklık ve adneksiyal adezyonlar sayılmaktadır. Tubal tıkanıklık ve adneksiyal adezyonların nedenleri geçirilmiş rüptüre apandisit, ektopik gebelik, septik abortus, pelvik tüberküloz, pelvik veya tubal cerrahi, pelvik inflamatuvar hastalık (PID) veya endometriyozis sonrası gelişen peritubal-periovaryen adezyonlar, tubal obstruksiyonlardır. [12]

İnfertil kadınlarda tubo-peritoneal patolojilerin değerlendirilmesinde histerosalpingografi (HSG), selektif salpingografi, sonohisterografi, histereskopi, laparoskopi yöntemleri kullanılmaktadır.[1]

Tubal patolojilerin tedavisinde de en uygun yaklaşım laparoskopidir; ancak cerrahi yaklaşım endikasyonları giderek azalmaktadır, tedavide YÜT kullanılmaktadır. IVF başarısını arttırmak amacı ile pelvik adezyolizis ve hidrosalpenks varlığında salpenjektomi başarı oranlarını arttırmaktadır.[13]

Kadın infertilitesinin %2-5'ini uterin malformasyonlar, leiomyomlar, adenomyozis, intrauterin adezyonlar, kronik endometrit ve polipler oluşturmaktadır. Uterin patolojilerde infertilite mekanizması implantasyonun engellenmesidir. Bu patolojiler infertilite artışı yanı sıra 1.-2. trimester abortuslarında da etken oluşturmaktadır. Bu anomalilerin tespit edilmesi ve

tedavilerinin düzenlenmesi gebelik oranlarında artış oluşmasını sağlamaktadır.[14] Konjenital anomaliler arasında en sık izlenmekte olan septat uterus olmakla birlikte parsiyel agenezi,hipoplaziler, unikornuat uterus, uterus didelfis, arkuat uterus, deetilstilbestrol (DES) maruziyeti de konjenital uterin anomaliler arasında sayılmaktadır. Septat uterus infertilite ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkisi en fazla olan anomalidir ve düzeltilmesi gebelik prognozlarını %75'lere kadar olumlu yönde etkilemektedir.[15]

Normal midsiklusta servikal mukus sperm transportunu kolaylaştırmaktadır. Mukusun reseptivitesi hormonal ve biyokimyasal yapısı bozuk olduğu zaman tanısı konulmаса da servikal faktör nedenli infertilite oluşmaktadır ve tedavisinde YÜT kullanılmaktadır. Geçirilmiş servikal travma ya da konjenital nedenlerle servikal stenoz gelişimi de infertilite nedenlerinde servikal faktörler arasında sayılmaktadır.[1]

Bir diğer uterin faktör ise nedeni ve tedavisi tam olarak aydınlatılamamış bu nedenle açıklanamayan infertilite de kısmen konusu geçen endometriyal faktördür, endometriyal kalınlık ve reseptivite infertilite ve tekrarlayan IVF başarısızlıklarında aydınlatılmaya çalışılan üzerinde birçok çalışma yürütülen bir anormalliktir.[16]

2.1.1.1.3. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite nedenlerinin %10'unu oluşturmaktadır. Nedeni belirlenemeyen hastalarda etiolojisinde endokrinolojik, immunolojik, genetik ve üreme fizyolojisi ile ilgisi olan tespit edilemeyen birçok

neden olduğu düşünölmektedir. Açıklanamayan infertilite tanısı alan hastalarda ovulasyon indüksiyonu, intrauterine inseminasyon(IUI), IVF tedavileri ampirik olarak uygulanmaktadır.[17]

2.1.2.IVF tedavisinde Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının tanımı 40 yaşın altında 4'ten az sayıda kaliteli embryo transferi yapılmış en az 3 taze veya donmuş IVF siklus başarısızlığıdır [16]. Konuyla ilgili birçok yayın olmasına rağmen kesin tanı ve tedavi metodları henüz geliştirilememiştir.

İmplantasyon konusunda önceden bahsedildiğı üzere sağlıklı bir gebelik ve implantasyonda birçok faktör rol oynamaktadır. Bu nedenle implantasyon başarısızlığı embryo ve endometriumdan kaynaklanan birçok faktöre bağılı olabilir. Bunlar; maternal yaş, oosit ve embryo kalitesi, immunolojik faktörler, endometriyal reseptivite, luteal faz defektleri, uterine, tubal, peritoneal faktörler, uygulanan IVF stimülasyon protokolleri ve embryo kültür mediumları olarak izlenebilmektedir.[3]

2.1.2.1 Oosit ve Embryo Kalitesi

Embryo kalitesi IVF tedavisinde implantasyon ve gebelik gelişimini belirleyen temel faktörlerdendir.[18] Embryo transfer günü, blastomer sayısı, fragmentasyonu ve nukleasyonu embryo kalitesini belirlemede önemlidir. ESHRE 2011 embryo skorumlama sistemi kullanılmaktadır [19]

Blastokist transferi tekrarlayan implantasyon başarısızlığında kullanılabilir bir yöntemdir. İyi kalitede embryo transferi, blastokist transferi

ile gebelik oranları artarken, daha az sayıda embryo transfer ederek IVF tedavisinin çoğul gebelik komplikasyonu da minumuna indirilmiş olmaktadır.[20]

Embryonun otolog hücrelerle desteklenerek kültüre edilmesi (ko-kültür) embryo kalitesini arttırabilir, tekrarlayan implantasyon başarısızlığında kullanılabilir bir yöntemdir.[21] Preimplantasyon Genetik Tanı (PGD) tekrarlayan implantasyon başarısızlığında kullanılabilir, ancak çok fazla yararı gösterilememektedir.[22]

2.1.2.2 Luteal faz yetmezliği

Yetersiz progesteron konsantrasyonları implantasyon sorunlarına ve erken gebelik kayıplarına neden olmaktadır. Infertil hastalarda luteal faz yetersizliği insidansı 3.5-20% olarak raporlanmıştır.[23] IVF siklusundaki hastalarda luteal faz yetmezliklerinin doğal sıklusa göre daha çok görüldüğü bilinmekte olup etyoloji 30 yıldan uzun süredir tartışılmaktadır. Luteal faz desteği günümüzde IVF tedavisinin rutin bir parçası olarak yapılmaktadır. Çok sayıda çalışma luteal faz desteğinin klinik gebelik oranlarını, canlı doğum oranlarını arttırdığını kanıtlamıştır, ancak destek metodu, verilmiş şekli ve süresi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.2. İmplantasyon ve Endometrial Reseptivite

Başarılı bir embryo implantasyonu için uygun embryo gelişiminin yanı sıra endometrial reseptivite önemlidir. Window of İmplantation”(WOI) olarak tanımlanan ideal implantasyon aralığı menstrual siklusun midluteal fazına

(siklusun 19-23. Günleri) denk gelmektedir.[24]

WOI çalışmalarında implantasyon için prostoglandinler, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri gibi birçok önemli biomarker bulunmuştur(tablo1). İmplantasyon için endometriumun sekretuar fazda olması gerekmektedir. Kalınlık ortalama 10-14 mm aralığında olmalıdır, progesteron varlığı yanı sıra hücrelerin glikojen ve lipidden zengin olması gerekmektedir.[1]

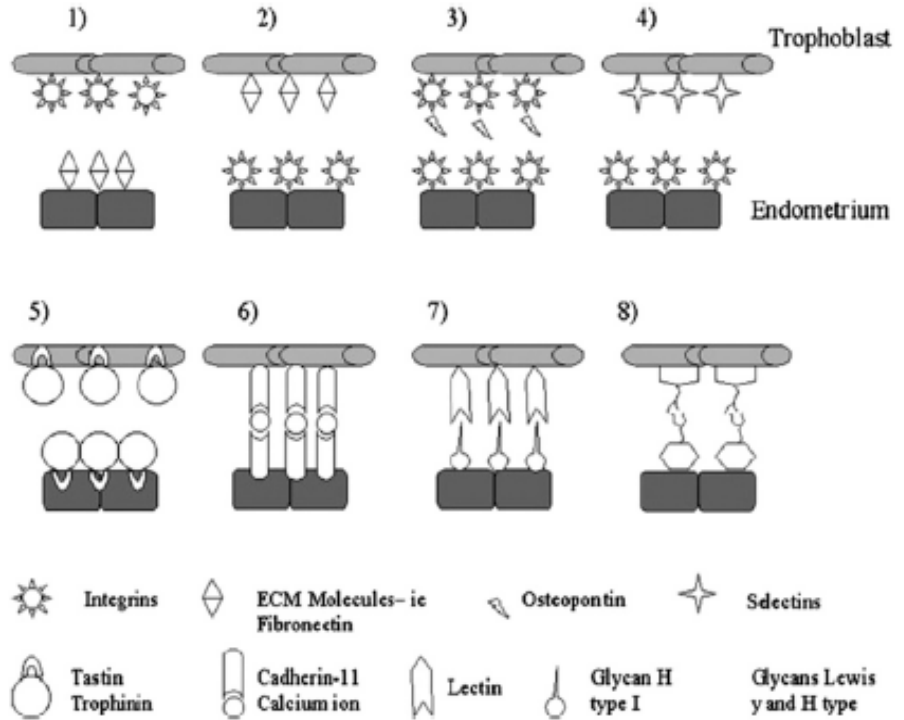
<i>Lipids</i>	<i>Cytokines</i>	<i>Growth Factors</i>
Prostaglandins	Interleukin-1 α	Epidermal growth factor family
Thromboxanes	Interleukin-1 β	EGF
	Interleukin-6	Heparin-binding EGF
	Interleukin-11	TGF- α
	Colony-stimulating factor-1	Insulin-like growth factor family
	Tumor necrosis factor- α	IGF-I
	Leukemia-inhibiting factor	IGF-II
	Interferon- γ	IGFBPs 1–6
		Platelet-derived growth factor
		Transforming growth factor- β
		Fibroblast growth factors
		Vascular endothelial growth factors
		Angiopoietins

Tablo 2. Endometrial implantasyonda rol oynayan Faktörler

Endometriumda epitelyal estrojen ve progesteron reseptörlerinin yanı sıra özellikle integrinlerin önemli rol oynadığı pinopodlar bulunmaktadır (şekil1) [25]. Optimal koşullarda siklus başına maksimum implantasyon oranı %40 olarak kabul edilmektedir.[1] Kompleks implantasyon mekanizmasının aydınlatılması implantasyon başarısızlığı tedavisinde yol almak adına önemlidir.

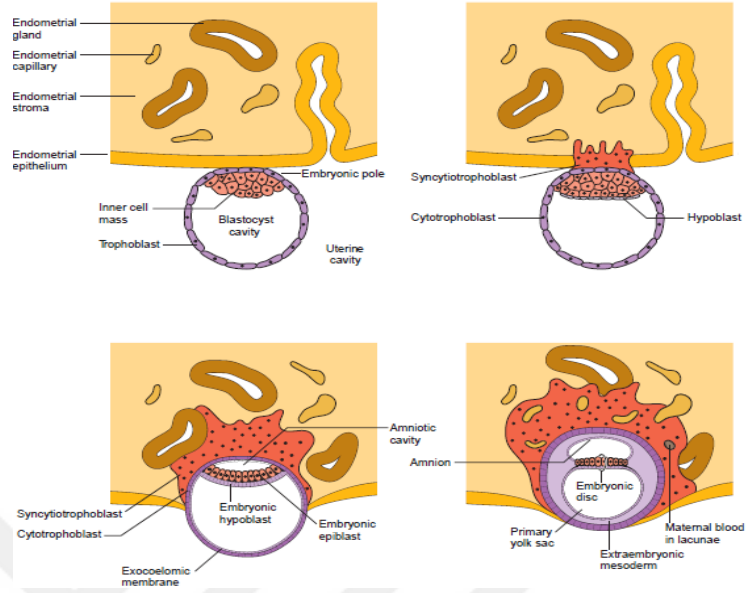
İmplantasyon endometriumun moleküler ve hormonal hazırlıkları sonrası blastokist evresine ulaşmış embryo arasındaki iletişim ile sağlanmaktadır. İmplantasyon ovulasyondan 3-4 gün sonra, embryo endometriyal kaviteye ulaştıktan 2-3 gün sonra, fertilizasyondan 7-8 gün sonra başlar ve 3 aşamada gerçekleşir; 1. Blastokistin endometriuma temas ettiği apozisyon dönemi, 2. Blastokistin endometriuma yapıştığı adezyon dönemi ve 3. Blastokistin trofoblastları ile endometriumun içerisine yerleştiği invazyon dönemidir [26] (şekil 2)

Models of embryo–endometrial attachment. From Donaghy and Lessey (34). Used with permission.



Lessey. Endometrial receptivity. Fertil Steril 2011.

Şekil 1. Embryo- Endometrial implantasyonu Modeli: Moleküler düzeyde



Şekil 2. Embryo İmplantasyon Modeli

Özetle implantasyon ve sağlıklı gebelik için endometrial reseptivite, gebelikte hormonlar ve sitokinlerle oluşan özel endometrium olan desiduanın oluşumu, desidual reaksiyon gelişimi önemlidir[27]

2.2.1 Desidualizasyon ve İmplantasyon Belirteçleri

Desidualizasyon sırasında endometrial yassı fibroblastlar farklılaşır. Ekstrasellüler matrikste Tip 4 kollojen, fibronektin, laminin üretilir, prolaktin, doku faktörü, insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1) gibi desidual protein sekresyonu artar[28]

İnvazyon sırasında ekstrasellöz trofoblastlardan differansiyasyon ve invazyonda rol oynayacak spesifik proteinler salgılanmaktadır.

Bu proteinler; integrin hücre ekstrasellüler matriks antijenleri, matriks metalloproteinazları(MMPs), transforming growth faktörβ (TGFβ), vasküler entoteliyal growth faktör (VEGF), vasküler endoteliyal growth faktör reseptörü (VEGFR), insulin like growth faktör 2 (IGF2) lerdir. [29]

Desidualizasyon trofoblastların invazivleşmesini önleyen fiziksel bariyer de oluşturur ve embryo için maternal antikorlardan koruyucu ortam oluşturur. Trofoblastlar endometrium hücrelerini salgıladıkları kemokinlerle değiştirerek implantasyona uygun lökositlerin baskın hale gelmesini sağlar. İmplantasyon alanında %70 olmak üzere Natural killer hücreleri (NK) hakimdir. Bu hücreler implantasyonda önemli olan lökemi inhibitör faktör (LIF), Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), Granülosit-Makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM- CSF) salgılanmasında rol oynarlar. [30]

Desidual proliferasyon ya da inhibisyon, trofoblastların invazyonu çeşitli integrinler tarafınca belirlenir. İnvazyon aşamasında trofobastik IGF-2 ve desidual IGFBP-1 sekresyonu artarken desidual TGFβ salınımı da inhibe olmaktadır. [31] LIF ve MMP gibi birçok molekül daha trofoblast invazyonu yanı sıra desidual vaskülarizasyon, inflamatuvar süreç oluşumu, maternal immunolojik yanıt oluşmaması adına salınmaktadır.[32] İmplantasyon basamaklarında daha henüz açıklanamamış birçok faktör rol oynamaktadır, infertilite tedavilerinde bu faktörlerin çözülmesi yeni tedavi seçeneklerini beraberinde getirecektir.

2.2.2. İnce Endometrium, Endometriyal reseptivite bozuklukları

Endometrial reseptivite modellerinin çalışılması açıklanamayan infertilite ve gebelik kayıpları nedenlerinin anlaşılması için yararlıdır. IVF hastalarında yeterli endometrial kalınlık gebelik başarısı için önemlidir. Folliküler fazda transvajinal ultrasonografi ile yapılan ölçümlerle endometrial kalınlık kararı verilmektedir. İnce endometrium sınırlarını belirleyen kesin konsensus bulunmamaktadır. Weissman ve ark. Normal endometrium için minimal kalınlığı 7mm kabul etmişlerdir.[2]

Richter ve arkadaşlarının yaptığı diğerk bir çalışmada gebelik oranları endometrium 9mm altında iken %53, endometrium 16mm ve üzerinde olduğunda %77'ye çıkmaktadır.[33] Shapiro ve arkadaşları yaptıkları diğerk bir çalışmada 6mm altını ince endometrium olarak kabul etmişler ancak YÜT sikluslarında minimum kalınlığın 8mm olması gerektiğini belirtmişlerdir. [34]

Endometrial kalınlığın implantasyon için hazırlanmasında hormonların biyokimyasal markerların yanı sıra anjiogenez de önemli rol oynamaktadır. VEGF insan endometriumunda vaskularizasyondan sorumlu olarak bulunmaktadır.[35] İnce endometrium; azalmış glandüler epitel gelişimi, artmış uterin kan akımı rezistansı, azalmış VEGF ekspresyonu, azalmış vasküler gelişim ile karakterizedir.

2.2.3. İnce Endometrium Tedavisi

İnce endometrium tedavisinde adezyonlara bağılı olduğı düşünöldüğünde cerrahi yaklaşım uygulanabilirken, luteal faz yetmezliğı düşünölen olgularda

hormonal destek uygulanabilir. İnce endometrium oluşma mekanizmasında endometrial kanlanma önemsendiği için kanlanmayı arttırmak için çeşitli ajanlar kullanılmakta, tedavide sonuçları kesin olmayan farklı modaliteler denenmektedir. [36]

İnce endometrium patofizyolojisinde kan akımı rolü mevcuttur. Bu nedenle vazoaaktif ajanlar endometrial perfüzyonu arttırarak endometrial kalınlığı arttırabilir, implantasyonda olumlu etki oluşturabilirler. Weckstein ve arkadaşları 28 ince endometriumlu (8mm altı) IVF hastasında yaptığı randomize kontrollü çalışmada düşük doz aspirin implantasyon ve klinik gebelik oranını anlamlı olarak arttırmaktadır.[37] Ancak yapılan diğer çalışmalarda ve Cochrane veri tabanında anlamlı bir etki gösterilememiştir.[38] Perfüzyonu arttıran diğer ajanlar pentoksifilin ve vitamin E'dir. Acharya ve ark yaptığı çalışmada verilen kombine tedavi %40 hastada endometrial kalınlıkta gelişme sağlamıştır.[39] Diğer bir çalışmada da pentoksifilin ve Vitamin E kombine tedavisi uygulanmış, endometrial kalınlık ve gebelik oranlarında artış izlenmiştir.[40]

Endometriyal perfüzyonu arttırıcı diğer bir ajan ise sildenafil'dir. Sildenafil, fosfodiesteraz-5 inhibitörü, nitrik oksitin vasodilatör etkisini arttırır. Sher ve Fisch vajinal sildenafil uygulamasının ince endometriumlu IVF hastalarında kan akımını, gebelik oranlarını, implantasyonu arttırdığını göstermişlerdir.[41]

Takasaki ve ark 61 ince endometriumlu hastada yaptığı çalışmada hastalara sırasıyla vitamin E, L-arjinin, sildenafil sitrat tedavileri verilmiştir;

endometrial kalınlıktaki artış sildenafil grubunda en yüksek olarak izlenmiştir(%52,%67,%92).[42]

İnce endometrium, başarısız implantasyon tedavisi için yeni tedavi modaliteleri mevcuttur. Bunlardan biri G-CSF'dir. İnce endometrium (7mm altı) olan hastalarda subkutan ya da intra uterine uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda uygulamanın IVF etkinliği üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak çalışma sayıları kısıtlıdır daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Gleicher ve arkadaşları yaptıkları 21 hastalık çalışmada 30 mIU intrauterin G-CSF uygulamasının implantasyon ve gebelik oranlarını arttırdığını ancak daha geniş klinik çalışmaların yapılması gerektiğini belirtmektedirler. [4] Kunicki ve arkadaşlarının 37 hastada kontrol grubu olmaksızın yaptıkları çalışmada ince endometriumu olan önceki IVF başarısızlığı olan hastalara ET 72 saat önce intrauterine 30mU G-CSF uygulanmış ET sırasında ölçülen endometrium kalınlığında artış ve implantasyon başarısında artış izlenmiştir. [43] Zhao ve arkadaşları ratlarda ince endometriumu iatrojenik olarak oluşturdukları hayvan deneyinde uygulanan subkutan G-CSF'in endometrial hücrelerde rejenerasyon sağlayarak endometrial implantasyonu arttırabileceğini bunun kanıtlanması için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.[5] Çalışmada subkutan G-CSF uygulaması endometrial kalınlığı anlamlı olarak arttırmaktadır (tablo3)

Table 1. Comparison of the endometrial thickness between groups ($\bar{x} \pm s$).

groups	Uteri (n)	Endometrial thickness(μm)
experimental group I	20	569.37 \pm 37.01* \star
control group I	20	234.96 \pm 37.82* \circ
experimental group II	20	487.78 \pm 19.48** \star
control group II	20	231.21 \pm 17.81** \circ

Note: *P**P*P<0.01, \circ P>0.05. There is significant difference between the groups when P<0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0082375.t001

Tablo 3.Embryo İmplantasyon Modeli

Yapılan çalışmalar hasta sayısı ve objektif sonuç açısından yeterli olmadığı için daha fazla çalışma gerekmektedir.

İnce endometrium için diğer çok yeni tedavi modaliteleri arasında rejenratif tedaviler yer almaktadır. Jing ve ark ethanol uygulaması ile ince endometrium oluşturdıkları ratlara iv kemik iliği mezenkimal kök hücre enjeksiyonu uygulamışlardır. Randomize kör değerlendirme sonrası kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta endometrial kalınlıkta anlamlı artış izlenmiştir.[44] Nagori ve arkadaşları ashermanı olan bir vakada uyguladıkları kök hücrenin intra uterin kaviteye uygulanması endometriumun 8mm olması ve gebelik oluşmasını sağlamıştır.[45] Ancak bu konu üzerinde yeterli çalışma bulunmamaktadır; daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

2.3. Granülosit Koloni Stimüle edici Faktör(G-CSF) ve Reseptörü(G-CSF-R)

Koloni stimülasyon faktörü 3 (CSF-3) olarak da bilinen G-CSF granulosit ve kök hücre üreten kemik iliğinden köken alan glikoproteindir.[46] 174-177 aminoasit uzunluğunda 25kDa molekül ağırlığında iki formu olan hücre dışı reseptörüne bağlanarak etki gösteren bir moleküldür. Rekombinant DNA teknolojisi ile artifisyel olarak üretilmektedir.[47] Uzun yıllardır onkolojik ve hematolojik hastalarda tedavi sürecinde nötropeni tedavisi amacı ile kullanılmaktadır.[48]

G-CSF-R hücre yüzeyinde bulunan reseptördür. Bu reseptör temel olarak kemik iliği öncü hücrelerinin üzerinde bulunmaktadır. G-CSF reseptörüne bağlandığında nötrofilik granülositler ve makrofajlarda proliferasyon ve farklılaşma başlatır. [49] G-CSF temel olarak kemik iliği hücreleri üzerinde etkili bir molekül olsa da osteoblastlarda, düz kas hücrelerinde, endotelial ve epitelyal hücreler başta olmak üzere birçok hücrede de reseptörü, üretimi ve etkileri gösterilmiştir. [50] Desidual hücrelerde ve plasentada da G-CSF varlığı bildirilmiştir.[51] Salmassi ve arkadaşları luteinize granuloza hücrelerinde G-CSF ekspresyonu tespit etmişlerdir ve follikül sıvısında da G-CSF miktarını yüksek bulmuşlardır. [52] Bazı çalışmalar follikül sıvısındaki G-CSF yüksekliğinin ovulasyonda ve sonrasında gebeliğin devamlılığında önemli olduğunu belirtmektedirler.[53] G-CSF'in trofoblast büyümesinde ve plasenta metabolizması üzerinde etkileri gösterilmiştir. Trofoblast hücre yüzeylerinde G-CSF-R gösterilmiştir. Bu nedenle G-CSF'in trofoblast ve plasenta gelişiminde embryo implantasyonunda etkisi olduğu düşünülmektedir.[54] Diğer bazı

çalışmalarda erken hafta abortuslarda trofoblastlar değerlendirildiğinde G-CSF ekspresyon yetersizliği izlenmiştir[55]

Gebelik semi- allogreft bir durumdur; bu nedenle gebelerde greft toleransı sağlanması önemlidir. G-CSF Th2(T-helper2) cevabını arttırır, NK hücrelerini ve mononükleer hücreleri inhibe ederek T hücre toleransını arttırarak greft toleransını sağlamaktadır.[56]

G-CSF yapısı gereği implantasyona katkı sağladığı, ince endometriumda başarısız implantasyon olgularında etkili olabileceği düşünölmektedir. Ancak IVF hastalarında, tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında G-CSF dışarıdan uygulamanın endometriyal reseptiviteyi arttırabileceği düşünölmektedir. Bu konu ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu hayvan deneyinde G-CSF uygulamasının endometrium üzerinde yaptığı etkileri histolojik olarak gösterilmesi hedeflendi. Bu sayede endometriyal kalınlığa, anjiogeneze, implantasyonda etkisi olan sitokin, büyüme faktörlerinin artışına etkisini objektif olarak değerlendirilmesi planlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Deneyi Protokolü

Çalışmamız için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) etik kurul onayı alındı. Hollanda Harlan laboratuvarından alınan 24 adet dişi 200-250 g Sprague Dawley rat deneye dahil edilmiştir. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, ve standart deney rat diyeti (Korkuteli Yemek Endüstrisi, Türkiye) ve su ad libitum şeklinde (sürekli ulaşabilecekleri şekilde) verilmiştir. 24 hayvan randomize şekilde 4 gruba ayrılmıştır.

3.1.1. İnce Endometrium'lu Grup 1 (Deney Grubu: İnce Endometrium+G-CSF)

1. grupta 6 adet 200-250g Sprague Dawley rat model oluşturulduktan sonra ince endometrium oluşturmak üzere Ketamin ve Xylazine ile 80-100 mg/kg: 5-10mg/kg dozlarında anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve baticon ile saha temizliği takiben 2 cmlik alt segment kesisi ile batına girilerek mesane arkasında uterin hornlar bulundu. Uterin hornlar klemlenebildiği en üst noktadan ve servikal seviyeden ezmez klemlerle klemlendikten sonra 0.1ml bir horna 0.1ml bir horna %96 etil alkol enjekte edilerek 2 dakika beklendikten sonra 0.1 ml'şerden iki horna tekrar enjekte edilerek toplam bekleme süresi 5 dakika olacak şekilde uygulandı, sonrasında klemler açılarak kas tabakası ve cilt tek tek suture edildi. Ratların önceden bahsedilen uygun randomize koşullarda 10 gün süresince bakımlarına devam edildi. Rat estrus süresi 4.5- 5 gün sürdüğü için ve ince

endometrium oluşturulan modellerde 2 estrus beklendi. 10 gün sonrasında diğer işlemler yapılmaya başlandı.

10 gün sonra 5 gün süreyle aynı saatlerde ratlara 40 µg/kg/g subkutanöz yoldan GCSF enjeksiyonu yapıldı. Ardından 3 estrus süresince, 15 gün beklendikten sonra anestezi ile batına girilerek histerektomi işlemi yapıldı. Alınan materyal 4% paraformaldehit içerisinde konularak immunohistokimyasal incelemeye alındı. Ratlara ötenazi uygulandı.

3.1.2. İnce Endometrium'lu Grup 2 (Kontrol Grubu: İnce Endometrium+ Serum fizyolojik)

2. grupta 6 adet 200-250g Sprague Dawley rat model oluşturulduktan sonra ince endometrium oluşturmak üzere Ketamin ve Xylazine ile 80-100 mg/kg: 5-10mg/kg dozlarında anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve batıcon ile saha temizliği takiben 2 cmlik alt segment kesisi ile batına girilerek mesane arkasında uterin hornlar bulundu. Uterin hornlar klemlenebildiği en üst noktadan ve servikal seviyeden ezmez klemlerle klemlendikten sonra 0.1ml bir horna 0.1ml bir horna %96 etil alkol enjekte edilerek 2 dakika beklendikten sonra 0.1 ml'şerden iki horna tekrar enjekte edilerek toplam bekleme süresi 5 dakika olacak şekilde uygulandı, sonrasında klemler açılarak kas tabakası ve cilt tek tek suture edildi. Ratların önceden bahsedilen uygun randomize koşullarda 10 gün süresince bakımlarına devam edildi. Rat estrus süresi 4.5- 5 gün sürdüğü için ve ince endometrium oluşturulan modellerde 2 estrus beklendi. 10 gün sonrasında diğer işlemler yapılmaya başlandı.

10 gün sonrasında 5 gün süreyle aynı saatlerde ratlara 40 µg/kg/d subkutanöz yoldan serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Ardından 3 estrus süresince, 15 gün beklendikten sonra anestezi ile batına girilerek histerektomi işlemi yapıldı. Alınan materyal 4% paraformaldehit içerisinde konularak immunohistokimyasal incelemeye alındı. Ratlara ötenazi uygulandı.

3.1.3. Normal Endometrium ile Grup 3(Normal Endometrium + G-CSF)

3. gruptaki ratlara 1. Ve 2. Gruptaki ratlara işlem yapıldığı süre içerisinde önceden anlatılan randomize laboratuvar koşullarında bakıldı. Ardından 1. ve 2. Grupla eş zamanlı olacak şekilde 5 gün süreyle aynı saatlerde ratlara 40 µg/kg/g subkutanöz yoldan G-CSF enjeksiyonu yapıldı. 3 estrus süresince, 15 gün beklendikten sonra anestezi ile batına girilerek histerektomi işlemi yapıldı. Alınan materyal 4% paraformaldehit içerisinde konularak immunohistokimyasal incelemeye alındı. Ratlara ötenazi uygulandı.

3.1.4. Normal Endometrium ile Grup 4(Normal Endometrium + Serum Fizyolojik)

4. gruptaki ratlara 1. Ve 2. Gruptaki ratlara işlem yapıldığı süre içerisinde önceden anlatılan randomize laboratuvar koşullarında bakıldı. Ardından 1. ve 2. Grupla eş zamanlı olacak şekilde 5 gün süreyle aynı saatlerde ratlara 40µg/kg/g subkutanöz yoldan serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. 3 estrus süresince, 15 gün beklendikten sonra anestezi ile batına girilerek histerektomi işlemi yapıldı. Alınan materyal 4% paraformaldehit içerisinde konularak immunohistokimyasal incelemeye alındı. Ratlara ötenazi uygulandı.

3.2. Uterus Duvar Kalınlığı ve Endometrium Kalınlığının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı, epitel girintilerinin en düşük seviyede olduğu bölgeler dikkate alınarak her preparattan 6 alan belirlendi, her alandan da 6'şar ölçüm yapılarak ortalamaları saptandı.

3.2.1 Histokimyasal Takip ve Yöntem

Tüm deneklerden elde edilen uterus dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak en az 72 saat süresince % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminde sonra doku örnekleri kasetlere konularak akarsu altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilip ardından erimiş parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitlere tüm gruplardaki her hayvana ait örnekler için Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson's Trikrom boyamaları yapıldı. Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında resimleri çekilerek değerlendirildi. H&E boyama ile; uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı ölçümü yapıldı. Masson trikrom boyama ile; fibroblast infiltrasyonu ile kollajen birikimine bakılarak fibrozis şiddeti ve yaygınlığı değerlendirildi.

3.2.2. Masson's Trikrom Üçlü Boyama Yöntemi:

Deney gruplarına ait parafin bloklarından alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Daha sonra kesitler 2 kez 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonlandırıldı. 2 kez 3 dakika %100'lük etil alkolden geçirildikten sonra sırasıyla %90, %80, %70 ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi. Kesitler daha sonra akan musluk suyunda yıkanarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere GBL Masson Trikrom Boyama Kiti (Cat no: 5022, Lot no: A0203) uygulandı. Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonları eşit miktarda karıştırılarak Weigert Hematoksilen hazırlandı. Kesitler sudan geçirildi. Weigert' s Demirli Hematoksilen ile 15 dk çekirdek boyaması yapıldı. ardından lam silkelenerek ayıraç uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk kurutuldu. Doku kesitleri Pikrik asit çözeltisi ile örtüldü ve 4 dk sonra distile suyla yıkandı. Ardından doku kesitleri Gelincik kızılı fuksin çözeltisi ile örtüldü ve 4 dk sonra distile suyla yıkandı. Doku kesitleri Fosfomolibdik asit çözeltisi ile örtülerek 10 dk bekletildi. Ardından yıkamadan 7 dk Masson anilin mavisi çözeltisi ile doku kesitlerinin üzeri örtüldü ve distile suyla yıkandı. Yıkanan kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Sonuç olarak nukleuslar mavi-siyah; sitoplazma ve kas kırmızı; kollajenler maviye boyandı.

3.2.3. İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal boyamalar için oluşturulan parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 37°C' deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C' ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, sonrasında 61 °C' de 20 dakika bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra kesitler 10'ar dakika sırasıyla %100, %96,%90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Dehidrate edilen kesitleri alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki kesitler 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilip, dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7.4) ile yıkandıktan sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi sağlandı. İşlem sonrasında PBS ile yıkanan kesitlere 5 dakika UltraV block (Lab Vision, Fremont, CA, Cat no: TA-125-UB, Lot no: AUB150113AC) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, uygun dilusyonda Fibronektin (1:100, Abcam, ab2413, Lot no: GR248495-1), Proliferation cell nuclear antigen (PCNA(FL-261) (1:100, SantaCruz, sc-7907, Lot no: K1015)), Flk-1(C-20)(VEGF reseptörü2) (1:100, SantaCruz, sc-315, Lot no: H2415) primer antikörlerine belirli sürelerde

etkin bırakılarak inkübasyonları sağlandı. Primer antikordan sonra kesitler 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika biotinli sekonder antikor (Lab Vision, Fremont, CA, Cat no: TP-125-BN, Lot no: PBN141111AE) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitler enzimin biotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Lab Vision, Fremont, CA, Cat no: TS-125-HR, Lot no: SHR150121AA) etkin bırakıldı. İşlem sonunda kesitler yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Son olarak ortama diaminobenzedin içeren (DAB) substratı (Lab Vision, Fremont, CA, Cat no: TA-125-HD, Lot no: HD31722) eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletilip mikroskop altında gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandıktan sonra zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i kullanıldı. DAB ile işaretlenip zemin boyaması yapılan lamalar azalan alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi. Sonrasında kesitlerin üzeri lamel ile entellan medyumu kullanılarak kapatıldı. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi. Değerlendirmeler sonunda her primer antikor için immünohistokimyasal tutulum yoğunlukları incelenerek istatistiksel verileri oluşturuldu.

3.2.4. TUNEL yöntemi

DNA fragmentasyonu ile gelişen apoptozisi saptamak için *TUNEL* (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi uygulandı. Bu yöntem için Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis

Detection kit (Cat no: S7101, Lot no:2702246) içeriği kullanıldı. Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldu daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarak da 61 °C' de 20 dakika bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, % 80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler alkolden arındırılmak için iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Sudan çıktıktan sonra etrafı PAP-pen ile çevrelenen dokular, 25 dakika boyunca 37 °C'de 20 µg/ml proteinaz K (Millipore, Cat no: 21627) ile inkübe edildi. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler üzerine Equilibration Buffer (Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit, Cat no: S7101, Lot no:2693367) damlatılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler 60 dakika 37 °C nemli ve karanlık ortamda Working Strength TdT Enzyme (Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit, Cat no: S7101, Lot no:2604905) ile inkübe edildi. Kesitler Stop/Wash tamponunda (Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit, Cat no: S7101, Lot no:2679354) 10 dakika bekletildi ve 1 dakika PBS ile yıkandı. Ardından dokular Anti-Digoxin Peroksidase solüsyonu (Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit, Cat no: S7101, Lot no:2693373) ile nemli ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Dokular 3 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri

belirleyebilmek için DAB (Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit, Cat no: S7101, Lot no:2670412) ile boyama yapıldı. Zemin boyası olarak Metilen Green kullanıldı. Boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entallan ile lamelle kapatıldılar. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım şartını sağlamayan değişkenleri (Uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı) tanımlamak için median değerleri çeyrekler arası genişlik değerleri ile birlikte değeri kullanıldı. Nonparametrik değişkenlerin karşılaştırılması için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı. Fark bulunduğunda farklı grubu belirleyebilmek için Mann-Whitney testi ile ikili karşılaştırılmaları yapıldı. İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, NA, USA) ve MS-Excel 2013 ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Uterus Duvar Kalınlığı ve Endometrium Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı, epitel girintilerinin en düşük seviyede olduğu bölgeler dikkate alınarak her preparattan 6 alan belirlendi, her alandan da 6'şar ölçüm yapılarak ortalamaları saptandı.

Uterus duvar kalınlığı ortalamaları; normal endometrium+ serum fizyolojik grubunda 1230,21 (429,07) μm ; normal endometrium + G-CSF grubunda 1073,47 (644,76) μm , ince endometrium grubunda 264,20 (196,53) μm , ince endometrium + G-CSF grubunda 373,90 (154,19) μm olarak saptandı.

Uterus endometrium kalınlığı ortalamaları; normal endometrium+ serum fizyolojik (Grup4) grubunda 288,38 (160,86) μm ; normal endometrium+G –CSF grubunda 219,49 (227,78) μm , ince endometrium grubunda 84,27 (150,00) μm , ince endometrium+G-CSF grubunda 254,25 (266,98) μm olarak saptandı.

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p<0,001$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı.

Normal endometrium+ Serum fizyolojik (Grup4) ile Normal Endometrium+ G-CSF grubu(Grup3) kıyaslandığında uterus duvar kalınlığı ($p=0,076$) ve endometrium kalınlığı ($p=0,309$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Normal endometrium+Serum fizyolojik(grup4) ile ince endometrium grubu+ serum fizyolojik(Grup2) kıyaslandığında, uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Grup 2'nin duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı Grup 4'e göre azalma gösteriyordu. ($p<0.001$; $p<0.001$)

Normal Endometrium + serum fizyolojik (grup4) ile ince endometrium+G-CSF grubu(Grup 1) kıyaslandığında, uterus duvar kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,001$); Ancak endometrium kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. ($p=0,102$)

Normal endometrium+G-CSF(Grup3) ile ince endometrium grubu(Grup2) kıyaslandığında, uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. İnce endometrium grubunun duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı G-CSF grubuna göre anlamlı olarak azalma gösteriyordu. ($p<0,001$; $p<0,001$)

Normal endometrium + G-CSF grubu (Grup3) ile ince endometrium + G-CSF grubu(Grup1) kıyaslandığında, uterus duvar kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,001$); ancak endometrium kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. ($p=0,333$)

İnce endometrium (Grup2) ile ince endometrium + G-CSF grubu(Grup1) kıyaslandığında, uterus duvar kalınlığı ve endometrium kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. İnce endometrium grubunun duvar

kalınlđđ ve endometrium kalınlđđ ince endometrium+G-CSF grubuna göre azalma gösteriyordu. (p=0,025; p=0,026)

Yapılan istatistiksel değerlendirmede ince endometrium grubunda uterus duvar kalınlđđ diğer gruplarla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi. İnce endometrium grubunun uterus duvar kalınlđđ incelmişti.

Uterus endometrium kalınlıkları değerlendirildiinde en ince ölçümler beklenildiği gibi ince endometrium grubunda alınmıştır. İnce endometrium oluşturulduktan sonra G-CSF uygulaması yapılması ile endometrial kalınlıkta istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmiştir. (Tablo 4)

	Grup1 İnce endometrium+ G-CSF		Grup2 İnce endometrium+ Serum fizyolojik		Grup3 Normal endometrium+ G-CSF		Grup4 Normal endometrium+ Serum fizyolojik		P değeri
	Mean ± SD µm	Median (çeyrekler arası genişlik) µm	Mean ± SD µm	Median (çeyrekler arası genişlik) µm	Mean ± SD µm	Median (çeyrekler arası genişlik) µm	Mean ± SD µm	Median (çeyrekler arası genişlik) µm	
Endometriyal kalınlık	239.9 ± 158.4	254.25 (266.98)	151 ± 167	84.27 (150)	283.6 ± 189.1	219.49 (227.78)	282.6 ± 94.9	288.38 (160.86)	p<0.0001 p=0.309^a p<0.0001 ^b p=0.102 ^c p<0.0001 ^d p=0.33 ^e p=0.025^f
Uterin duvar kalınlık	551.74 ± 397.51	373.9 (754.19)	290.82 ± 119.18	264.20 (196.53)	1085.58 ± 459.71	1073.47 (644.76)	1262.83 ± 279.69	1230.21 (429)	p<0.0001 p=0.076^a p<0.0001 ^b p<0.0001 ^c p<0.0001 ^d p<0.0001 ^e p=0.026^f

Tablo 4. Endometrial duvar kalınlıkları ve uterus duvar kalınlıkları karşılaştırmaları

Kabul edilen P değeri: $p \leq 0.05$

a Normal endometrium + serum fizyolojik, normal endometrium + G-CSF karşılaştırması

b Normal endometrium + serum fizyolojik , ince endometrium+ serum fizyolojik karşılaştırması

c Normal endometrium + serum fizyolojik, ince endometrium + G-CSF karşılaştırması

d Normal endometrium + G-CSF, ince endometrium + G-CSF karşılaştırması

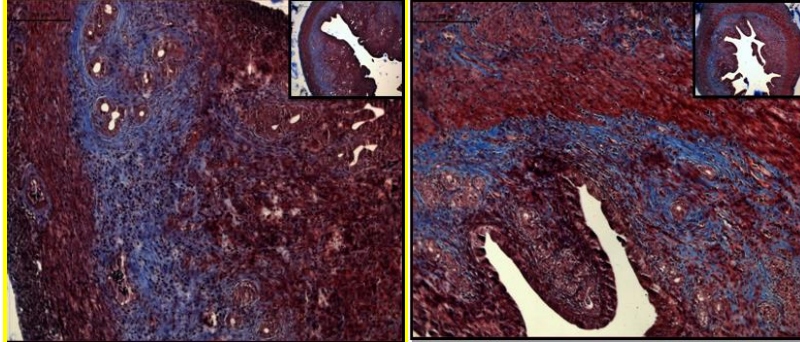
e Normal endometrium + G-CSF, ince endometrium + serum fizyolojik karşılaştırılması

f İnce endometrium + serum fizyolojik, ince endometrium + G-CSF karşılaştırması

4.2. Mason Trikrom Boya Bulguları

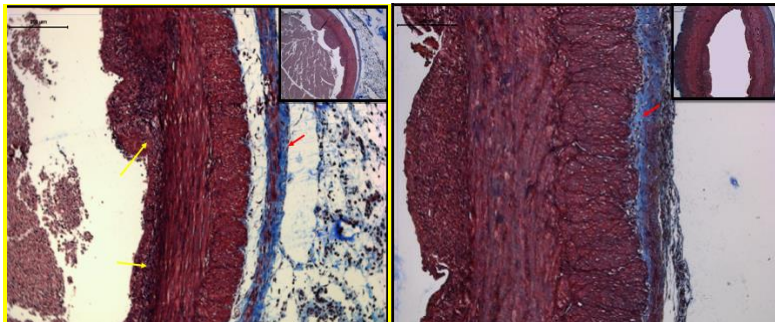
Normal endometrium+ serum fizyolojik grubunda ve normal endometrium+ G-CSF grubunda, endometrium lamina propriasında, düz kas hücre bantları arasında ve tunika adventisyada mavi olarak boyanan kollagen lif dağılımı belirgin olarak gözlenmekteydi. (Şekil 3,4)

İnce endometrium ve ince endometrium+ G-CSF gruplarında tunika adventisya da kollagen lif içeren alanlar mavi boyanırken , mavi boyanma özelliğinin olmaması nedeniyle ince endometriumda ekstrasellüler matriksin kollagen lif içeriğinin zayıf olduğu belirlendi (Şekil 5,6)



Şekil3- Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda endometrium lamina propriasında, düz kas hücre bantları arasında ve tunika adventisyada mavi olarak boyanan kollagen lif dağılımı.

Şekil4- normal endometrium+G-CSF grubunda endometrium lamina propriasında, düz kas hücre bantları arasında ve tunika adventisyada mavi olarak boyanan kollagen lif dağılımı.



Şekil5. İnce endometrium grubunda tunika adventisya da (kırmızı ok) kollagen lif dağılımı,mavi boyanma özelliği göstermeyen endometrium (sarı oklar)

Şekil6. İnce endometrium+G-CSF grubunda endometrium tunika adventisya da (kırmızı ok) kollagen lif dağılımı.

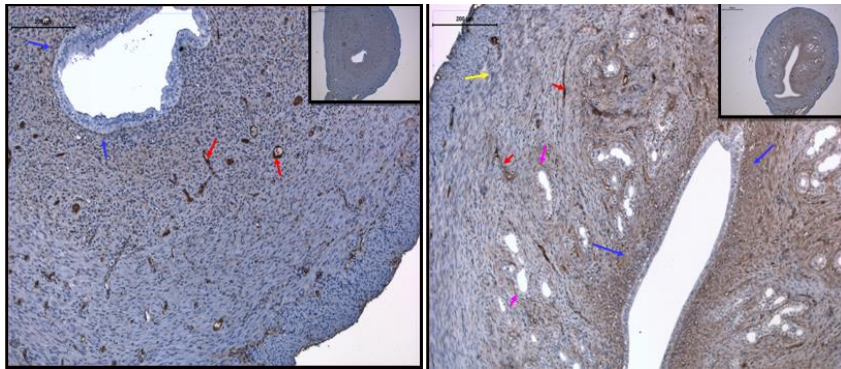
4.3. Fibronektin Bulguları

Normal endometrium+seum fizyolojik grubunda, subepitelial matrikste (mavi oklar), endometrial stromada, düz kas hücre bantlarını çevreleyen matrikste zayıf fibronektin tutulumu gözlenirken, perivasküler matrikste yoğun immünreaksiyon gözlemlendi(Şekil7).

Normal endometrium+G-CSF grubunda özellikle subepitelial matrikste ve endometrial bezlerin bazal membranında perivasküler matrikste ve kas hücre bantları arasındaki matrikste fibronektin tutulumu pozitif (Şekil8).

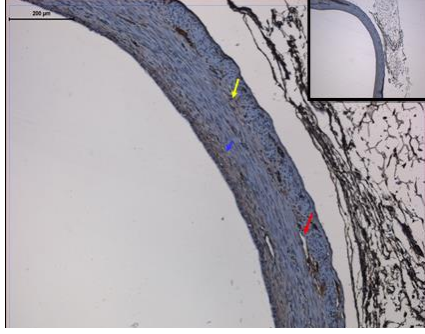
İnce endometrium grubunda ise subepitelial bağ dokuda ve myometriyum kas tabakaları arasındaki gevşek bağ dokuda zayıf, perivasküler alanda orta düzeyde fibronektin tutulumu gözlemlendi (Şekil 9)

İnce endometrium+ G-CSF grubunda subepitelial bağ dokuda ,vasküler ekstrasellüler matrikste ve myometriumdaki düz kas hücre bantlarının periferindeki ekstrasellüler matrikste kuvvetli fibronektin tutulumu gözlemlendi (Şekil 10)

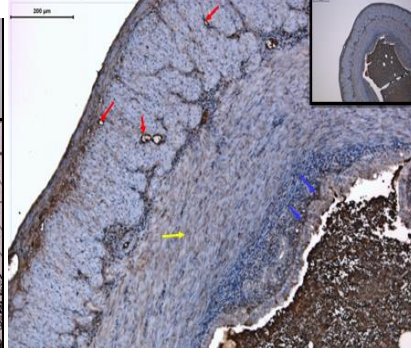


Şekil7. Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda, subepitelial matrikste (mavi oklar), endometrial stromada, düz kas hücre bantlarını çevreleyen matrikste zayıf fibronektin tutulumu gözlenirken, perivasküler matrikste(kırmızı oklar) yoğun immünreaksiyon vardı

Şekil8.Normal endometrium + G-CSF grubunda özellikle subepitelial matrikste (mavi oklar) ve endometrial bezlerin bazal membranında (pembe oklar), perivasküler matrikste (kırmızı oklar) ve kas hücre bantları arasındaki matrikste (sarı ok) fibronektin tutulumu pozitif.



Şekil9. İnce endometrium grubunda subepitelial bağ dokuda (mavi ok) ve myometrium kas tabakaları arasındaki gevşek bağ dokuda (sarı ok) zayıf, perivasküler alanda (kırmızı ok) orta düzeyde fibronektin tutulumu gözlemlendi.



Şekil10. İnce endometrium+G-CSF grubunda subepitelial bağ dokusunda (mavi oklar),vasküler ekstrasellüler matrikste (kırmızı oklar) ve myometriumdaki düz kas hücre bandlarının periferindeki ekstrasellüler matrikste (sarı ok) kuvvetli fibronektin tutulumu .

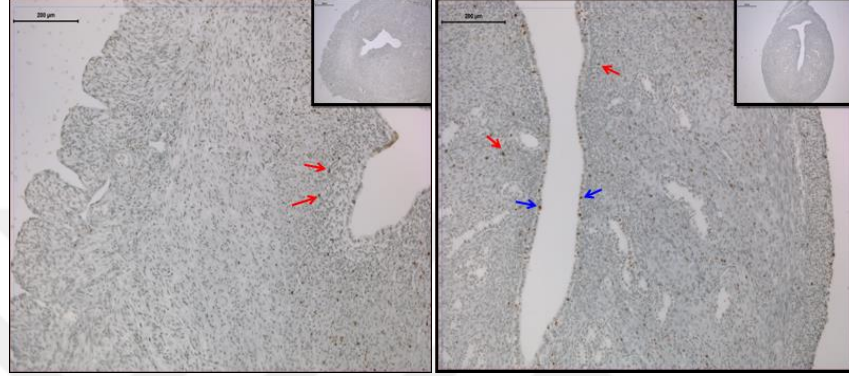
4.4. TUNEL Bulguları

Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda endometrium stromasında çok az sayıda TUNEL pozitif stromal hücreler belirlendi. (Şekil 11)

Normal endometrium+G-CSF grubunda ise endometrium epitelinde ve endometrium stromasında az sayıda TUNEL pozitif işaretli hücrelerin varlığı belirlendi. (Şekil 12)

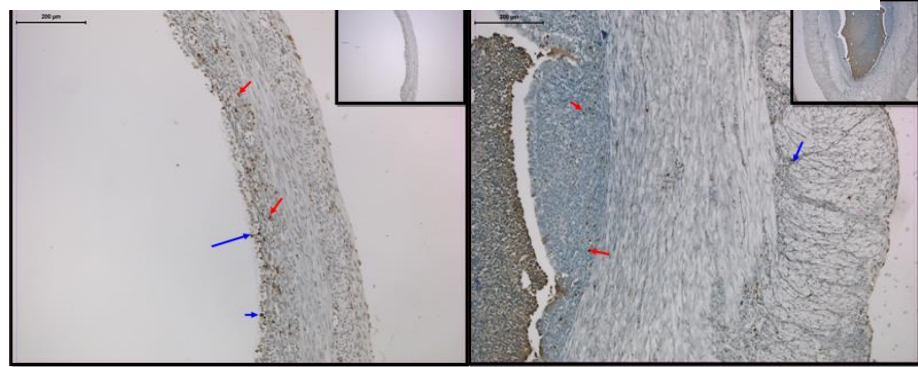
İnce endometrium grubunda ise az sayıda TUNEL pozitif epitel hücresi gözlenirken diğer tüm gruplardan çok daha fazla sayıda endometrium stromal hücresinin TUNEL pozitif olarak işaretlendiği dikkati çekti (Şekil 13)

İnce endometrium+ G-CSF grubunda endometriumda yer alan az sayıdaki stromal hücre, tunika muskularisteki kas demetleri arasında yer alan bağ dokuda az sayıda fibroblastın TUNEL pozitif yanıt verdiği gözlemlendi (Şekil 14)



Şekil 11. Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda endometrium fonksiyonalisten TUNEL pozitif stromal hücreler (kırmızı oklar)

Şekil 12. Normal Endometrium+G-CSF grubunda, çok az sayıda TUNEL pozitif endometrium epitel hücresi (mavi oklar) ve endometrial stromal hücre (kırmızı oklar)



Şekil 13. İnce endometrium az sayıda TUNEL pozitif epitel hücresi (mavi oklar), çok sayıda pozitif endometrium stromal hücresi (kırmızı oklar)

Şekil 14. İnce endometrium + G-CSF grubunda endometrium az sayıdaki stromal hücrede (kırmızı oklar) tunika muskularisteki kas demetleri arasındaki az sayıda fibroblastlarda TUNEL pozitif hücreler

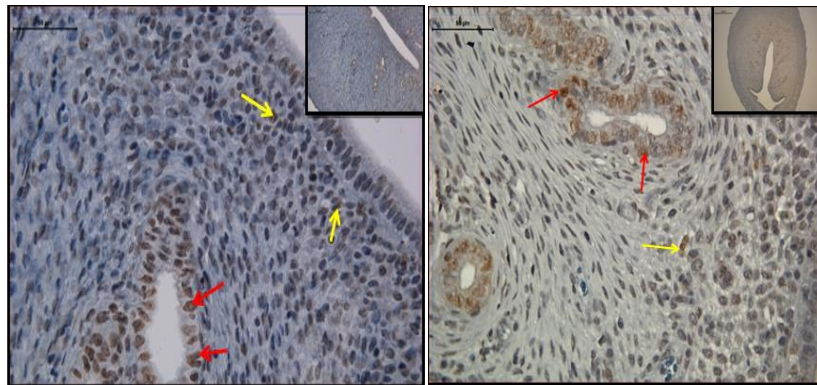
4.5. PCNA Bulguları

Normal endometrium+Serum fizyolojik grubunda hücre proliferasyonu belirteci olan PCNA varlığı çok sayıda endometrial bez epitel hücrelerinde gözlenirken çok az sayıda endometrial stromal hücre PCNA pozitif (Şekil 15)

Normal endometrium+G-CSF grubunda PCNA dağılımı değerlendirildiğinde ise endometrial bez epitel hücrelerinde çok sayıda, endometrial stromal hücrelerde ise çok az sayıda PCNA pozitif hücre saptandı (Şekil 16)

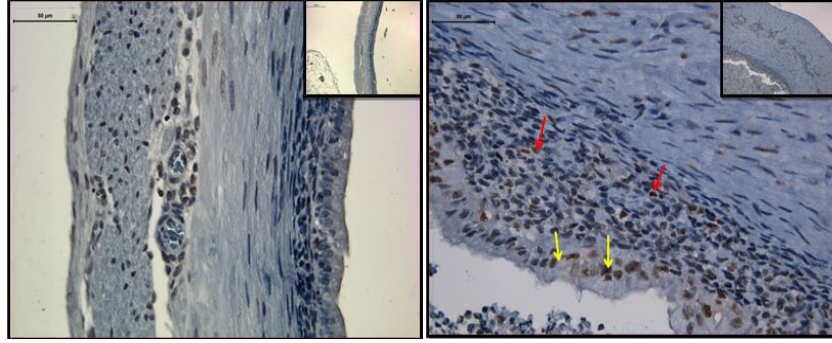
Ancak ince endometrium grubu değerlendirildiğinde uterusun tüm katmanlarında PCNA pozitif hücre gözlenmedi (Şekil 17)

İnce endometrium+ G-CSF grubunda ise çok sayıda lüminal endometrial epitel hücrelerinde ve endometrial stromal hücrelerde PCNA pozitiflik gözlendi. Bu bulgu kontrol grubu ve neupogen grubu bulguları ile benzerlik göstermekteydi (Şekil 18)



Şekil15. Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda endometrial bez hücrelerinde çok sayıda (kırmızı oklar), çok az sayıda endometrial stromal (sarı oklar) PCNA pozitif hücre

Şekil16Normal Endometrium+.G-CSF grubunda endometrial bez hücrelerinde çok sayıda (kırmızı oklar), çok az sayıda endometrial stromal (sarı oklar) PCNA pozitif hücre



Şekil17. İnce endometrium grubunda PCNA pozitif hücre gözlenmedi.

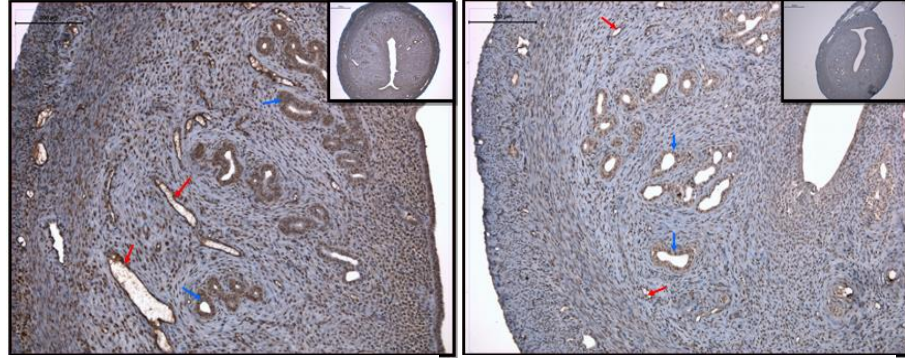
Şekil18. İnce endometrium+G-CSF grubunda endometrial epitel hücrelerinde (kırmızı oklar) ve endometrial stromal PCNA pozitif hücreler (sarı oklar).

4.6.VEGFR2 Bulguları

Angiogenesis belirteçlerinden VEGF için spesifik VEGFR incelendiğinde normal endometrium ve serum fizyolojik grubu ve normal endometrium+G-CSF grubunda vasküler bazal membranda ve endometrial bez epiteli hücrelerinde VEGFR2 tutulumu belirlendi (şekil 19,20)

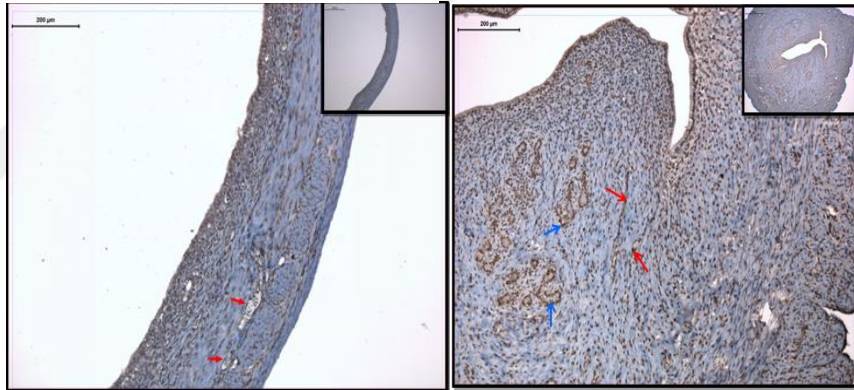
İnce endometrium grubunda ise VEGFR değerlendirildiğinde immün tutulumun oldukça zayıf olarak vasküler bazal mambranda varlığı dikkati çekmekteydi (şekil 21)

İnce endometrium+ G-CSF grubunda ise VEGFR dağılımı perikapiller alanda ve endometrial bezleri çevreleyen ekstrasellüler matrikste yer almaktaydı (Şekil 22)



Şekil19. Normal endometrium+serum fizyolojik grubunda vasküler bazal membranda (kırmızı oklar) ve endometrial bez epiteli hücrelerinde (mavi oklar) VEGFR2 tutulumu

Şekil20. Normal endometrium+G-CSF grubunda vasküler bazal membranda (kırmızı oklar) ve endometrial bez epiteli hücrelerinde (mavi oklar) VEGFR2 tutulumu



Şekil21. İnce endometrium grubunda vasküler bazal mambranda zayıf VEGFR2 tutulumu (kırmızı oklar)

Şekil22. İnce endometrium+G-CSF grubunda perikapiller alanda (kırmızı oklar) ve endometrial bezleri çevreleyen alanda (mavi oklar) VEGFR2 tutulumu

Sonuç olarak bu bulgular ışığında G-CSF endometrium lüminal epitel hücrelerinde ve endometrial stromal hücrelerde hücre proliferasyonunun tetikleyerek endometrium tabakalarının onarımına katkıda bulunmuştur. Bu bulgu PCNA'nın kontrolü olarak uygulanan ve DNA fragmentasyonunu gösteren hücrelerin saptanması için uygulanan TUNEL yöntemi bulguları ile de desteklenmektedir. TUNEL sonuçlarına göre ince endometrium+ G-CSF

grubunda PCNA'nın belirgin pozitif olduğu hücre gruplarında TUNEL pozitif hücre sayılarının az olduğu belirlenmiştir.

Bağ doku rejenerasyonunun önemli elemanlarından biri olan Fibronektin ekspresyonu ise G-CSF uygulaması ile tetiklenmiş özellikle subepitelial bağ dokuda ,vasküler ekstrasellüler matrikste ve myometriumdaki düz kas hücre bandlarının periferindeki ekstrasellüler matrikste kuvvetli tutulum göstermiştir.

G-CSF uygulamasıyla fibronektin ekspresyonunun artmış olduğunun belirlenmiş olmasına rağmen bu artış Masson Trikrom boyası ile belirgin olarak ortaya çıkan bir boyanabilme miktarına ulaşamamıştır.

Ayrıca doku rejenerasyonunda önemli etkenlerden biri olan vasküler endotelial growth factor reseptörünün ekspresyonu da G-CSF uygulamasıyla artmıştır.

İmmünohistokimyasal ölçümler kalitatif olarak yapılmış olup, kantitatif ölçümleri ve istatistiksel değerlendirme çalışmaları devam etmektedir.(Tablo 5)

	Grup1 İnce endometriüml+ G-CSF	Grup2 İnce endometriüml+ Serum fizyolojik	Grup3 Normal endometriüml+ G-CSF	Grup4 Normal endometriüml+ Serum fizyolojik
Kollojen hücre dağılımı (Masson Trikrom Boyama)	Pozitif	Zayıf	belirgin	belirgin
Fibronektin tutulumu	Çok sayıda	Az sayıda	Çok sayıda	pozitif
Apoptozis (TUNEL)	Az sayıda	Çok sayıda	Az sayıda	Az sayıda
Proliferasyon (PCNA)	Bez epiteli: çok sayıda Stroma: çok sayıda	Bez epiteli: izlenmedi Stroma: izlenmedi	Bez epiteli: çok sayıda Stroma: az sayıda	Bez epiteli: çok sayıda Stroma: az sayıda
VEGFR2(Flk1)	Perikapiller alanda : belirgin Endometrial bez matiksi: belirgin	Zayıf	Perikapiller alanda : pozitif Endometrial bez matiksi: pozitif	Perikapiller alanda: pozitif Endometrial bez matiksi: pozitif

Tablo 5.İmmünohistokimyasal boyama kalitatif karşılaştırmaları

5. TARTIŞMA

Yeterli endometrial kalınlık ART sikluslarında başarılı klinik gebelik sonuçları için önemlidir.[57] Klinik gebelik oranları ince endometrium olan vakalarda belirgin düşüktür. (endometrial kalınlık ≤ 7 mm: OR 0.42). Kovacs ve ark. Ve Traub ve ark yaptıkları çalışmalarda endometrial kalınlık ve gebelik arasında belirgin ilişki izlenmiştir.[58, 59] İnce endometriumun zayıf gebelik oranları ile ilişkisi net bilinmemektedir; bu konuda yapılmış endometrial histolojik çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. İnce endometrium varlığında bazal tabaka endometrium oksijen seviyelerinde artış olduğuna dair ve bu artan oksijen konsantrasyonunun embryo implantasyonuna zarar verebileceğine dair teoriler bulunmaktadır.[60] Bu nedenle ince endometrium, endometrial reseptivite ilişkisini kesinleştirecek moleküler yapıların ve morfolojik yapının belirlenmesi için daha çok çalışmaya gereklilik vardır.[61] Çalışmada ratlarda gebelik oluşturulmadığı için ince endometriumun reseptivitesi tam olarak değerlendirilememiştir; ancak ince endometriumun immunohistokimyasal yapısı üzerinde çalışılmıştır. İlerleyen çalışmalarda reseptivitenin değerlendirilebilmesi amacı ile gebe rat modelleri oluşturulabilmesi faydalı olabilir.

Bazı çalışmalar endometrial patern ve IVF sonuçları arasında korelasyon olduğunu savunmaktadır.[62] Diğer çalışmalarda ise belirgin korelasyon görülmemiştir.[63] Metaanalizler endometrial paternin farklı çalışmalarda farklı klasifikasyon sistemleri içermesi nedeni ile tam olarak yapılamamaktadır.

Anjiogenez dişi reproduktif sistemde önemli rol oynamaktadır. Dominant follikül gelişimi, korpus luteum oluşumu ve endometrium kalınlaşmasında önemlidir.[64] Çalışmalar insan endometrium dokusunda anjiogenezi, vaskularizasyonu düzenlemede dokuda eksprese olan VEGF'in etkili olduğunu göstermektedir.[65] Uterin kan akımı endometrium gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Çalışmalar embryo transferi yapılan hastalarda düşük kan akımı ve uterin reseptivite arasındaki yakın ilişkiyi göstermektedir.[66] İnce endometriumlu olgularda glanduler epitelyum gelişimi zayıftır, yüksek uterin kan akım impedansı, azalmış VEGF ekspresyonu ve zayıf vasküler gelişim bulunmaktadır.[67] VEGF anjiogenez artışında etkili olduğu gibi midsekretuar fazda vasküler permeabilitede artış sağlamak ve başarılı implantasyonda etkili olmaktadır ve VEGF düzeyleri midsekretuar fazda en yüksek düzeylerde izlenmektedir. [68] Düşük VEGF seviyeleri ince endometrium varlığında düşük endometrial reseptivite ile implantasyon başarısızlığına neden olmaktadır. WOI olarak geçen implantasyon aralığı süresince bakılan insan uterin lavajında VEGFA yüksek oranlarda bulunmuştur. Açıklanamayan infertilite hastalarında VEGFA'da belirgin azalma izlenmektedir. Klinik IVF sonuçlarında potensiyel iyileşme amacı ile insan embryo kültürlerine VEGF eklenmesi faydalı olacaktır. [69] VEGF endotelyal hücrelerin hiperplazisi, kapiller yapıların oluşumu, mikrovasküler geçirgenliğin artışı, sellüler matriks üretiminin stimülasyonu ve neovaskularizasyonda etkilidir.[70] Bazı çalışmalarda G-CSF'in nötrofillerden VEGF salınımını arttırarak anjiogenezi arttırdığını göstermektedir. Bu çalışmada VEGFR 2 dokularda değerlendirilmiştir. VEGF etkinliğini gösterecek olan

VEGFR reseptörü ince endometrium+G-CSF uygulanan grupta artmış görülmektedir. Bu durum G-CSF'in anjiogenezde olumlu etkileri olduğunu düşündürmektedir. Anjiogenezin implantasyon üzerinde olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. G-CSF'in implantasyon üzerindeki olumlu etkilerinden olabileceği düşünülmektedir. VEGF, VEGFR birlikte bakıldığı çalışmalar daha kesin sonuçlar oluşturabilecektir.

Yapılan diğer bir çalışmada doğal IVF siklusunda ince endometrium ve düşük gebelik oranları ilişkisinde anormal integrin ekspresyonları izlenmektedir. İntegrin ekspresyon eksikliği endometriosis ile ilişkili izlenmektedir.[71] Fahey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diğer sitokin ve kemokinlerin yanı sıra G-CSF ve GM-CSF polarize epitel hücrelerin apikal yüzeylerinden sekrete edildiği gösterilmektedir.[72] Zhao ve Chegini 1999 yılında yaptığı çalışmada GM-CSF ve reseptörünün ekspresyonunun endometrium üzerinde menstruel siklus süresince otokrin ve parakrin fonksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir.[73] Chegini ve arkadaşları GM-CSF'in endometrial hücreler üzerinde mitojenik etki göstermediğini ancak epitel ve glandüler hücrelerde TGF- β 1 ve ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir. [74] Moldenhauer ve arkadaşları 2010 yılında farelerde erken gebelik döneminde GM-CSF'in uterin dendritik hücrelerinde T hücre aktivasyonunda önemli regülatuar etkisi göstermişlerdir.[75]

Çok sayıda büyüme faktörü ve reseptöleri implantasyon amacı ile embryo ve üreme traktından salınmaktadır. Fibronektin çoğunlukla blastokistlerden salınan implantasyonda bağlanma yüzeyinde yer alan önemli ekstrasellüler matriks proteindir.[76] Bu çalışmada Fibronektin düzeyleri ince endometrium

olgularında G-CSF uygulaması sonrası artış izlenmektedir. G-CSF bu etkisi ile de implantasyon üzerine olumlu etkiler oluşturabilir. İnce endometrium oluşturmaksızın uygulanan G-CSF’de fibronektin artışı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında endometrial kalınlık bakılmaksızın G-CSF uygulamasının yararlı olup olmayacağı hipotezi üzerinde düşündürmektedir. Bu konuda literatürde daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bunun yanı sıra epitel doku bütünlüğü içerisinde bakılan kollojen liflerinde G-CSF uygulaması ile herhangi bir artış izlenmemiştir.

İlk kez 2011 yılında Gleicher ve arkadaşları standart tedavilerle başarısız olunan ince endometrium tedavisinde G-CSF uygulaması denemişlerdir[77] Sonraki çalışmalarda G-CSF uygulamasının endometrial kalınlıkta belirgin artış sağladığı ancak klinik gebelik oranlarının düşük izlendiği (19,1%, 18,9%) görülmüştür.[4, 43] Yapılan diğer bir çalışmada ise G-CSF uygulaması ile embryo implantasyon oranlarının(31.5%) ve klinik gebelik oranlarının (48.1%) anlamlı artış gösterdiği belirtilmiştir.[78] Barad ve arkadaşlarının yaptığı 141 hastalık diğer bir klinik çalışmada ise G-CSF intrauterin uygulamasının endometrial kalınlık artışı sağladığı ancak IVF sonuçlarına herhangi olumlu etkisi olmadığı gösterilmiştir.[79]

G-CSF hematopoetik kök hücre ve progenitör hücrelerin mobilizasyonunda rol oynamaktadır.[80] Kemik iliğinde mezenkimal prekürsör hücre sayısını arttırmaktadır.[81] Bu mezenkimal kök hücrelerin arteriyel hasarlı bölgelere yer değiştirdiği belirtilmektedir. İnce endometriumun azalmış sayıda ve

fonksiyon kaybetmiş endometrial kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. G-CSF endometrial kök hücre stimülasyonunda rol oynamaktadır ve kemik iliği kök hücrelerinin mobilizasyonu ile endometrial gelişimi sağlamaktadır. [82]

G-CSF büyüme faktörü ve sitokin fonksiyonları olan bir glikoprotein olmasının yanı sıra endotel, makrofaj ve diğer immunositler gibi bir çok hücrede üretilerek proliferatif etkinlik gösterir. Bunun yanı sıra anti-apoptotik etkinliği de bulunmaktadır.[83] Bu çalışmada hücre proliferasyon belirteci olan PCNA'ya bakıldığında G-CSF uygulandığında endometriyal bez ve epitel hücrelerinde proliferasyon belirteci pozitif olan çok sayıda hücre saptanmıştır. İnce olmayan endometriumda görülen bu etki benzer şekilde ince endometrium oluşturulmuş G-CSF uygulanan durumlarda da izlenmiştir. Bu sonuçlar literatürde endometrial kalınlık artışında etkili mekanizmanın histolojik göstergesi olarak durmaktadır . ve G-CSF'in endometriyal proliferasyonda etkili olduğunu kanıtlar niteliktedir. Epitel ve gland hücrelerinde stromadan daha çok proliferasyon izlenmesi implantasyonda aktif rol oynayan hücrelerin artışı da anlamlı görülmektedir. Çalışmada endometrial stromada apoptotik faktör olarak TUNEL pozitif hücreler değerlendirilmiştir. Endometrium stromasında TUNEL pozitif hücrelerin varlığı ince endometrium grubunda en fazla miktarda izlenmiş olup G-CSF uygulaması ile bu hücre sayısında azalma görülmektedir. G-CSF'in bilinen antiapoptotik etkinliğinin ince endometriumlu olgularda endometrial duvar kalınlığındaki artışta etkili olduğu düşünülmüştür.

Çalışmada ince endometrium kontrol ve G-CSF grubundaki endometrial duvar kalınlıkları ölçümleri 2013 yılında Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki endometrial kalınlıklarla benzerlik göstermektedir. [5] Bu çalışmada benzer şekilde ince endometriumlu ratlarda G-CSF uygulaması halinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde duvarda kalınlık artışı izlenmektedir. Hayvan sayılarındaki azlık sonuçları olumsuz etkilememektedir. Normal endometrium gruplarında ise kontrol grubu ve G-CSF grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmemektedir. Bu durumda klinik uygulamada G-CSF uygulamasının ince endometrium varlığında yararlı olabileceği sonucuna ulaşılmaktadır.

6. SONUÇ

Tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarının tedavisi kesinleşmemiş bir konudur. G-CSF uygulaması ile implantasyon ve ince endometrium tedavisinde yol katedilebilir. Bu çalışma ile;

1. G-CSF uygulamasının literatür ile uyumlu şekilde endometrial duvar kalınlığında istatitksel olarak anlamlı artış sağladığını,
2. Uygulamanın normal endometriumu olan olgularda istatistiksel olarak anlamlı kalınlık oluşturmadığı, nedeni açıklanamayan tekrarlayan implantasyon başarısızlığında yarar sağlayamayabileceği,
3. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucu G-CSF'in reseptivite üzerine olumlu etkiler yaratabilecek fibronektin,kollojen, proliferasyon,VEGFR'lerini arttırdığı ve tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında endometrial reseptiviteyi arttırarak olumlu etkileri olacağı,
4. Apoptoz belirteçlerinin de G-CSF uygulaması ile daha az izlenmesinin reseptivite üzerimde olumlu etkiler oluşturacağı düşünülmektedir.
5. Yapılan hayvan çalışmasında implantasyon modeli oluşturulamamıştır, bu nedenle endometrial kalınlıktaki bu olumlu değişimlerin implantasyona olan etkileri bu çalışmada net değerlendirilememektedir; ancak implantasyon faktörlerini

arttırması G-CSF'in implantasyon başarısızlıklarında ve ince endometrium tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

6. Yapılan çalışmada immunohistokimyasal boyama sonuçları kalitatif olarak verilmiş olup, kantitatif sayımları, istatistiksel değerlendirmesi devam etmektedir. Yapılacak istatistiksel veriler ile daha kesin sonuçlar elde edilmesi mümkün olacaktır. Reseptivite üzerindeki etkilerini değerlendirmek için literatürde daha çok çalışmaya gereklilik duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Speroff, F.M., Clinical gynecologic endocrinology and infertility
Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
2. Weissman, A., L. Gotlieb, and R.F. Casper, The detrimental effect of
increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and
outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, 1999. **71**(1): p.
147-9.
3. Ola, B. and T.C. Li, Implantation failure following in-vitro fertilization.
Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. **18**(4): p. 440-5.
4. Gleicher, N., et al., A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating
factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to
standard therapies. *Hum Reprod*, 2013. **28**(1): p. 172-7.
5. Jing Zhao., T.T., Qiong Zhang, Yonggang Wang, Yanping Li*, Use of
Granulocyte Colony-Stimulating Factor for the
Treatment of Thin Endometrium in Experimental Rats. *PLOS ONE*, 2013.
Volume 8 |(Issue 12).
6. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee
opinion. *Fertil Steril*, 2013. **99**(1): p. 63.
7. Diagnostic evaluation of infertile female: a committee opinion. *Fertil
Steril*, 2015. **103**(6): p. 44-50.

8. Munro, M.G., H.O. Critchley, and I.S. Fraser, The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding: Malcolm G. Munro, Hilary O.D. Critchley, Ian S. Fraser, for the FIGO Working Group on Menstrual Disorders. *Int J Gynaecol Obstet*, 2011. **113**(1): p. 1-2.
9. Faddy, M.J. and R.G. Gosden, A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. *Hum Reprod*, 1995. **10**(4): p. 770-5.
10. Westhoff, C., P. Murphy, and D. Heller, Predictors of ovarian follicle number. *Fertil Steril*, 2000. **74**(4): p. 624-8.
11. Broekmans, F.J., et al., A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(6): p. 685-718.
12. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Committee opinion: role of tubal surgery in the era of assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 2012. **97**: p. 539.
13. Kodaman, P.H., A. Arici, and E. Seli, Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004. **16**(3): p. 221-9.
14. Grimbizis, G.F., et al., Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update*, 2001. **7**(2): p. 161-74.
15. Homer, H.A., T.C. Li, and I.D. Cooke, The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril*, 2000. **73**(1): p. 1-14.
16. Coughlan, C., et al., Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*, 2014. **28**(1): p. 14-38.

17. Wordsworth, S., et al., Clomifene citrate and intrauterine insemination as first-line treatments for unexplained infertility: are they cost-effective? *Hum Reprod*, 2011. **26**(2): p. 369-75.
18. 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.
19. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011. **26**: p. 1270-80.
20. Loutradis, D., et al., A double embryo transfer on days 2 and 4 or 5 improves pregnancy outcome in patients with good embryos but repeated failures in IVF or ICSI. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2004. **31**(1): p. 63-6.
21. Kattal, N., J. Cohen, and L.I. Barmat, Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2008. **90**(4): p. 1069-76.
22. Werlin, L., et al., Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 2003. **80**(2): p. 467-8.
23. Balasch, J., et al., Hormonal profiles in successful and unsuccessful implantation in IVF-ET after combined GnRH agonist/gonadotropin treatment for superovulation and hCG luteal support. *Gynecol Endocrinol*, 1995. **9**(1): p. 51-8.
24. Paria BC, S.H., Dey SK., Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol*, 2001: p. 45:597–605.

25. Lessey, B.A., Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril*, 2011. **96**(3): p. 522-9.
26. Vinatier, D. and J.C. Monnier, [The fetal-maternal interface. Description of its elements from an immunologic perspective]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 1990. **19**(6): p. 691-700.
27. Kammerer, U., Antigen-presenting cells in the decidua. *Chem Immunol Allergy*, 2005. **89**: p. 96-104.
28. Christian, M., et al., Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, 2001. **142**(7): p. 3142-51.
29. Burton, G.J., J. Hempstock, and E. Jauniaux, Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta*, 2001. **22 Suppl A**: p. S70-7.
30. Yoshinaga, K., Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs). *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**: p. 413-24.
31. Hamilton, G.S., et al., Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*, 1998. **244**(1): p. 147-56.
32. Burrows, T.D., A. King, and Y.W. Loke, Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*, 1996. **2**(4): p. 307-21.
33. Richter KS, B.K., Bromer JG, Levy MJ, Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. . *Fertil Steril*, 2007. **87**: p. 53-9.

34. Shapiro H, C.C., Casper RF. , The use of vaginal ultrasound for monitoring endometrial preparation in a donor oocyte program. *Fertil Steril*, 1993. **59**: p. 1055-58.
35. Sugino N, K.S., Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H, Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction*, 2002. **123**: p. 379-87.
36. Orvieto, O.L.R., Treating patients with “thin” endometrium – an ongoing challenge. *Gynecological Endocrinology*, 2014. **30:6**: p. 409-14.
37. Weckstein LN, J.A., Galen D, et al, Low-dose aspirin for oocyte donation recipients with a thin endometrium: prospective, randomized study. *Fertil Steril*, 1997. **68**: p. 927-30.
38. Glujovsky D, P.R., Fisz bajn G, et al, Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocyte. *Cochrane Database Syst Rev* 2010. **1**: p. CD006359.
39. Acharya S, Y.E., Balen AH, The use of a combination of pentoxifylline and tocopherol in women with a thin endometrium undergoing assisted conception therapies: a report of 20 cases. *human fertility*, 2009. **12**: p. 198-203.
40. Ledee-Bataille N, O.F., Lefaix JL, et al, Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002. **17**: p. 1249-53.

41. Sher G, F.J., Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril*, 2002. **78**: p. 1073-76.
42. Takasaki A, T.H., Miwa I, et al, Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertil Steril*, 2010. **93:185**: p. 1-8.
43. Kunicki, M., et al., Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor effects on treatment-resistant thin endometrium in women undergoing in vitro fertilization. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 913235.
44. Jing Z, Q.Z., Yonggang W, Yanping L, Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat. *Fertil Steril*, 2014. **101**: p. 587-94.
45. Nagori CB, P.S., Patel H, Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*, 2011. **4**: p. 43-8.
46. Metcalf, D., The granulocyte-macrophage colony- stimulating factors. *Science*, 1985. **229(4708)**: p. 16-22.
47. Nagata, S., Et al, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony- stimulating factor. *Nature*, 1986. **319(6052)**: p. 415-8.
48. Dale, D.C., et al, Severe chronic neutropenia: treatment and follow- up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry *Am J Hematol*, 2003. **72(2)**: p. 82-93.

49. Fukunaga, R., C., A. Pinto Marin and M. Gonzalez Baron, Colony-stimulating factors: clinical evidence for treatment and prophylaxis of chemotherapy- induced febril neutropenia. *Clin Transl Oncol*, 2006. **8(10)**: p. 729-34.
50. Thomas, J., F. Liu, and D.C. Link, Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 2002. **9(3)**: p. 183-9.
51. McCracken, S., et al., Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. *J Endocrinol*, 1996. **149(2)**: p. 249-58.
52. Salmassi, A., et al., Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril*, 2004. **81 Suppl 1**: p. 786-91.
53. Yanagi, K., et al., Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Hum Reprod*, 2002. **17(12)**: p. 3046-52.
54. McCracken, S.A., et al., Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biol Reprod*, 1999. **60(4)**: p. 790-6.
55. Litwin, S., et al., Comparative immunohistochemical study of M-CSF and G-CSF in feto-maternal interface in a multiparity mouse model. *Am J Reprod Immunol*, 2005. **54(5)**: p. 311-20.

56. Morris, E.S., et al., Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3573-81.
57. RJ., Z.C., Transfer and uterine factors are the major recipient related determinants of success with donor eggs. *Fertil Steril* 2004. **82**: p. 850-6.
58. Kovacs, P., et al., The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*, 2003. **18**(11): p. 2337-41.
59. Traub, M.L., et al., Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 33.
60. Casper, R.F., It's time to pay attention to the endometrium. *Fertil Steril*, 2011. **96**(3): p. 519-21.
61. Kasius, A., et al., Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2014. **20**(4): p. 530-41.
62. Zhao, J., Q. Zhang, and Y. Li, The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012. **10**: p. 100.
63. Bozdag, G., I. Esinler, and H. Yarali, The impact of endometrial thickness and texture on intracytoplasmic sperm injection outcome. *J Reprod Med*, 2009. **54**(5): p. 303-11.
64. Sugino, N., et al., Angiogenesis in the human corpus luteum: changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual

- cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(11): p. 6141-8.
65. Sugino, N., et al., Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction*, 2002. **123**(3): p. 379-87.
66. Chien, L.W., et al., Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 2002. **78**(2): p. 245-51.
67. Miwa, I., et al., Pathophysiologic features of "thin" endometrium. *Fertil Steril*, 2009. **91**(4): p. 998-1004.
68. Kashida, S., et al., Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod*, 2001. **64**(1): p. 317-23.
69. N.K. Binder, J.E., D.K. Gardner, L.A. Salamonsen, and N.J. Hannan, Endometrial signals improve embryo outcome: functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice. *Human Reprod.*, 2014. **29**: p. 2278-2286.
70. Kaczmarek MM, K.A., Waclawik A, Schams D, Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod.*, 2007. **74**: p. 730-739.
71. Miller, P.B., et al., Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum Reprod*, 2012. **27**(3): p. 881-8.

72. Fahey, J.V., et al., Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod*, 2005. **20**(6): p. 1439-46.
73. Zhao, Y. and N. Chegini, The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium. *Am J Reprod Immunol*, 1999. **42**(5): p. 303-11.
74. Chegini, N., X.M. Tang, and Q. Dou, The expression, activity and regulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 1999. **5**(5): p. 459-66.
75. Moldenhauer, L.M., et al., GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. *J Immunol*, 2010. **185**(11): p. 7085-96.
76. Charmaine J. Green, S.T.F., and Margot L. Day, Insulin-like growth factor I increases apical fibronectin in blastocysts to increase blastocyst attachment to endometrial epithelial cells in vitro. *Hum. Rep.*, 2015. **30**: p. 284-298.
77. Gleicher, N., A. Vidali, and D.H. Barad, Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil Steril*, 2011. **95**(6): p. 2123 e13-7.
78. Xu, B., et al., Two protocols to treat thin endometrium with granulocyte colony-stimulating factor during frozen embryo transfer cycles. *Reprod Biomed Online*, 2015. **30**(4): p. 349-58.

79. Barad, D.H., et al., A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril*, 2014. **101**(3): p. 710-5.
80. Singh, P., et al., Expansion of bone marrow neutrophils following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*, 2012. **26**(11): p. 2375-83.
81. Brouard, N., et al., G-CSF increases mesenchymal precursor cell numbers in the bone marrow via an indirect mechanism involving osteoclast-mediated bone resorption. *Stem Cell Res*, 2010. **5**(1): p. 65-75.
82. Gargett, C.E. and L. Ye, Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertil Steril*, 2012. **98**(1): p. 11-20.
83. Schneider, A., et al., The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2083-98.

8. ÖZET

Yeterli endometrial kalınlık ART sikluslarında başarılı klinik gebelik sonuçları için önemlidir. Yapılan çalışmalarda 7 mm ve altındaki ölçümler ince endometrium olarak kabul edilmektedir. İmplantasyonda anjiyogenez ve birçok sitokin ve kemokin önemli rol oynamaktadır.

G-CSF tedaviye dirençli ince endometrium olgularında kullanılmaktadır. Çalışmada 24 rat üzerinde G-CSF'in endometrial duvar kalınlıklarına etkileri ve proliferatif faktörler, apoptotik faktörler ve anjiogenez üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

G-CSF ince endometriumda duvar kalınlıklarını arttırmaktadır ve bunun yanı sıra proliferatif faktörler, anjiogenez ve apoptotik faktörler üzerindeki olumlu etkileri izlenmektedir. Normal endometriumda etkinliği daha az olmakla birlikte etkinliği gösterilmiştir.

G-CSF implantasyon başarısızlığı ve ince endometrium tedavilerinde kullanılabilir, ancak reseptivite üzerine etkilerini göstermek amacı ile literatürde daha fazla çalışma yapılmalıdır.

9. SUMMARY

Adequate endometrial thickness is very important for successful clinical pregnancy in IVF treatment. In the literature there are studies of measurement of endometrium, and the values less than 7mm are broadly accepted as thin endometrium. Angiogenesis and various chemokines and cytokines have an important role in implantation.

G-CSF is used for treatment of implantation failures that resistant to treatment. In the study the endometrial thickness, angiogenesis, apoptotic and proliferatif factors were evaluated after G-CSF enjected to 24 rats.

In G-CSF groups the endometrial thickness were increased. Also this enjection improved angiogenesis, apoptotic and proliferatif factors which are important for implantation. The influence of G-CSF was seen more in thin endometrium, but also there was seen an improvement in normal endometrium.

G-CSF can be beneficial for implantation failure treatment. However more study should be done in literature for finding out the effect of G-CSF on endometrial receptivity.

10. EKLER

10.1.Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17.12.2014		TOPLANTI SAYISI : 14
ADI-SOYADI	İMZA	
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)	GÖRENLİ / İZİNLİ	
Prof.Dr.Esra AKKOL (Başkan V.)		
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)		
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU		
Prof.Dr.Tuncay PEKER	KATILAMADI / İZİNLİ	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	KATILAMADI / İZİNLİ	
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY	KATILAMADI / GÖRENLİ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	KATILAMADI	
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN		
Uzm.Dr.Burcu EKİM		
Dr.Kadir BAŞAR		
Osman İÇ		

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Gizem

Soyadı: Işık

Doğum Yeri ve Tarihi: Çorum/1987

Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru): 2004 TED Ankara Koleji
Lisesi

2010 Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Bilimsel Etkinlikleri (aldığı burslar, ödüller, projeleri, yayınları)