

Yardımla Üreme Tekniklerinde İmplantasyon ve Gebelik Oranlarını Etkileyen Faktörler

FACTORS INFLUENCING IMPLANTATION AND PREGNANCY RATES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Candan İLTEMİR DUVAN*, Hakan ŞATIROĞLU**, Bülent BERKER***, Esra ÇETİNKAYA*, Korhan KAHRAMAN*

* Arş.Gör.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

** Prof.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

*** Uz.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ANKARA

Özet

İlk invitro fertilizasyon bebeği olan Louis Brown'un 1978'de doğumundan beri yardımla üreme tekniklerinin (YÜT) uygulanma endikasyonları ve başarı oranları giderek artmıştır. Yardımla üreme teknikleri ile tedavide tüm gelişmelerle rağmen en verimsiz basamak embryo transferi aşamasıdır. IVF programına katılan çiftlerin %80-85'i oosit toplama ve takiben embryo transferi aşamasına ulaşsa bile implantasyon ve transfer başına gebelik oranları halen istenilen düzeylere ulaşmamıştır. IVF ile tedavi programına alınan hastalarda başarı oranlarını etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmaktadır. YÜT ile tedavide başarılı sonuçlar elde etmek için öncelikle bu tedavi yöntemlerine uygun hastaların ve endikasyonlara göre uygun tedavi modalitelerinin seçimi önemlidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen başlıca faktörler arasında oosit/embryo kalitesi ve uterusun reseptivite yer almaktadır. Bu sebeple YÜT ile tedavide implantasyon ve gebelik oranlarını arttıracak bir yaklaşım hem uterusun reseptiviteyi iyileştirmeye hem de yüksek kalitede embryo elde etmeye yönelik olmalıdır. Bu sunumda, YÜT endikasyonları, implantasyon fizyolojisi ve yardımla üreme teknikleri ile tedavi uygulamalarında implantasyon ve gebelik oranlarını etkileyen faktörlerden bahsedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yardımla üreme teknikleri, İmplantasyon, Gebelik oranları, Endometriyal reseptivite

T Klin Jinekoloj Obst 2003, 13:466-475

Summary

The indications of assisted reproductive technology (ART) and the success rates are increasing gradually since the birth of Louis Brown; the first invitro fertilization (IVF) baby, in 1978. In spite of advancement in treatment with the assisted reproductive technology, we still are not successful enough in the embryo transfer stage. Although the oocyte pick up can be performed successfully in 80-85% of couples taking IVF program, the implantation and pregnancy rates per transfer are not at expected values. There are multiple data about the factors affecting the success rates of IVF programmes in the literature. The most important factor for the success of an IVF program is the selection of the patient group and the application of the appropriate treatment strategy to the patient. In the literature the main factors affecting the implantation and pregnancy rates are oocyte and embryo quality and the uterine receptivity. According to this data to increase the implantation and pregnancy rates, we should try to increase the uterine receptivity and embryo quality. The subjects of this review are the indications of assisted reproductive technology, the physiology of implantation and the factors affecting the implantation and pregnancy rates in assisted reproductive technology.

Key Words: Assisted reproductive technology, Implantation, Pregnancy rates, Endometrial receptivity

T Klin J Gynecol Obst 2003, 13:466-475

Yardımla üreme teknolojisi (YÜT), overden oositlerin elde edilmesini sağlayan tüm teknikleri içerir (1). İlk in vitro fertilizasyon bebeği olan Louise Brown'un 1978'de doğumundan beri yardımla üreme tekniklerinin kullanım alanları, başarı oranları ve endikasyonları giderek genişlemiştir (2). Yardımla üreme teknikleri ile tedavide başarılı sonuçlar elde etmek için bu tedavi yöntemlerine

uygun hastaların ve endikasyonlara göre uygun tedavi modalitelerinin seçimi önemlidir.

Yardımla Üreme Teknikleri ile Tedavi Endikasyonları

a) Tubal ve Peritoneal faktör: İn vitro fertilizasyon-embryo transferi (İVF-ET) başlangıç-

ta tubal hastalığı olan hastalarda tubal blokajı bypass etmek amacıyla uygulanmıştır. Tubal ve peritoneal adheziv hastalığı olan olgularda tubal cerrahide mikrocerrahi tekniklerinin kullanılması gebelik sonuçlarını iyileştirmiştir. Ancak tuboplasti sonrası yaklaşık 2 yıl içerisinde gebeliğin sağlanmadığı, ciddi distal hastalığı ve kanülasyon veya balon tuboplastiye rağmen proksimal tıkanıklığı olan hastalar fazla vakit kaybedilmeden İVF programına alınmalıdır (1). Ektopik gebelik için iki kez konservatif cerrahi prosedür uygulanmış olan hastaların sadece %30'unda intrauterin gebelik gerçekleşecektir. Bu sebeple tubal faktöre bağlı tekrarlayan ektopik gebelik İVF-ET için bir endikasyon oluşturmaktadır (3). Tubal faktör infertilitesi olan İVF hastalarında sadece bir embryo transferi ile elde edilen gebelik oranları %11,5'dur (4).

b) Endometriozis: Endometriozise bağlı infertilitesi olan olgularda yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması ile endometriozisin reproduktif sistem üzerindeki etkileri (folikülogenez, fertilizasyon, embryo gelişimi ve implantasyon) daha net anlaşılmıştır (5). Endometriozisli olgular invitro fertilizasyon programına, başarısız medikal veya cerrahi tedaviyi takiben 1 ile 2 yıl içerisinde alınmalıdır. Bu olgularda prognoz hasta yaşı ve infertilite süresinin yanı sıra endometriotik lezyonların şiddet ve yaygınlığına bağlıdır. Endometriozis olguları, evre 1-2 patent tuba olarak kategorize edilirse transfer başına gebelik oranı %33,3 iken, tubal blokajı olan evre 3-4 olgularında %10'dur (6).

c) Sebebi açıklanamayan infertilite: Sebebi açıklanamayan infertilite terimi, 2 ile 5 yıllık düzenli seksüel ilişkiye rağmen, üreme sistemi ve hormon parametrelerinde infertiliteyi açıklayacak belirgin anomali ya da anormallik saptanamayan çiftler için kullanılır. İnfertil çiftlerin %15'i bu gruba dahildir (7). Sebebi açıklanamayan infertilite olgularında çiftlerde aylık gebelik oranı %1,5-3'tür. İzah edilemeyen infertilitenin tedavisi siklus doğurganlığını arttırmaya yöneliktir. İzah edilemeyen infertilitede süperovulasyon+intrauterin inseminasyon veya yardımcı üreme tekniklerinin uygu-

lanması gebelik oranlarını arttırmıştır (8). İzah edilemeyen infertilitesi olan hastalarda en azından bir embryo transfer edildiğinde siklus başına gebelik oranı %14.3 olarak belirlenmiştir (4).

d) Erkek faktörü: İnfertil çiftlerin yaklaşık %35'inde erkek faktörünün rol oynadığı bilinmektedir. İVF-ET erkek faktör infertilitesinde etyolojinin anlaşılması ve tedavisinde yeni imkanların devreye girmesini sağlamıştır. Erkek infertilitesinde fertilizasyonu asiste etmede devrim yaratan mikromanüplasyon tekniği, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonudur (İCSİ). İlk kez 1992'de tanımlanan İCSİ, ooplazm içine tek bir spermin direkt enjekte edilmesini kapsar, dolayısıyla hem zona bağlanmasını hem de sperm-oolemma füzyonunu bypass eder (9). İCSİ ile klinik gebelik oranı her bir siklus için %26'dır (1). İVF oligospermik erkeklerde mantıklı bir seçenektir. Fertilizasyon oranları swim-up sonrası sperm konsantrasyonu $1,5 \times 10^6$ olduğunda kabul edilebilir oranlardadır. Progresif motil spermatozoid sayısı $<1,5 \times 10^6$ ise fertilizasyon oranları düşüktür. Bu nedenle bu olgularda İCSİ önerilmektedir. İCSİ mükemmel fertilizasyon (%60-70) ve oldukça iyi implantasyon oranlarıyla sonuçlanmaktadır. İCSİ ile ejakulat spermelerinin yanısıra testiküler (TESE) ve epididimal spermeler de başarıyla kullanılabilir. Ancak fertilizasyon oranları ejakulat spermeleri ile karşılaştırıldığında testiküler ve epididimal spermeler ile %55-60'lara düşmektedir (10,11). İCSİ; normal oosit varlığında önceki İVF fertilizasyon başarısızlığı olan; zayıf semen parametreleri (dansite, motilite ve/veya morfoloji), negatif akrozom reaksiyonu yüzünden düşük oranda veya hiç fertilizasyonu bulunmayan veya yüksek titrede antisperm antikoru saptanan çiftlerde açıkça uygulanabilir bir seçenektir (2,12).

e) Servikal faktör ve ovulatuvar disfonksiyon: Servikal faktörler ve ovulatuvar problemler primer olarak İVF-ET endikasyonu oluşturmazlar. Servikal bypass tedavisine rağmen intrauterin inseminasyonun başarısız sonuç verdiği ve servikal mukusun medikal olarak arttırılamadığı durumlarda postkoital testin tekrarlanmasına rağmen etkisiz sonuçların ortaya çıktığı çiftlerde düşünülebilir. Fakat yine de bu durumlar izole durumlar oluştu-

ruyorsa IVF endikasyonu yoktur. Ancak ovulasyon bozukluğu olan hastalarda ovulasyon indüksiyonları ve intrauterin inseminasyon uygulamaları yapılmış olmasına rağmen gebelik elde edilememiş ise yardımcı üreme teknikleri ile tedavi endikasyonu vardır (4).

Yardımla Üreme Teknikleri ile Tedavide Başarıyı Etkileyen Faktörler

YÜT'deki tüm gelişmelere rağmen ortalama eve bebek götürme oranları henüz istenilen düzeylere ulaşmamıştır. YÜT ile tedavi sikluslarında ortalama eve bebek götürme oranı iyi prognozlu hastalarda siklus başına %35 iken kötü prognozlu olgularda %1-5'e düşmektedir. İVF, infertilite nedenlerinin çoğunun üstesinden gelebilmektedir. Ancak, ileri yaş *in vivo* fertilizasyonda olduğu gibi İVF' te de başarı oranlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Yardımla üreme teknikleri ile tedavide sonuçları etkileyen en önemli faktör maternal yaştır (13). Otuz beş yaşa kadar implantasyon oranı lineer olarak artarken otuz beş yaştan sonra implantasyon oranları progresif olarak yılda %2.8 oranında azalır. Ayrıca yaş ilerledikçe, primordiyal follüküllerin sayısının ve kalitesinin azalması yanında artan kromozomal anomaliler de fertiliteyi olumsuz yönde etkilemektedir (14,15).

Uterin kavitedeki herhangi bir yüzeysel lezyon (submüköz myom, intrauterin adhezyon veya endometriyal polip) lokal inflamatuvar cevap yaratarak (RIA benzeri etki) implantasyonu bozma potansiyeli taşır. Histerosalpingografi (HSG), Salin infüzyon sonogramı, endometriyal biyopsi ve transvajinal ultrasonografi potansiyel implantasyon problemlerini tespit edebilen diyagnostik testlerdir. Rutin diyagnostik histereskopi (H/S) İVF-ET hastalarında uygulayan Jacobs ve arkadaşları %20 vakada, endouterin yüzeysel lezyon tespit etmişlerdir. Küçük lezyonların bile implantasyonu bozma potansiyeli olduğundan, diyagnostik H/S veya salin sonografinin YÜT öncesi tüm hastalara yapılması önerilmektedir (16,17).

İVF-ET hazırlığında kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu (COH) takiben geç proliferatif fazda endometriyumun transvajinal ultrasonografi

(TV-USG) ile değerlendirilmesi ile tedavi sonuçları tahmin edilebilir. Child ve arkadaşları transfer günü endometriyal kalınlığın 8 mm'den az olmasının kötü prognozla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (19). Bunun yanı sıra hCG günü endometriyumun trilaminar görünümde olmamasının *in vitro* fertilizasyon sikluslarında zayıf prognozla ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (1,18,19). İVF uygulamalarında atravmatik bir embryo transferinin implantasyon oranlarını arttırdığı rapor edilmektedir (20). Ayrıca yüksek implantasyon oranları ile uterin kan akımındaki artış arasında bir ilişki olduğunu bildiren yayınlar da vardır (19).

İmplantasyon Teorisi

İnsan embryosunun implantasyonu hala tam olarak anlaşılamayan dinamik bir süreçtir. İmplantasyon süreci, gelişmekte olan blastosist ile uterin epitel arasındaki karmaşık bir dizi interaktif basamağı içerir. Bu basamakların herhangi birinde bir aksama meydana geldiğinde embryonun implante olabilme şansı azalır (18). İmplantasyon ve trofoblast invazyonu, halen gebeliğin oluşumundaki en önemli kısıtlayıcı faktör olarak gösterilmektedir. Adhezyon ve sonrasındaki invazyon esnasında embryo ile anne arasında görülen moleküler etkileşimler embryonun implante olabilmesi için hayati önem taşır. Gebeliklerin %60 kadarı peri-implantasyon döneminde kaybedilir. Bu dönemdeki kayıpların en önemli sebeplerinden biri embryo- maternal sinyal sisteminde görülen bozukluklardır (21).

İmplantasyon süreci ister doğal yollardan isterse de yardımcı üreme teknikleri ile olsun birbirine benzer şekilde gerçekleşir. Fertilizasyondan sonra, embryo tubayı 5,5-6 günde kateder. Embryo implantasyondan hemen önce yaklaşık bir hafta süren ve blastosist oluşumuna yol açan differansiyasyonuna uğrar. Bu iyi zamanlanmış bölünme işlemi sonucunda embryo blastosist aşamasına ulaşır ve aralarından bazıları 80-100 hücreli evreye ulaşarak uterusu implante olma özelliği kazanırken bazıları da 10-20 hücreli evre aşamasında kalarak uterusu implante olamazlar (22).

Zona pellusida gibi ekstra-embryonik matrikste bulunan proteinlerle yapılan çalışmalar embryonun bu dönemde embryo-maternal sinyal sisteminde yoğun olarak yer aldığını göstermektedir. İnsan embryosunda hatching 6. güne kadar gerçekleşmez ve bu dönemde ekstra-embryonik matriks (EEM, zona pellusida) anne ve embryo arasında adeta fonksiyonel bir bariyer oluşturur. Embryo-maternal sinyallerin bu ilk 6 gün boyunca hedefe ulaşabilmeleri için bu bariyerden (EEM) geçmeleri gerekmektedir (21).

İmplantasyonda ilk basamak, embryonun uterin epitelyum ile karşı karşıya gelmesi ve adhezyonun gerçekleşmesi ile başlar. Adhezyonu takiben embryo epitel hücreleri arasına doğru göç ederek stromayı istila eder ve takiben maternal dolaşıma β hCG salgılar. Primat embryoların implantasyonu sırasında koryonik gonadotropin salınımının endometriyumu direkt ve indirekt yollarla (progesteron ile artış gösteren luteotropik aktivite) etkilediği gösterilmiştir (21). Plazmada β hCG'nin tespit edilmesi embryoların implantasyonun ilk basamağını başarıyla geçtiğini ifade eder. İVF-ET sonrası gebeliklerin küçük bir kısmını biyokimyasal gebelikler oluşturur. Maternal kanda β hCG'nin tespit edilememesi implantasyonun birinci basamağındaki bir başarısızlığı ifade ederken, biyokimyasal gebeliklerin görülmesi ise 2. ya da daha ileri bir implantasyon basamağındaki başarısızlığı gösterir. İn vitro fertilizasyonda implantasyonla ilgili ana problem embryoların uterin epitele bağlanamaması nedeniyle implantasyonun ilk basamağındadır (23). Embryo, adhezyonu takiben endometriyal hücreler arasına doğru göç ederken bazal membranı yıkan ve prostoglandin aracılığıyla lokal ödem oluşturan enzimler üretir ve bu enzimler epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantıları yıkarak trofoblastik hücrelerin endometriyal stromaya invazyonunu kolaylaştırır. Trofoblastik penetrasyonun derinliği trofoblastik proteazlar ile desidual proteaz inhibitörleri arasındaki denge ile ayarlanır. Trofoblastların maternal spiral arterioller boyunca ilerleyip hedeflerine ulaştıklarında sentezledikleri ekstraselüler matriks proteinleri ise çevre dokulara

tutunmalarını kolaylaştırır (22). Blastosist, uterusu tutunduktan sonra östrojen, hCG, trombosit aktive edici faktör (PAF) yanında erken gebelik faktörü de (EPF) sentezleyerek konağa sinyal göndermeye başlar. İmplantasyonu takiben embryo tarafından salınan östrojen ve hCG lokal olarak etki ederek endometriyumun desidualizasyonunu sağlar. Progesteron bir yandan prostoglandin E_2 'nin makrofajlar tarafından sentezini artırarak endometriyumun desidualizasyonunu hızlandırırken diğer yandan uterusun irritabilite ve kontraktilesini azaltır. Ayrıca progesteronun immünsupresif özelliğinin hCG ile birlikte fetal allogreftin kabulünü kolaylaştırdığı düşünülmektedir (24,25).

İmplantasyondan hemen sonra insan trofoblastları içte sitotroblast ve dışta sinsityotroblast tabakalarına farklılaşır ve sitotroblastların sinsityotroblastlara farklılaştığı işleme sinsitya-lizasyon denir. Gebelik boyunca embryo ve takiben fetusun besin değişimi sinsityotroblastlarda gerçekleşir. İmplantasyonu takiben uygun sinsityalizasyon olmazsa konseptusun viabilitesi kısıtlanır ve hayatta kalması zorlaşır (23).

İmplantasyon aşamasında hem trofoblastlar hem de desidua tarafından birçok büyüme faktörü, sitokin ve parakrin faktör yanında adhezyon molekülleri de sentezlenir. Endometriyumu işgal eden trofoblastlar ile konakçı arasındaki ilişki, sitokinler (IL-1, 3, 4, 6, 7, 8, 11 ve 12) ile büyüme faktörleri (EGF, TGF, PDGF, IGF, CSF ve FGF) arasındaki interselüler sinyallerle düzenlenir (23).

İmplantasyonu Regüle Eden Sitokin ve Büyüme Faktörleri

a) IL-1 ailesi; interlökin-1 ailesi IL-1 α , IL-1 β , IL-1R ve IL-1ra'dan oluşur. Preimplantasyon döneminde insan embryosunda IL-1 β , IL-1Rtl ve IL-1ra mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (26). Simon ve arkadaşları embryo tarafından salınan IL-1'in adhezyon öncesi endometriyumda lokalize değişikliklere yol açtığını rapor etmişlerdir (27). Blastosistin reseptif endometriyuma ilk yanıtı, IL-1 β (aktif olan ilk sitokin) sekresyonudur. İn vitro

çalışmalardan elde edilen sonuçlar IL-1'in, luminal epitelyumda bulunan reseptörlerine bağlanması ile endometriyal prostaglandin E₂, LIF ve integrin β₃ gibi ikincil sitokinlerin salınımını indüklediğini göstermiştir (28). Salınım bu sitokinlerin reseptörlerine bağlanması, blastosist adhezyonu için esansiyel olan adhezyon ve anti-adhezyon moleküllerinin ekspresyon paterninde moleküler değişiklikleri başlatarak implantasyon sürecinde rol alır (28).

b) İnterlökin 11: Son zamanlara kadar implantasyonda rolü olduğu bilinmiyordu. IL 11 reseptörü olmayan fareler üretilirken fenotipik olarak normal ancak dişilerinin infertil olduğu görülmüştür. IL 11'in implantasyon sırasında primer desidual cevabı kuvvetlendirerek normal desidualizasyonun devamında rol oynadığı düşünülmektedir (29).

c) Lösemi inhibe edici faktör: Hemopoetik hücre serisi fonksiyonunun regülatörü olarak tanımlanan LIF'in farelerde ve maymunlarda implantasyon için esas olduğu gösterilmiştir. Birçok otör LIF'in insanlarda da benzer bir rolü olduğunu düşünmektedir. LIF blastosistin implantasyonu sırasında endometriyal glandlarda yüksek konsantrasyonlarda eksprese edilir. LIF'in invivo olarak temel fonksiyonunun blastosistin büyümesini regüle etmek ve implantasyonu başlatmak olduğu düşünülmektedir. Ayrıca LIF'in sitotroblastlarda bir yandan fibronektin sentezini artırarak diğer yandan da hCG sentezini azaltarak trofoblastların daha invaziv hale gelmelerini sağladıkları da rapor edilmiştir (30-32).

Cullinan ve arkadaşları insanlarda LIF'in endometriyal ekspresyonunun farelerde olduğu gibi implantasyonun modülasyonunda önemli bir rol aldığını ileri sürmüşlerdir (33). Bir başka çalışmada ise implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda fertil kadınlarla karşılaştırıldığında menstruel siklus sırasında endometriyum tarafından LIF üretiminde ciddi bir defekt olduğu rapor edilmiştir (34). Leede ve arkadaşları ise bu çalışmaların aksine uterus yıkama sıvılarında düşük konsantrasyonlar da LIF tespit edilen hastaların

gebelik şansının daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. (35). Sonuç olarak bugüne kadar yapılan çalışmalarla LIF'in implantasyonda rol aldığı ancak bu süreçteki esas rolünün ne olduğu hala netlik kazanmamıştır.

d) Epidermal büyüme faktör ailesi: Epidermal growth faktör (EGF), transforming growth faktör-α (TGF-α), heparin binding EGF (HB-EGF), amfiregulin, ve betaselülin epidermal büyüme faktör ailesinin üyeleridir (36). Bunların hepsi etkisini EGF reseptörü üzerinden gösterir. EGF, östradiolün uterus üzerine etkisinin mediatörü olan bir polipeptiddir (37). HB-EGF farede blastosist gelişmesini, zona delinmesini ve trofoblast büyümesini uyarır. Epidermal growth faktör ailesi; bir yandan steroidin endometriyal büyüme ve endometriyal diferansiyasyonu üzerindeki etkisine aracılık ederken diğer yandan da erken implantasyonun kanıtı olan, endometriyumu atake eden blastosisti saran luminal epitelyumun oluşumunu indükler (38).

e) Koloni stimulan faktör-1: Koloni stimulan faktör-1 (CSF-1), plasenta ve plazmada ölçülebilir düzeylerde bulunan nadir sitokin ve büyüme faktörlerinden biridir. Endometriyum epiteli tarafından salgılanan CSF-1'in trofoektodermdaki reseptörleri üzerinden blastosist apozisyonunu uyardığı sanılmaktadır. İnsanlarda invitro çalışmalarda CSF-1'in trofoblast proliferasyon ve differansiyasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (39). İnsan endometriyumunda sekretuar dönemde CSF-1 ekspresyonu artar, ayrıca ilk trimesterde desidual dokularda CSF-1 mRNA ve immünreaktif CSF-1 ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir (40). Böylece artmış CSF-1 düzeylerinin otokrin ve parakrin yollarla implantasyon, desidual fonksiyon ve plasental büyümede rol aldığı düşünülmektedir (28).

f) Tümör nekrozis faktör; Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), makrofajlar tarafından üretilen bir polipeptiddir. TNF-α, endometriyal hücreler ve desidual makrofajlar tarafından salınarak selüler büyüme, diferansiyasyon ve çeşitli maddelerin salınımına yol açar (41). İnsan endometriyumunda; desidua ve trofoblastlarda TNF-α mRNA ve reseptör

törünün ekspresyonu gösterilmiştir. İnsanlarda ilk trimesterde villuslerin sinsityotrofoblastik tabakasında TNF- α saptanmıştır. Bu bulgu TNF- α 'nın diğer endometriyal ve trofoblastik faktörler ile beraber trofoblast implantasyonunun tüm aşamalarında (adhezyon, tutunma ve invazyon) düzenleyici bir rol aldığını düşündürmektedir (42).

İmplantasyon penceresi ve bio-markerler; menstruel siklusun luteal fazında endometriyumun farklı komponentlerinde; glandüler ve yüzey epiteli, stromal hücreler, stromal damarlar ve ekstraselüler matrikste bir seri değişiklikler görülür ve bu değişiklikler sonucunda endometriyum reseptif hale gelir. Endometriyumdaki bu değişikliklerin bazıları erken gebelik döneminde de devam ederken bazıları ise sınırlı bir yaşam süresine sahiptir. İmplantasyon penceresi döneminde uterin reseptivite hakkında bilgi verebilecek bir takım morfolojik ve biyokimyasal markerlar tanımlanmıştır (43).

a) Morfolojik marker; İVF'da uygulanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyonun yarattığı ana problemlerden biri endometriyal faktörlerdeki değişimlerdir (44). İVF sikluslarında fazla sayıda oosit elde etmek için kullanılan ovulasyon indüksiyon ilaçları suprafizyolojik seviyelerde steroid hormon üretimine yol açarak endometriyal reseptiviteyi ve takiben implantasyonu olumsuz yönde etkilerler (45). İVF-ET çalışmaları normal 28 günlük siklusu olan kadınlarda implantasyon aralığının 19. ve 21. günler arasında olduğunu göstermiştir. Elektron mikroskop çalışmalarında uterin reseptivite döneminde membran morfolojisinde dramatik değişikliklerin olduğu gösterilmiştir. Bilhassa birçok türde pinopod adı verilen uterin epitelyumdan uzanan geniş sitoplazmik projeksiyonlar tanımlanmıştır. Pinopodların ortaya çıkış zamanı muhtemel endometriyal reseptivite dönemi ile eş zamanlı olup siklusun 19 ile 21.günleri arasında 24-48 saat süreyle devam etmektedir. Pinopodların fonksiyonunun ne olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte endometriyal reseptivite döneminde ortaya çıkmaları implantasyon aralığının tespitinde morfolojik marker olarak kullanılacaklarını düşündürmektedir (46,47).

b) Glikokaliks tabakası ve MUC-1 protein;

Uterin epitelin non-adheziv özelliği kısmen yüzey epitel hücrelerini kaplayan glikokaliks tabakasına bağlıdır. Farelerde bu reseptif dönem boyunca yüzey epitel hücrelerinin apikal plazma membranlarındaki endometriyal glikokaliks tabakasının kalınlığı azalır (48). İnsanlarda yüzey epitelinde MUC-1 ekspresyonu implantasyon aşamasında pik yaparken farelerde bu dönemde MUC-1 seviyesi minimuma inmektedir (49). Polimorfik epitelyal musin olarak da bilinen MUC-1, endometriyal epitelyumun sekretuar bir ürünüdür. Birçok çalışma, insanlarda MUC-1'in implantasyonda rol aldığını düşündürmektedir ancak MUC-1'in implantasyondaki kesin rolü hala netleşmemiştir. MUC-1'in implantasyonu engelleyen ve implantasyon için kaybolması gereken bir etken olduğu sanılmaktadır (50). MUC-1 eksprese edici hücrelerdeki adhezyon ve anti-adhezyon güçleri arasındaki hassas dengenin integrinin güçlendirilmesi sonucu adhezyon yönünde ya da MUC-1 seviyesindeki artışla anti-adhezyon yönünde değişebileceği ileri sürülmektedir (51).

c) İntegrinler; embryonun uterus duvarına ilk olarak tutunmasından sorumlu olan adhezyon molekülleri integrin ve katedrinlerdir (22,23,52). Lessey ve arkadaşları integrinlerin de implantasyon penceresinde rol aldığını ve siklusun 20-24. günleri arasındaki dört günlük periyotta (implantasyon penceresi dönemi) özellikle integrinin α_1 , α_2 ve subünitlerinin glandüler epitelyumda ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Siklusun 20. gününde aniden ortaya çıkan ve vitronektin reseptörü olan $\alpha_5\beta_3$ 'ün implantasyon penceresini açtığını ve ovulasyondan siklusun 24. gününe kadar mevcut olan fibronektin reseptörü $\alpha_4\beta_1$ 'in ortadan kalkmasının ise implantasyon penceresini kapattığını göstermişlerdir (53). Trofoblastların invazyon ve migrasyonu bu hücre adhezyon molekülleri sayesinde gerçekleşir. İntegrin ve katedrinler spesifik ekstraselüler matriks (fibronektin, tip I kollajen ve vitronektin) proteinlerine tutunup trofoblastik ve desidual hücrelerin iletişimini sağlayarak, immün surveilansı arttırırlar. Endometriyumun değişik tabakalarında integrin aktivite ve ekspresyonunda bölgesel farklılık-

ların olduğu gösterilmiştir. İntegrin α_4 ve β_3 alt ünitelerinin kombinasyonu, uterin reseptivitenin maksimum olduğu dönemde sekretuar endometriyumda fazlaca eksprese edilir. İntegrinin β_3 alt ünitesinin “implantasyon penceresinin” açıldığına güvenilir bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (22,23).

d) Glikodelin; endometriyal glandüler hücrelerin oligosakkarit yapılı bir ürünü olan glikodelin, sadece üreme organlarında tespit edilmektedir (fallop tüpü, endometriyal doku, ovaryan karsinoma dokusu, ovaryan kist sıvıları). Glikodelin özellikle sekretuar ve desidualize olmuş endometriyumda sentezlenir ve öncelikle glandüler ve uterin lümenine daha sonra da az miktarda da olsa sirkulatuvar sisteme sekrete edilir. Glikodelinin implantasyon ve gebelik ile ilgili biyolojik fonksiyonları hala kesinleşmemekle birlikte invitro ortamlarda naturel killer hücrelerinin aktivitelerini suprese ettiği ve bu özelliğinden dolayı immünsupresif bir mikroçevre sağlayarak fertilize ovum/preembryoyu koruduğu ileri sürülmektedir. Böylece teorik olarak glikodelin periovulatuvar dönemde endometriyumda fertilizasyona izin verirken, fertilizasyon sonrası artan düzeyleri ile embryoyu koruyarak implantasyonda rol almaktadır (54,55). Plazmada ölçülen glikodelin düzeyleri endometriyal reseptivitenin biyokimyasal belirteci olarak basit, noninvaziv ve güvenilir bir marker olabilir. Ancak bir çok çalışmada normal ve patolojik durumlardaki plazma glikodelin düzeylerinin belirgin oranda çakıştığı gösterilmiştir. Bu yüzden endometriyal fonksiyon testi olarak plazma glikodelin düzeylerinin ölçümünün klinik olarak faydalı olup olmadığının anlaşılması için daha geniş araştırmalara ihtiyaç vardır (28).

g) Ebaf; endometrial bleeding associated factor (ebaf), TGF- β ailesinin yeni bir üyesi olarak tanımlanmıştır. İmplantasyon penceresi döneminde implantasyon gerçekleşmezse bir seri değişiklik sonucu endometriyum, implantasyona refrakter hale gelir ve takiben menstruel kanama başlar. ebaf mRNA'sı menstruel kanama başlamadan hemen önce geç sekretuar fazda ve menstrüasyon sırasında endometriyumda saptanır (56,57). Normal

fertil kadınların serum ve endometriyumunda implantasyon penceresi zamanında ebaf ekspresyonu belirgin olarak düşmektedir. Endometriozisli hastalarda ise endometriyal reseptivite döneminde ebaf proteinin artmış olduğu gözlenmiştir. Bazı infertilite tiplerinin endometriyumdaki ebaf ekspresyonunun disregülasyonu ile ilgili olabileceği ve bu gibi marker proteinlerin uterin reseptivitedeki moleküler defektleri saptamada kullanılabileceği düşünülmektedir (58). Kısaca ebafın premenstruel moleküler repertuarın bir üyesi olduğu ve nonreseptiv endometriyumun bir markerı olabileceği düşünülmektedir.

Sekretuar endometriyumun desiduaya dönüşümünde uterusu spesifik naturel killer (NK) hücrelerinde anlamlı bir artış olur. Endometriyumdaki NK yoğunluğu proliferatif fazda düşüktür. Sekretuar fazda hızla artar ve implantasyon zamanında çok yüksek sayılara ulaşır. Bu naturel killer hücrelerin fenotipi CD 56 (parlak), CD 16-, CD3- dür. Bunlar desidua lökositlerinin 2/3 ünü oluşturur (42). Fetal hücrelerde; HLA Class I antijenleri sentezlemediğinden rejeksiyon gibi bir durum söz konusu değildir. Fakat fetal hücreler HLA-G antijeni salgırlar bu antijen trofoblastlara özgüdür ve HLA-G ve NK hücreleri arası etkileşim trofoblastik invazyonu yönlendirir (22,59,60).

Embryo Kalitesi

Embryo kalitesi, her bir embryonun tek tek genetik özelliklerine ve çevresel faktörlere bağlıdır. Embryonun kültür ortamındaki ihtiyaçlarını karşılayarak embryo kalitesini etkileyen çevresel faktörler geliştirilebilir. Embryonun kültür ortamı ile ilgili yeni gelişmeler invitro ortamda daha fazla blastosist gelişmesini sağlamıştır (22). Embryonun blastosist evresinde (fertilizasyondan 5gün sonra) transferi implantasyon oranını arttırmaktadır. Bu metod embryo kalitesini arttırmaktan ziyade daha uzun hayatta kalma ihtimali olan embryoyu seçmeye yardım eder. Blastosist evresinde yapılan transfer klinisyene sınırlı sayıda embryo transferine izin verir ve böylece yardımcı üreme teknikleri ile ilişkili çoğul gebelik oranlarını azaltabilir (61). İVF sikluslarında iki embryo transferi ile gebelik oranla-

rı %50'lere ulaşır bu başarıya ulaşmak için en iyi embriyoları seçip transfer etmek gerekmektedir. Embryo morfolojisi ve gebelik arasındaki korelasyonların sonucu olarak embriyologlar transfer edilen embriyoların kalitesini belgelemek için evreleme şeması kullanırlar. Bu şemaların çoğu sitoplazmik fragmantasyon ve büyüme hızıyla ilişkiyken bazıları da zona pellusida kalınlığı, blastomer büyüklüğü ve düzenliliği gibi başka faktörleri kapsar. Grade I; mükemmel morfolojiyi anlatmak üzere eşit büyüklükte blastomerleri olan ve sitoplazmik fragmanları olmayan preembriyoyu ifade eder, farklı büyüklükteki blastomerlerin ve preembryo yüzeyinin kaplayan minör sitoplazmik fragmanların artması embryo grade'ini olumsuz yönde etkileyerek grade'i artırır ve takiben başarı şansını azaltır (62,63). Kadın yaşı ilerledikçe anöploid embryo sayısı artar ve bu anöploid embriyoların tümünü morfolojik kriterler ile tanımak her zaman mümkün değildir. Anöploid embriyoların çoğu blastosist aşamasına ulaşmış bunların da bazıları implante olabilmektedir.

Sonuç olarak implantasyonu klinik ve moleküler birçok faktör etkileyebilmektedir. YÜT'de implantasyonda embryo ve endometriyum esas rol oynarken transfer tekniği de başarıyı etkileyen önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Assisted reproduction. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994: 1133-48.
2. Vicdan K, Işık A. İnfertilite ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri. In: Vicdan K, Işık A, eds. *İnvitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar*, 1999: 17-2.
3. DeCherney AH, et al. Reproductive outcome following two ectopic pregnancies, *Fertil Steril* 1984; 43:82.
4. Damewood M. In vitro fertilization and assisted reproductive technologies. In: Wallach E, Zacur HA(eds). *Reproductive Medicine and Surgery*, 1997: 845-59.
5. Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000 Jan-Feb; 6(1):67-74.
6. Schmidt CL. Endometriosis. A reappraisal of pathogenesis and treatment. *Fertil Steril* 1995; 44:157.
7. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. *Fertil Steril* 1983; 39-5.
8. Kahraman S, Yakın K. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon. In: Kahraman S, Yakın K, eds. *Ovulasyon İndüksiyonu*, 2000:6-20.
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340 17-8.
10. De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection. In: Ottosen B, Tabor A, eds. *New Insights in Gynecology & Obstetrics. Research and Practice*, Carnforth, UK Parthenon Publishing, 1997: 89-96.
11. Mansour R. Intracytoplasmic sperm injection. A state of the art technique. *Hum reprod update* 1998; 4:43-56.
12. Van steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8:1061-6.
13. Rogers P, Leeton. Uterine receptivity and embryo transfer. In: Trounson AO, Gardner DK, eds. *Handbook of in vitro fertilization*, 2nd ed., CRC Pres, FL, 2000: 499-528.
14. J Fitzgerald C, Zimon AE, Jones EE. Aging and reproductive potential in women. *Yale J Biol Med* 1998 Sep-Oct; 71(5): 367-81
15. Krey L, Liu H, Zhang J, Grifo J. Fertility and maternal age strategies to improve pregnancy outcome. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Sep; 943:26-33.
16. Fahri J, Ashkenazi J, Feldberg D, Dicker D, Orvisto R, Ben Rafael Z. Effect of uterine leiomyomata on the result of in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 1995; 10:2576-8.
17. Goldenberg M, Sivan E, Sharabi Z, Mashiac S, Lipitz S, Seidmen DS. Reproductive outcome following hysteroscopic management of intrauterine septum and adhesions. *Hum Reprod* 1995; 10:2663-5.
18. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation. *Advances and challenges. Science* 2002 Jun 21; 296(5576):2185-8.
19. Child TJ, Gulekli B, Sylvestre C, Tan SL. Ultrasonographic assessment of endometrial receptivity at embryo transfer in an in vitro maturation of oocyte program *Fertil Steril* 2003; 79(3):656-58.
20. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst and culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13:3434-40.
21. Herrer A, Rango U, Beier H. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation *Nov* 2002; 6(2):244-56.
22. Sher G, Zouves C. Optimizing implantation and therapeutic considerations. In: Brinsden PR (eds). *A textbook of In vitro Fertilization and Assisted Reproduction the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice* 1999: 267-83.
23. Sjöberg ON, Hamberger L. Blastocyst Development and Early Implantation 1999: 29-35.
24. Jones H, Cohen J, Hamberger L. The 4th Bourn Hall Conference. *Hum Reprod* 13 (Suppl) 1998.
25. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts. A feasible proportion for human İVF. *Hum. Reprod. Update* 1997; 3:367-82.

26. Krussel JS, Simon C, Rubio MC, Pape AR, Wen Y, Huang HY. et al, Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998; 13:2206-11.
27. Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Conner JE, Remohi J, Polan ML, 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; 82:2607-16.
28. Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, Islin H, Hviid T, Rex S, Bangboll S, Sorensen S. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril* August 2002; 78(2):221-33.
29. Robb L, Li R, Hartley L, Nadurkar HH, Koentgen F, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for IL-11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nature Med* 1998; 4:303-8.
30. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arıcı A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation. A potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:801-6.
31. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12:569-74.
32. Bischof P, Haeggeli L, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:225-30.
33. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF reseptor expression in human endometrium suggest a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *USA, Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:3115-20.
34. Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:137-43.
35. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin J, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002; 17(1):213-8.
36. Giudice LC. Implantation and endometrial function. In: Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF III, Van Steirteghem A, eds, *Molecular biology in reproductive medicine*, The Parthenon Publishing Group, Lancs, 1999: 333-52.
37. Nelson KG, Takahaski T, Lee DC, et al. Transforming growth factor- α is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 1992; 131:1657-64.
38. Das SK, Wang XN, Paria BC, et al. Heparin-binding-EGFlke growth factor gene is induced in the Mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition. A possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994; 120:1071-83.
39. Saito S, Saito M, Enomoto M, Ito A, Motoyoshi K, Nakagawa et al, Human macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation of trophoblast. *Growth Factors* 1993; 9:11-19.
40. Kauma S.W, Aukerman SL, Eirimen D, Turner T. Colony-stimulating factor-1 concentrations in blood and follicular fluid during the human menstrual cycle and ovarian stimulation: possible role in the ovulatory process. *Hum Reprod* 1999; 14:1302-6.
41. Nardo G. L, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *JReprod Med* 2003;48:137-147.
42. Ben-Yair E, Less A, Lev S, et al. Tumour necrosis factor α binding to human and Mouse trophoblast. *Cytokine* 1997; 9:830-6.
43. Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Fere F. Embryo-maternal interaction at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet & Gynecol Reprod Biol* 1999; 83(1): 85-100.
44. McLean-Morris J, Van Wagenen G. Interception. The use of the preovulatory estrogens to prevent implantation. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1973; 115:101-6.
45. Gidley-Baird AA, O'Neil C, Sinosich MJ. et al. Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: The effect of altered P/E ratios in human and mice. *Fertil. Steril.* 1986; 45: 69-75.
46. Bentin-Ley U. Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. *Human Reproduction.* 2000; 15:67-73.
47. Martel D, Monier MN, Roche D. et al. Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Human Reprod* 1991; 6:597-603.
48. Morris JE, Potter SW. An in vitro model for studying interactions Mouse trophoblast and uterine epithelial cells. A brief review of in vitro systems and observations on cell-surface changes during blastocyst attachment. In: Denker HW, Aplin JD, eds. *Trophoblast research, vol.4 trophoblast invasion and endometrial receptivity. Novel aspects of the cell biology of embryo and implantation.* New York, Planum Medical Book Corp, 1990: 51-69.
49. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Human Reprod* 1995; 10869.
50. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:337-42.
51. Giudice LC. Potencial biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999; 14 Suppl 2:3-16.
52. Vinatier D. Integrins and reproduction. *Contracept Fertil Sex* 1995 May; 23(5):327-34.
53. Lessey BA, Castebaum A, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62:497-506.
54. Seppala M, Bohn H, Tatarinov Y. Glycodelins. *Tumour Biol* 1998; 19:213-220.
55. Okamoto N, Uchida A, Takakuru K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen et al. Supression by human placental protein 14 of naturel killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26:137-42.

56. Daftary GS, Taylor HS. Molecular markers of implantation. Clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001 Jun; 13(3):269-74.
 57. Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ, Chegini N, Tabıbzadeh S. 1997 Detection of ebaf, a novel human gene of the TGF- β superfamily. Association of gene expression with endometrial bleeding. *J Clin Invest* 99:2342-50.
 58. Tabıbzadeh S, Mason JM, Shea W, Cai Y, Murray M, Lessey B. Dysregulated expression of ebaf, a novel molecular defect in the endometria of patients with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2526-36.
 59. Arıcı AMD. Molecular markers of implantation. October 1997. Thirtieth Annual Postgraduate Program, Course IV, 21st Century Art. Embracing Change, Cincinnati, Ohio.
 60. Beer AE, Kwak JYH, Ruis JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:376-82.
 61. Gardner DK, Schoolcraft, WB, Wagley L, et al. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. *Hum. Reprod* 1998; 13:3434-40.
 62. Veede L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veede, ed. *An Atlas of human Gametes and conceptuses*, 1998: 46-51 London.
 63. Claman P, Armant DR, Seibel MM, et al. The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987; 4:218.
-

Geliş Tarihi: 07.03.2003

Yazışma Adresi: Dr.Candan İLTEMİR DUVAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,
ANKARA