



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI

SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ İLE TEKRARLAYAN
İMPANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN KADINLARDA NK
HÜCRELERİ ÜZERİNDE EKSPRESE EDİLEN VE SOLUBLE
HLA-G MOLEKÜL KANTİTASYONUNUN İNCELENMESİ**

Dr. Sare Merve Yılmaz Bulut

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL – 2023



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI

SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ İLE TEKRARLAYAN
İMLANTASYON BAŞARISIZLIĞI OLAN KADINLARDA NK
HÜCRELERİ ÜZERİNDE EKSPRESE EDİLEN VE SOLUBLE
HLA-G MOLEKÜL KANTİTASYONUNUN İNCELENMESİ**

Dr. Sare Merve Yılmaz Bulut

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Enis Özkaya

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL - 2023

TEŞEKKÜR

‘Hayatımın ve sanatımın saflığını koruyacağım’

Başhekimimiz Doç. Dr. İlhan ŞANVERDİ’ye, eğitim sorumlumuz Prof. Dr. Sadık ŞAHİN ve Prof. Dr. Pınar KUMRU’ya,

Eğitim sürecimizde her zor anımızda yanımızda olan, cerrahi deneyimlerini bize aktaran ve hekimlik adına çok şey katan Doç. Dr. Çetin KILIÇÇI ve Doç. Dr. Resul KARAKUŞ’a

Asistanlığım süresince tüm bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan sorduğum soruları cevapsız bırakmayan kendilerinden çok şey öğrendiğim birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum hocalarım Prof. Dr. Oya Demirci, Doç. Dr. Erbil ÇAKAR ve Op. Dr. Sultan Seren KARAKUŞ’a

Mesleki ve akademik kimliğiyle bilgisini ve yardımını esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Enis ÖZKAYA ve tezimin her sürecinde büyük bir fedakarlıkla her zaman yardımına koşan tezimi tamamlayabilmemdeki en büyük paya sahip olan, hekimlik başta olmak üzere hayatımın her aşamasında örnek aldığım Op. Dr. Müşerref Banu YILMAZ’a

Birlikte çalışırken büyük keyif aldığım aile gibi olduğumuzu hissettiğim tüm eş kıdemlerime ve çalışma arkadaşlarıma,

Tez sürecinde bana çok yardımcı olan Zeynep Kamil Tüp Bebek ünitesinin ve septik bölümünün çalışanları başta olmak üzere tüm Zeynep Kamil ailesine

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan bizi büyük bir özveri ile yetiştiren evlatları olmaktan gurur duyduğum sevgili annem Ayfer YILMAZ, babam Kamil YILMAZ ve canım kardeşlerime,

Asistanlık sürecim boyunca iyi günde ve kötü günde her zaman en büyük destekçim olan hayatı birlikte paylaştığımız sevgili eşim Oğuzhan BULUT’a ve tez yazım sürecimde filizlenerek gelişen yorulduğum anlarda minik tekmeleriyle bana güç veren sabırsızlıkla gelmesini beklediğimiz sevgili oğlumuz Atlas’a sonsuz teşekkürlerimle...

Dr. Sare Merve Yılmaz

İstanbul - 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
TABLO DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
RESİM DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNFERTİLİTE	3
2.2. İMPLANTASYON-EMBRİYO VE ENDOMETRİUM ETKİLEŞİMİ.....	3
2.2.1. Endometrimun İmplantasyona Hazırlanması	4
2.2.2. Endometrial Günleme (Dating) ve Noyes Kriterleri	6
2.2.3. Embriyonun İmplantasyon Süreci	8
2.3. HLA-G VE İMPLANTASYON.....	9
2.4. NK HÜCRELERİ VE İMPLANTASYON	11
2.5. İMPLANTASYON AŞAMALARI.....	13
2.5.1. Apozisyon Evresi	13
2.5.2. Adezyon Evresi	13
2.5.3. İnvazyon Evresi	13
2.6. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI	14
2.6.1. Tanım	14
2.6.2. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlık Nedenleri	14
2.6.2.1. Gamet-Embriyo Faktörü.....	14
2.6.2.2. Uterin ve Endometriyal Faktörler.....	15
2.6.2.3. Hidrosalpinks	16
2.6.2.4. Trombofilik Faktörler	16
2.6.2.5. İmmünolojik Faktörler ve Endometrial Reseptivite	16
2.7. KONTROLLÜ ENDOMETRİAL HASARLAMA	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21

3.1. İSTATİKSEL ANALİZ	23
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ	41
7. KAYNAKÇA.....	42



KISALTMALAR

ART	: Asisted Reproductive Techniques (Yardımcı Üreme Teknikleri)
CD	: Cluster of Differentiation
HLA-G	: Human Leukocyte Antigen
DNA	: Deoksiribo Nükleik Acid
ECM1	: Ekstraselüler matrix protein-1
HCG	: Human Chorionic Gonadotropine
HOX	: Homeobox gen
IHC	: İmmünohistokimya
IVF/ICSI	: In Vitro Fertilizasyon / Intra Cytoplasmic Sperm Injection
IUI	: Intra Uterin İnseminasyon
LH	: Luteinize Edici Hormon
RIF	: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (Recurrent Implantation Failure)
CSF-1	: Colony stimulating factor 1
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
uNK	: Uterin Natural Killer
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
β	: Beta
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embryology
E2	: Estradiol
LH	: Luteinizan Hormon
PRL	: Prolaktin
TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
MFI	: Ortalama Floresan Yoğunluğu
HSC	: Hematopoetik Kök Hücre
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GnRh	: Gonadotropin Relasing Hormon
HCG	: Human Koryonik Gonadotropin
IL	: Interlökin
IFN	: Interferon

TNF	: Tumor Nekrozis Faktör
PGT	: Preimplantasyon Genetik Test
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
ILT	: immunglobulin benzeri transkript
NKG2	: CD159
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
EPF	: Early Pregnancy Factor(Erken Gebelik Faktörü)
PGE2	: Prostaglandin E2
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
PAS	: Periyodik Asit Schiff
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
KIR	: Killer-cell immunoglobulin-like receptor(Öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör)
DOR	: Düşük over rezervi

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Infertilite alt gruplarına göre bazal hormon düzeylerinin ortalaması	24
--	----



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Kontrol ve çalışma grubunun uterin NK incelemesi (yüzde ve MFI).....	25
Şekil 2: Kontrol ve çalışma grubunun total ve uterin NK hücreleri yüzeyinde ifade edilen HLA-G incelemesi (yüzde ve MFI)	26
Şekil 3: Kontrol ve çalışma grubunun NK üzerindeki CD158-CD159a reseptörlerinin karşılaştırılması.....	27
Şekil 4: Kontrol ve çalışma grubunun HLA-G ifadesine sahip NK hücreleri üzerinde eksprese edilen CD158 ve CD159a reseptörlerinin karşılaştırılması	27
Şekil 5: Açıklanamayan infertilite ve DOR grubu hastaların uterin NK hücre ve HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri	28
Şekil 6: Açıklanamayan infertilite ve DOR grubu hastaların CD158 ve CD159 NK hücre reseptörlerinin karşılaştırılması.....	29
Şekil 7: Hasta gruplarının implantasyon deneme sayıları ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI).....	30
Şekil 8: Hasta gruplarının prolaktin seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)	31
Şekil 9: Hasta gruplarının FSH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI).....	32
Şekil 10: Hasta gruplarının LH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)	33
Şekil 11: Hasta gruplarının estradiol seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)	34
Şekil 12: Hasta gruplarının TSH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)	35

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Usg'ye göre endometrial morfoloji sınıflaması	6
Resim 2: Noyes kriterleri altındaki temel özelliklerle, adet döngüsünün 16-24 günlerinde endometriyumun histolojik analizi için H&E boyaması	8
Resim 3: Sınıf I MHC molekulu	10



ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı nedeni belirlenemeyen tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların mid-luteal dönemde alınan endometrial biyopsilerinde NK hücreleri üzerindeki HLA-G,CD49a,CD158,CD159a ekspresyonunu değerlendirerek implantasyon başarısını öngörmeye kullanılabilişliğini araştırmaktır.

Materyal Ve Metod: Çalışmamız Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Kliniği'nde Mayıs 2023-Ağustos 2023 tarihlerinde IVF tedavisi olan ve gerekli kriterleri karşılayan 22 hasta çalışma grubu ve 16 kontrol grubu ile yapılmıştır.Hastalara transferden önceki sikluslarının 21-24.gününde kontrollü endometrial hasarlama yapılarak alınan endometrial örnek doku laboratuvarına transfer edilmiştir.Burada CD45+ hücre popülasyonu üzerinde lenfosit grubundan kapılama yapılarak ; NK hücreleri CD56 ifadelerine göre değerlendirilmiş, kapılanan NK hücre alt tipleri üzerinde HLA-G ifadesi değerlendirilmiştir. Endometrial NK hücrelerinin alt tiplerinde ayrıca öldürücü hücre immünglobulin-benzeri reseptörler CD158 ve CD159a ifadeleri analiz edilmiştir.

Bulgular: Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda kontrol grubuna göre uterin NK yüzdesi açısından anlamlı fark bulunamamış olup MFI(ortalama floresan yoğunluğu) çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek çıkmıştır($p<0.05$) .NK üzerinde eksprese edilen HLA-G yüzde ($p<0.001$) ve MFI($p<0.05$) olarak incelendiğinde çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. NK hücreleri üzerindeki yalnızca CD158 ekspresyonu çalışma grubunda ($p<0.05$), yalnızca CD159a ekspresyonu kontrol grubunda($p<0.05$) hem CD158 hem de CD159 ekspresyonu ise çalışma grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur($p<0.05$)

Sonuç: Çalışmamızda implantasyon başarısızlığı olan hastalarda NK hücreleri üzerindeki HLA-G ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksek olarak izlenmiştir. İnflamasyon, enfeksiyon veya çevresel stresin implantasyon için elverişsiz ortam oluşturduğu ve HLA-G ekspresyonunun kompanzatuvar mekanizma olarak yükseldiği düşünülmüştür. Bu çalışma tekrarlayan implantasyon başarısızlığı

olan hastalarda, endometrial reseptivitedeki değişimlere ışık tutmuş olup homojen popölasyonlarda daha geniş hasta ve kontrol gruplarında çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı, Endometrial Reseptivite, HLA-G



SUMMARY

Objective: The aim of our study was to evaluate the expression of HLA-G, CD49a, CD158, CD159a on NK cells in endometrial biopsies taken in the mid-luteal period of patients with recurrent implantation failure of unknown origin, and to investigate its usability in predicting implantation success.

Material And Methods: Our study was carried out with 22 patients who had IVF treatment and met the necessary criteria and control group of 16 in the IVF Clinic of Zeynep Kamil Women's and Child Health Education and Research Hospital between May 2023 and August 2023. Controlled endometrial damage was performed on the 21-24th day of the patients' cycles before transfer, and the endometrial sample was transferred to the tissue laboratory. By marking from the lymphocyte group on the CD45+ cell population; NK cells were evaluated for their CD56 expression, HLA-G expression was evaluated on the labeled NK cell subtypes. Expressions of the killer cell immunoglobulin-like receptors CD158 and CD159a were also analyzed in subtypes of endometrial NK cells.

Results: In patients with recurrent implantation failure, there was no significant difference in the percentage of uterine NK compared to the control group, and MFI (mean fluorescence intensity) was significantly higher in the study group ($p<0.05$). When HLA-G expressed on NK was analyzed as percent ($p<0.001$) and MFI ($p<0.05$), it was found to be significantly higher in the study group. Only CD158 expression on NK cells in the study group ($p<0.05$), only CD159a expression in the control group ($p<0.05$), and both CD158 and CD159 expression were significantly higher in the study group ($p<0.05$).

Conclusion: In our study HLA-G expression on NK cells in patient with recurrent implantation failure was significantly higher. Inflammation, infection or environmental stress creates an unfavorable environment for implantation and HLA-G expression is thought to be increased as a compensatory mechanism. This study

sheds light on endometrial changes in patients with recurrent implantation failure, but needs to be done with larger and homogeneous patient groups.

Key Words: Recurrent Implantation Failure, Endometrial Receptivity, HLA-G





1. GİRİŞ

25 Temmuz 1978’de Dr Patrick Christopher Steptoe ve ekibinin yoğun çalışmaları sonucunda tarihteki ilk tüp bebeğin dünyaya gelmesinin üzerinden geçen 45 yılın ardından yardımcı üreme tekniklerinde bir çok aşama katedilmiştir. Artık yüksek kaliteli embriyoların seçilmesini veya endometrial durumun değerlendirilmesini sağlayan araçlar mevcuttur. Ayrıca, ART protokolleri daha yüksek gebelik oranları, daha az çoklu doğum ve genetik olarak etkilenmiş progenitörlerden sağlıklı bebekler elde etmek amacıyla gelişmeye devam etmektedir. Ancak bu gelişmelere rağmen gebelik oranları hala nispeten düşüktür ve son on yılda gebelik oranlarında önemli bir artış göstermemiştir. Bu, uyarılmış döngülerdeki implantasyon oranlarının yetersiz kaldığını ve henüz tanımlanmamış diğer faktörlerin rol oynaması gerektiğini gösterir.

Normal bir gebelik başarılı bir implantasyon ve plasentasyon olmadan gerçekleşemez. Başarılı implantasyon için blastokistin reseptif endometriuma doğru zamanda ulaşması gerekir. Normal bir siklusta başarılı implantasyon oranı %40’tır¹. Yardımcı üreme tekniklerinden faydalanan hastalarda ise IVF/ICSI sonrası %60-70 başarısızlık görülmektedir.

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığını tarifleyecek kaliteli embriyo transfer başarısızlık sayısı, başarısız siklus sayısı ve hasta yaşını belirten evrensel bir tanım bulunmamakla birlikte en sık olarak; organik patolojisi bulunmayan hastalarda iyi hormonal yanıt ve endometrial gelişim varlığında en az 2 siklus ve en az 2 ve daha fazla iyi kalitede embriyo transferine rağmen klinik gebelik elde edilememesi tanım olarak kullanılmaktadır.²Günümüzde infertilite tedavisi alan hastaların %10-15’i tekrarlayan implantasyon başarısızlığı yaşamaktadır³. RİF IVF tedavisinde hız kısıtlayıcı basamaklardan birisi olmaya devam etmektedir.

İmplantasyon başarısını arttırmak için çeşitli tedavi modaliteleri tartışılmaya devam etmektedir. 2003 yılında İsrail’de Barash tarafından yürütülen implantasyon başarısızlığı olan hastalarda, ‘gap junction’ proteini cx43’ün araştırıldığı bir çalışmada 12 hastaya endometrial örnek almak amacı ile Pipelle yardımıyla biyopsi yapılmış ve akabinde bu hastalardan 11 tanesinin gebe kalması üzerine, lokal endometrial hasarlamamanın implantasyonu arttırdığı öne sürülerek yeni bir çalışma

yapılmıştır Kontrollü endometrial hasarlama; endometriuma yüzeyel olarak yapılan minimal hasarlama olarak tanımlanmaktadır. Desidualizasyonu kolaylaştırması, işlem sonrasında pro-inflamatuar sitokin artışı ve iyileşme döneminde sitokinlerin reseptiviteyi arttırdığı kabul edilmektedir.

Biz de tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalara endometriumun reseptif olduğu 20-24. Günde kontrollü endometrial hasarlama yaparak bu esnada aldığımız endometrial örneklerdeki NK hücrelerinde eksprese edilen HLA-G düzeylerini ve yine NK hücreleri üzerinde inhibitör reseptör olarak görev alan CD158a ile CD159a ekspresyonunu inceleyerek implantasyon başarısını öngörmede kullanılabilirliğini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite, 35 yaş altı 1 yıl, 35 yaş üstünde 6 ay korunmasız düzenli ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır⁴. ESHRE'nin son verilerine göre her 6 çiftten biri reproduktif dönem boyunca en az bir kere infertilite tanısı almaktadır⁵.

İnfertilite prevalansı kadınlarda %13, erkeklerde %10 civarındadır. İnfertilitenin çeşitli nedenleri vardır ve bazı çiftlerde birden fazla etken sorumludur. Etiyolojinin %26'sını erkek faktör oluşturmaktadır. İnfertil çiftlerin %21'inde ovulatuvar disfonksiyon, %14'ünde tubal faktör, %6'sında koital faktörler, %6'sında endometriozis, %3'ünde servikal faktör, %28'inde ise açıklanamayan infertilite saptanmıştır. Bazı çiftlerin birden fazla sorunu olmasından dolayı toplam yüzde 100 den fazladır⁶.

2.2. İMPLANTASYON -EMBRİYO VE ENDOMETRİUM ETKİLEŞİMİ

Normal bir gebelik başarılı implantasyon ve ardından plasentasyon olmadan gerçekleşemez. Birbirinden genetik ve immunolojik olarak bambaşka olan blastokist ile endometrium arasında efektif bir karşılıklı iletişim sonunda embriyonun uterus duvarına yapışıp gömülmesi ⁷ve bunu endometrial reseptivitenin en yüksek olduğu implantasyon penceresi adı verilen kısa bir sürede sağlaması gerekir. Başarılı implantasyonun üç ana basamağı vardır;

1. Fertilizasyon ile oluşan zigotun mitoz bölünmelerle blastokist aşamasına kadar gelişimini tamamlanması,
2. Endometiumun reseptivite kazanarak blastokist invazyonuna izin vermesi
3. Embriyo ve endometrium arasında cross-talk olarak adlandırılan endometrial integrinler, hücre dışı matriks ve adezyon molekülleri ve endokrin ürünlerle haberleşmenin olması. ⁸

2.2.1. Endometriumun İmplantasyona Hazırlanması

28 günlük bir endometrial siklusun tahmini 14. gününde ovulasyonun gerçekleştiği kabul edildiğinde bu siklusun 19-24. günleri arasında sekretuvar fazdaki endometrium embriyo implantasyonu için yeterlilik kazanır. Endometrial reseptivitenin östrojen ve progesteron tarafından düzenlendiği ve sadece sınırlı bir zaman aralığında korunduğu bu süreye “implantasyon penceresi” denir.

Proliferatif endometriumdan sekretuar döneme geçiş progesteron artışı ile bu dönemde olur. Artan progesteron cAMP aracılığı ile endometrial bağ dokuyu etkiler ve bağ doku lipid glikojen gibi moleküllerden zengin hale gelir. Bu nedenle mid-luteal dönemde endometrial kalınlık yaklaşık 14 mm kalınlığa ulaşır. Fetusun endometrium tarafından kabulü için immuntolerans gelişir ve bu durum desidualizasyon olarak tanımlanır. Blastokistin uygun implantasyonu ve invazyonu için endometriumda desidualizasyon gereklidir⁹.

Siklusun 21. gününde progesterondaki yükselme ile endometrial hücrelerin apikal yüzeyinde epitelyal çıkıntılar(pinopodlar) oluşur. Pinopodlar uterus epitel hücrelerinin apikal yüzdeki çıkıntılarıdır. Pinopodlar anti-adheziv özellik gösteren mucusu toplayarak blastokistin adezyonunu kolaylaştırır¹⁰. Yapılan çalışmalar normal döngüye sahip kadınlarda ovulasyon sonrası 6. günde alınan endometrial biyopsilerin %78'inde pinopodların bulunduğunu ortaya koymuştur ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda tamamen gelişmiş pinopodların gösterilebileceği günün belirlenip transfer döngüleri buna göre değiştirildiğinde gebelik oranlarında bir artış olduğu izlenmiştir¹¹. Aynı biyopside pinopod görünümü, steroid reseptörlerinin kaybı ve $\alpha\beta 3$ integrin, osteopontin ve lösemi inhibe edici faktörün maksimum ekspresyonu gösterilmiştir

Endometrial doku, implantasyon başlamadan önce, blastokistten salgılanan sinyallerle ve bunlara ek olarak salgılanan sitokin, ‘growth’ faktörler ve kemokinlerle immun supresyonu başlatmaktadır. Endometriumdan immuntolerans için koloni stimüle edici faktör (CSF-1), Lösemi İnhibitör Faktör (LIF) ve IL1 gibi sitokinler salgılanır. İmplantasyonda lösemi önleyici faktörün (LIF) rolü, fonksiyonel bir LIF geni olmayan bir fare modelinde gösterilmiştir; homozigot dişi fare, vahşi tip bir erkekle çiftleştiğinde, embriyo implantasyonu gerçekleşmemiştir. LIF mRNA

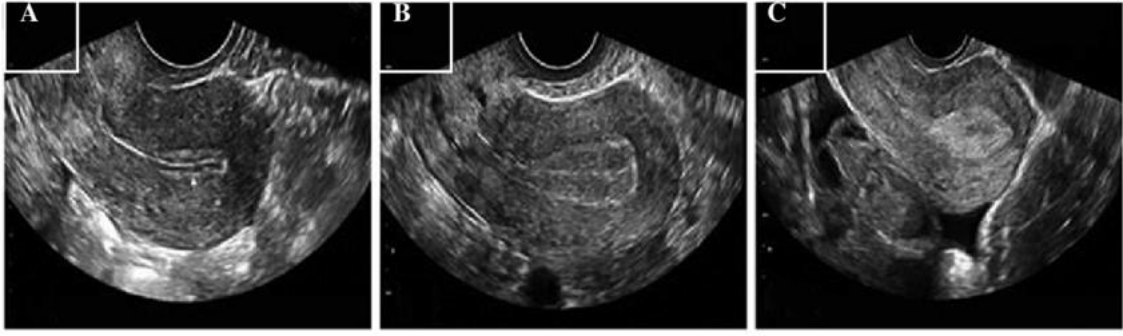
ekspresyonu, glandüler epitelde stroma ile karşılaştırıldığında 3 kat daha yüksektir ve proliferatif faz ile karşılaştırıldığında sekretuar fazdaki artmış ekspresyonu ile döngü bağımlıdır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların endometriyal doku örneklerinde LIF ekspresyonu azalmış izlenmiş olup, bu tür hastalardan alınan uterus yıkama sıvısı da daha düşük LIF konsantrasyonları içermektedir¹².

uNK (uterin natural killer) hücre sayısı mid-luteal dönemde artış gösterir¹³. Th2 artışının Th1'e göre fazla olması nedeniyle TH1 / TH2 oranı azalır. T helper 2 aracılığı ile IL13 – IL4 -IL6 sentezlenir. Breg (Regulator B) hücreleri midluteal dönemde endometriumda artış gösterir¹⁴.

Erken dönemde embriyo tarafından platelet aktive edici faktör(PAF) salgılanır ve maternal erken gebelik faktörü (EPF) salınımını indükler^{15,16}. Bu faktörler immunsupresif özellikte olup immun toleransa yardımcı olur. Prostaglandin E2 sentezini artırarak vasküler geçirgenlik artışı sağlar. PGE2'nin trofoblastik invazyonun ana düzenleyicisi olduğu kabul edilmektedir¹⁷. Böylece erken dönemde implantasyon ve invazyon için gerekli mediatörlerin salınımı indüklenmektedir.

VEGF ve FGF faktörü gibi anjiopoetinler artarak implantasyon, invazyon ve gebeliğin sağlıklı devamı için gerekli anjiyogenezi indükler¹⁸.

Endometriumun ultrasonografik değerlendirilmesi implantasyon için büyük bir prognostik değere sahip olabilir. Proliferatif fazda, endometrium iyi tanımlanmış bir merkezi çizgi ile hipoekojenik bir dokuya sahiptir. Bu doku sekresyon fazında değişir ve merkezi ekojenik çizginin görülmemesiyle hiperekojenik hale gelir¹⁹. Luminal stromal yoğunluk nedeniyle ovulasyon sırasında endometriyumun üçlü çizgili çok katmanlı görünümü, birçok yazar tarafından gonadotropinle uyarılan siklularda gebelik için prognostik bir faktör olarak tanımlanmıştır⁽²⁰⁾. Çalışmalarda mid luteal faz homojen hiperekojen paterni olan gruplar homojen olmayan paternle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek gebelik oranları bulunmuştur.



Resim 1:Usg'ye göre endometrial morfoloji sınıflaması²¹.

2.2.2. Endometrial Günleme ('Dating') Ve Noyes Kriterleri

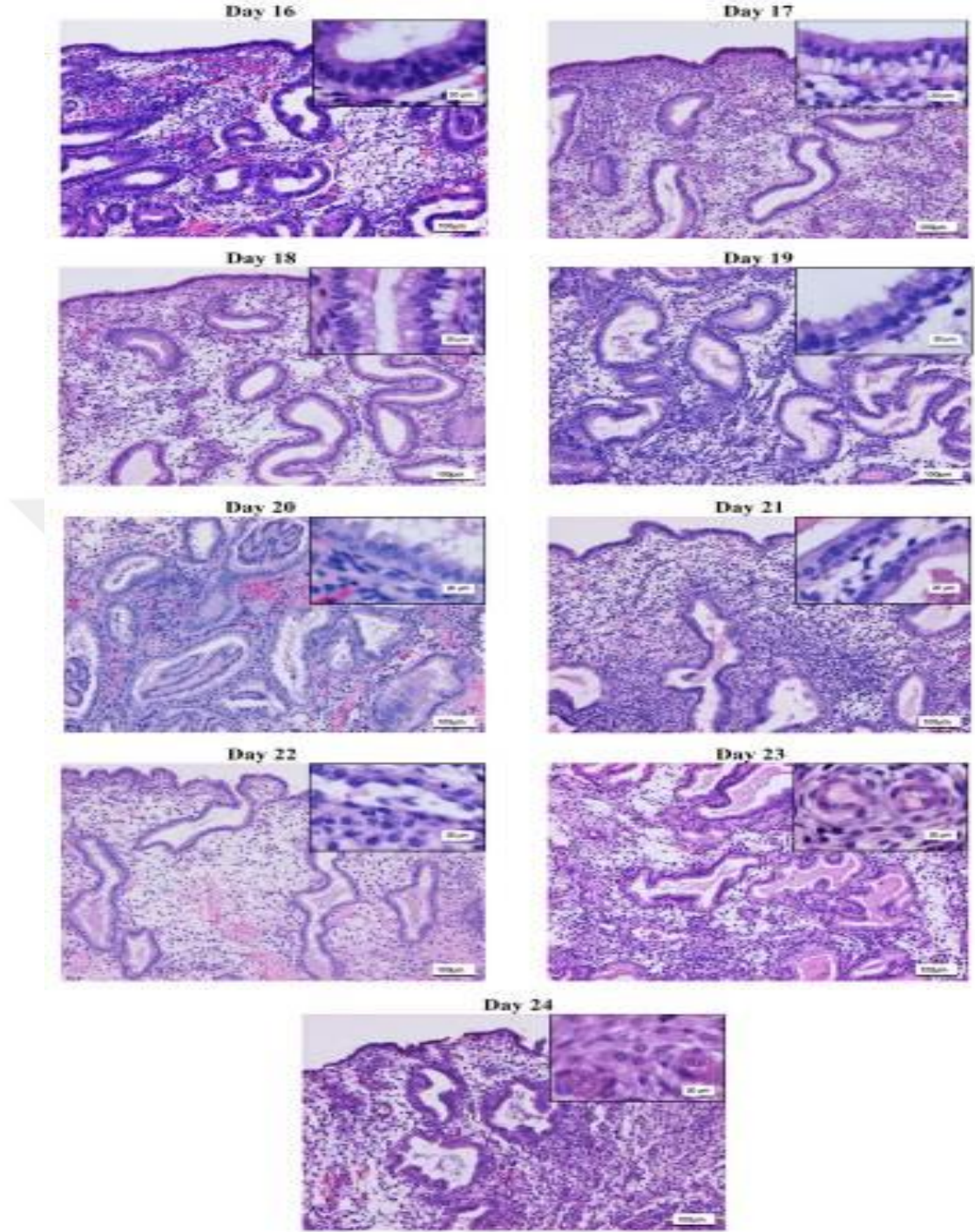
Endometriyum, myometriyumun üzerinde yer alan çok katmanlı, dinamik bir yapı olup fonksiyonel ve bazal tabakadan oluşur. Her ay, adet sırasında fonksiyonel tabakadaki hücreler bazal tabakadan ayrılılarak dökülür. Bazal tabaka ise myometriyuma bağlı olup bozulmadan kalır ve endometriyal rejenerasyon için bir temel oluşturur. Endometriyumda luminal ve glandüler epitel hücreleri, stromal fibroblastik hücreli stroma, immünokompetan hücreler ve kan damarları dahil olmak üzere birkaç farklı hücre tipi vardır. Bu hücrelerin sayısı, aktivitesi, yapısı ve işlevi adet döngüsü ile hamilelik sırasında değişir. 1950'lerin başlarında Noyes ve arkadaşları ²²300 kadında 8000 spontan döngü sırasında alınan endometriyal biyopsilerin histolojik özelliklerini incelediler. Histolojik değişiklikleri bazal vücut sıcaklığındaki doğal değişikliklerle ilişkilendirerek, farklı histolojik kalıpları adet döngüsündeki belirli zaman noktalarına bağlayabildiler. Bu çalışmanın sonucunda ortaya çıkan endometriyal tarihleme kriterleri, o zamandan beri endometriyal yanıtın değerlendirilmesi ve endometrial anormalliklerin saptanması için altın standart yaklaşım olarak kalmıştır.

2020' de yapılan bir çalışmada endometriyal günlemede histolojik değişimler incelenmiştir²³.Bu çalışmayla belirtilen günlemelere göre;

16. Gün: glandüler epitelin subnükleer vakuolasyonu düzenlidir ve belirginleşmiştir, stromanın büyük kısmı çıplak çekirdekleri içerir.
17. Gün: Glandüler epitelin fokal tabakalaşması mevcuttur, çekirdekler aşağı yukarı üst üstedir, üstlerinde homojen sitoplazma ve aşağıda büyük vakuoller vardır.

18. Gün: Glandüler epitelde neredeyse hiç tabakalaşma yoktur. Vakuollerin boyutu azalmıştır ve vakuoller çekirdeği geçerek glandüler lümene ve oradan lümene yakın sitoplazmaya kaymıştır.
19. Gün: Vakuol sayısı birkaç tane kalacak şekilde azalmıştır. İntraluminal sekresyonun varlığı ve psödostratifikasyon ve mitozların olmaması ile karakterizedir.
20. Gün: Salgı zirveye ulaşır. Sekresyonlar Periyodik asit-Şişirme (PAS) reaksiyonu ile kırmızıya boyanarak belirginleştirilebilir ve 25. Güne kadar görülebilir. Çekirdekler yuvarlak şekilli olup bazalde konumlanır Subnükleer vakuoller nadirdir. Stromal ödem başlar.
21. Gün: Stromal ödem artar.
22. Gün: Stromal ödem zirveye ulaşır. Spiral arteriyoller belirgin değildir ve stromal hücreler sadece ince sitoplazma ile neredeyse çıplak çekirdeklerdir.
23. Gün: Spiral arteriyoller, çevrelerindeki stromaların yoğunlaşması nedeniyle belirginleşir. Bu en erken predesidüel reaksiyondur.
24. Gün: Spiral arteriyoller çevresindeki predesidual reaksiyon nedeniyle belirgin hale gelir.

Stromal çoğalma devam eder²⁴.



Resim 2: Noyes kriterleri altındaki temel özelliklerle, adet döngüsünün 16-24 günlerinde endometriyumun histolojik analizi için H&E boyaması²⁵.

2.2.3. Embriyonun İmplantasyon Süreci

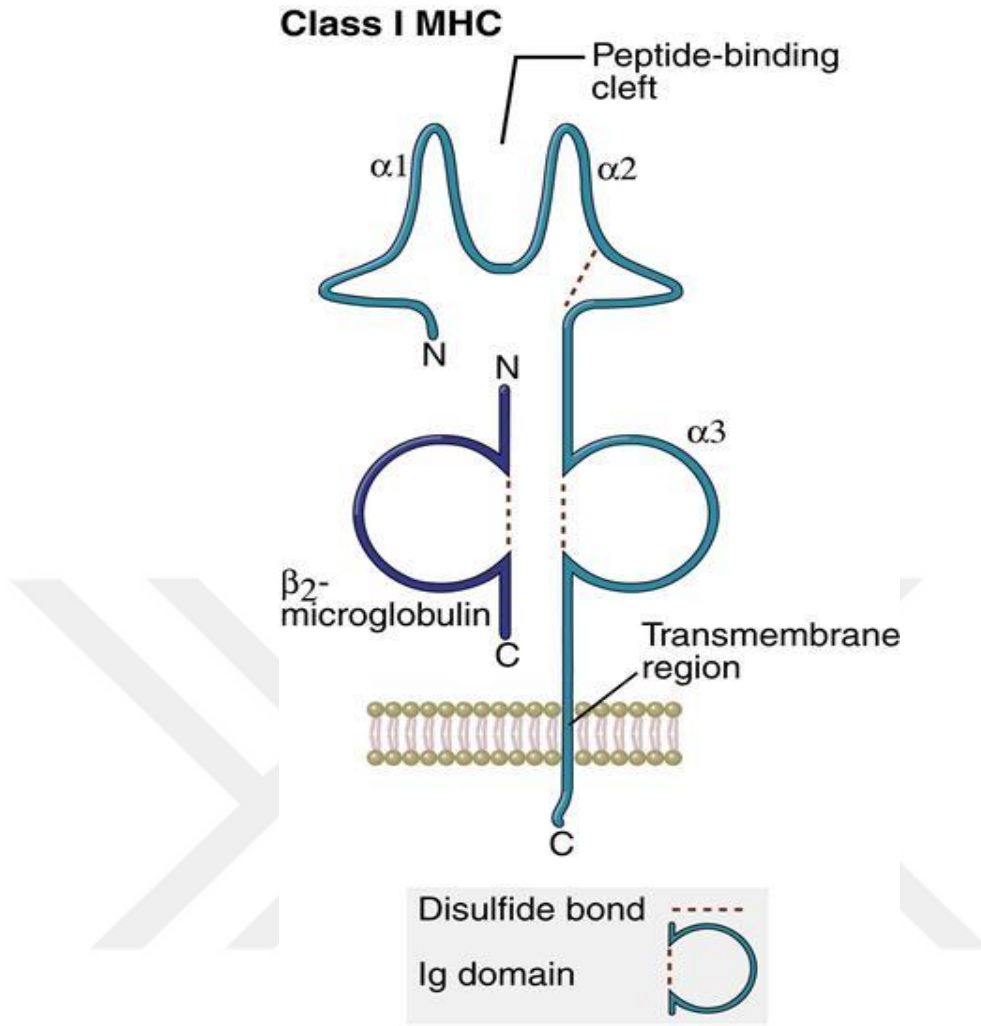
Döllenmenin ardından mitoz hücre bölünmeleri başlar. Her bölünme sonrasında hücrelerin hacmi giderek küçülür ve blastomer olarak adlandırılan

hücreler oluşur²⁵. Blastomer sayısı sayısı 12-32 olduğunda gelişen hücre yığını morula adını alır. Morulanın internal hücreleri dışarıda bir hücre tabakası ile çevrelenmiştir. Morula fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra oluşur ve uterusu girer ve kısa bir süre sonra (fertilizasyonun yaklaşık 4. Günü) içinde blastosist boşluğu oluşur. Blastosist içindeki sıvı arttıkça blastomerleri iki bölüme ayırır iç hücre kitlesi merkezi bir yerleşim göstererek embriyoblastı dış hücre tabakası ise (trofoblastlar olarak adlandırılır) plasentanın embriyonik kısmını oluşturur. Blastosist uterin kaviteye ulaştıktan yaklaşık 2 gün sonra zona pellusida dejenere olarak kaybolur. Fertilizasyon sonrası yaklaşık 6.günde blastosist endometrial epitele tutunur. Blastosistin implantasyonu ikinci haftanın sonunda tamamlanır bu olay ovulasyondan sonraki 6-10. Güne denk gelir. Blastosist implante olurken daha fazla trofoblast endometriuma temas ederek sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlara farklılaşır. İlerleyen sinsityotrofoblast hücreleri endometriyal bağ dokusuna invaze olur ve blastosist endometriumun içine gömülür. Endometrial hücreler apoptoza uğrayarak invazyonu kolaylaştırır²⁶.

2.3. HLA-G VE İMPLANTASYON

MHC (Major Histokompatibilite Kompleksi) molekülleri peptid yapıdaki antijenleri tanıması için lenfositlere gösteren membran proteinleridir. MHC tarihsel olarak doku nakli yapılan hastalarda kabul veya reddi gösteren ana genetik bölge olarak keşfedilmiştir. İnsan MHC molekülleri insan lökosit antijenleri (HLA) adını alır. MHC lokusu iki set olarak birçok polimorfik gen bulundurur bunlar Sınıf I ve sınıf II MHC genleri olarak anılır. HLA'ların sitotoksik hücrelerdeki ligandları killer immunoglobulin like receptor'lar (KIR)'dır, bu reseptörler inhibitör ya da aktivatör olabilirler²⁷.

Sınıf I MHC molekülleri iki polipeptid zincirinin non kovalan bağlarla bağlanmasıyla oluşan heterodimer yapılardır. MHC Sınıf I molekülünün beta-2 mikroglobulin alt birimi 15. kromozomda kodlanır hafif zincir özelliğinde ve tüm bireylerde ortaktır. Ayrıca 6. kromozom tarafından kodlanan ağır zincir (alfa- α) içermektedir.



Resim3: Sınıf I MHC molekulu²⁷.

Çeşitli çalışmalar, NK hücreleri üzerinde HLA-G'nin inhibitör etkilerini göstermiştir. HLA-G, HLA-E, -F ve -H'yi de içeren klasik olmayan MHC Ib moleküllerine aittir. Bu moleküller, klasik HLA-Ia molekülleri (HLA-A, -B ve -C) ile varyanslı olarak, NK hücrelerini, T ve B lenfositlerini, monositleri ve dendritik hücreleri hedef alan güçlü immün düzenleyici özellikler sergiler.¹¹ HLA-G sitotrofoblast hücrelerinde eksprese edilerek embrioyu annenin immun sisteminden korumaktadır²⁸. 1999'da Menicucci ve ark. tarafından, kültürde 3. gün embriyolarını çevreleyen ortamda çözünür HLA-G (sHLA-G) tanımlandı²⁹. 2002'de ise Fuzzi ve ark, 3. gün embriyo kümelerini çevreleyen ortamdaki yüksek sHLA-G

konsantrasyonlarının, embriyo transferinden sonra gelişmiş implantasyon ve gebelik oranları ile ilişkili olduğunu bildirdi.

HLA-G trofoblastik hücre invazyonunu kontrol etmek ve lokal immünosüpresif durumu korumak için sitokin sekresyonunu modüle ederek implantasyonda kilit rol oynar³⁰. Çözünür HLA-G, NK hücrelerinin fonksiyonel aktivitesini baskılar³¹ ve NK hücre aracılı sitotoksiteyi inhibe eder³². Embriyodaki paternal HLA'lar ile maternal uterin ve veya periferik NK ve Tc hücreleri arası etkileşimler ve hücre dağılımlarının sitotoksik yönde olmasının implantasyonu etkileyebileceği düşünülmektedir³³. Birlikte ele alındığında, bu gözlemler HLA-G'nin işlevinin immüntoleransı indüklemek, trofoblast invazyonunu kontrol etmek ve başarılı embriyo implantasyonu ve gebelik bakımına izin vermek için spiral arterlerin vasküler yeniden şekillenmesine katkıda bulunmak için sitokin sekresyonunu modüle etmek olduğunu göstermektedir. sHLA-G molekülü TNF α ve interferon gama (IFN γ) gibi Th1 sitokinlerini inhibitör reseptörlere bağlanarak azaltırken IL-4 gibi Th-2 sitokinlerini artırmaktadır. Th-1 sitokinleri allograft reddine sebep olurken Th-2 sitokinleri fetüs reddini Th-1'i baskılayarak önlemektedir. Yi ve ark. HLA-G salınımı fazla olan embriyolarda bölünme hızının dafazla olduğunu ileri sürmüşlerdir

HLA-G genital sistemde tespit edilebilir, ve hamile olmayan kadınların kanında³⁴ ve ayrıca erkeklerin seminal sıvısında bulunur³⁵. sHLA-G'nin azalmış salınımı, in vitro fertilizasyon (IVF) gebeliklerdeki implantasyon başarısızlıkları, preeklampsi ve düşük tehtidi gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili görülmektedir^{36,37}. Noci ve ark. tarafından yapılan çalışmada IVF sikluslarında transfer edilecek embriyonun seçiminde sHLA-G ELISA kullanılabilir potansiyel bir marker olarak önerilmektedir³⁸.

Kromozom 6p21.3 üzerinde bulunan HLA-G geni, yedi intron ve sekiz ekzondan oluşur. HLA-G mRNA'nın alternatif kırılması (alternative splicing), dört membran izoformu (G1-G4) ve üç çözünür izoform (G5-G7) dahil olmak üzere yedi HLA-G izoformu üretir³⁹.

2.4. NK HÜCRELERİ ve İMPLANTASYON

Doğal bağışıklık üyesi olan NK hücreleri, kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. NK hücreleri CD56 ve CD16 ekspresyonlarına göre iki gruba

ayrılmaktadır. Dolaşımdaki NK hücrelerinin yaklaşık %90 ı CD56 dim (düşük) CD16 bright (yüksek) eksprese ederler sitolitik etki gösterirken düşük düzeyde sitokin salgırlar. CD56 bright (yüksek) CD16 dim (düşük) NK hücreleri ise dolaşımdan ziyade ikincil lenfoid organlarda yerleşmiş olarak bulunurlar ve IFN- γ , TNF ve GM-CSF içeren pek çok sitokin üretmektedir fakat sitotoksik özellikleri zayıftır.¹⁸ Uterin NK (uNK) hücreleri de yüzeylerinde yüksek CD 56, düşük CD16 eksprese ederler zayıf sitotoksiktirler ve implantasyonda düzenleyici rol oynarlar. Desidua'daki bağışıklık hücrelerinin ~%70'ini oluşturur. Spiral arterlerin remodelinginde, trofoblast invazyonu ve plasentasyonda etkileri vardır^{40,41}. RIF hastalarından alınan endometrial örneklerde uNK hücre yüzdeleri artmış olarak bulunmuştur^{42,43}.

NK hücrelerinin etkin işlevi aktivatör ve inhibitör yüzey reseptörleri tarafından kontrol edilir. Aktivatör reseptörler uyarıldığında proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanmasıyla hücrelerin sitotoksiteleri artarken inhibitör reseptörlerin uyarılması hücresel yanıtı baskılayıcı özelliktedir⁴⁴. Bu işlevler MHC sınıf I molekülleri aracılığı ile kontrol edilmektedir. İnsanlarda MHC sınıf I moleküllerinin reseptörlerini kodlayan 3 farklı gen ailesi tanımlanmıştır. İlki, immunglobulin süper ailesine (Ig) ait olan tip I transmembran glikoproteinleridir ve öldürücü hücre Ig-benzeri reseptör (KIR) olarak adlandırılmaktadır. Kromozom 19q13.4 üzerinde bulunan KIR genleri polimorfik özellik gösterir. Intrasisitoplazmik alanlarının uzun(L) veya kısa (S) olması ve hücre dışı immünoglobulin sayısına (2D veya 3D) göre sınıflandırılır. İkinci reseptör grubu, immunglobulin like transkript (ILT) olarak adlandırılır. C- tipi lektin ailesinin üyeleri ise üçüncü grubu oluşturmaktadır^{44,45}. Bu reseptörler, klasik olmayan HLA moleküllerini tanıyan CD94/NKG2A heterodimerini ve öldürücü-Ig-benzeri reseptör (KIR; CD158) ailesini içerir⁴⁶.

Desidual NK hücreleri dokuda yerleşik marker CD49a y1 ve öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör (KIR) genlerini KIR2DS1, KIR2DS4, KIR2DL1, KIR2DL2 ve KIR2DL3 eksprese ederler⁴⁷. HLA-C ve HLA-G molekülleri ile dNK hücreleri üzerindeki reseptörleri arasındaki etkileşim trofoblast invazyonu, vasküler remodeling ve immuntoleransın korunmasına katkıda bulunur.^{48,49} Yine implantasyon döenminde trofoblast hücreleri, NK hücreleri reseptörü KIR2DL4

tarafından bağlanan çözünür HLA-G'yi (sHLA-G) eksprese ederek, alıcı endometriyumun oluşumuna faydalı olan proinflamatuvar/proanjiyojenik bir yanıtı aktive eder⁵⁰.

2.5. İMPLANTASYON AŞAMALARI

Trofoblastların endometriuma yapışıp tutunabilmesi için zona pellisudadan ayrılması gerekir. Morulanın endometriuma girişinden 1-3 gün sonra glikoprotein yapıdaki zona pellisuda embriyo ve endometriumca salgılanan proteazlar tarafından eritilir.(hatching).İmplantasyon apozisyon, adhezyon ve invazyon ile devam eder.

2.5.1. Appozisyon Evresi

Embriyo endometrial boşluğa ulaşınca ilk olarak müsin molekülleri ile etkileşerek endometriyal yüzey epiteline hafif bir şekilde karşı koyarak endometriumu baskılar. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde bu aşamada, trofoblastların apikal membranı ile endometriumun epitel hücrelerinin yakınlaştığı görülür. Trofoblast yüzeyinde oluşan villuslar endometrial dokuya invaze olarak konseptusun uterin kaviteye bağlanmasını kolaylaştırır.

2.5.2. Adezyon Evresi

Blastosist trofoblastlarca üretilen fetal fibronektinli etkileşim yardımıyla endometriuma sıkıca yapışmış durumdadır. Adhezyon integrin ($\alpha_v\beta_3$ integrin gibi), selektin ve troponinlerin yardımı ile gerçekleşir⁵¹. Glanduler epiteldeki pikal mikrovilluslar trofoblast membranındaki çukurcuklara desmozomal bağlarla bağlanır. Epitelo-koryal plasentasyon oluşmaya başlar.

2.5.3. İnvazyon Evresi

Trofoblastlar endometriumun daha da derinine ilerleyerek desıduanın içine girer. Ekstraselüler matriks metalloproteinaz aktivasyonu ile yıkılır Epitel katmanı geçildikten sonra trofoblastlar stromaya girer ve damarlara doğru ilerleyerek hemo-koryal plasentayı oluşturur. Plasenta taslağı ovulasyondan yaklaşık 2 hafta sonra oluşmuş olur. İnvazyon ilerledikçe gerekli proteinlerin sentezi artarak sürer. Ekstravillöz trofoblastlar ilerleyişini sürdürerek spiral arter ve venleri hatta damar duvarındaki düz kasları invaze ederler. İmplantasyon gerçekleşmediğinde gebelik

elde edilemezken, uygunsuz implantasyona bağlı erken gebelik kaybı, düşük doğum ağırlığı veya preeklampsi gibi gebelik komplikasyonları görülebilir

2.6. TEKRARLAYAN İMPLANTASYON BAŞARISIZLIĞI

2.6.1. Tanım

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı'nın tanımı üzerinde consensus olmamakla birlikte kaliteli embriyo transferine rağmen başarısızlık sayısı, başarısız siklus sayısı ve hasta yaşından yola çıkan tanımlamalar bulunmaktadır.

IVF / ICSI sonrası en az 2 yüksek kaliteli blastokist transferine rağmen gebelik oluşmaması⁵², 40 yaş altı kadınlarda, en az 3 'taze' veya 'dondurulmuş' siklus ve en az 4 iyi kalitede embriyo transferine rağmen gebelik oluşmaması, 40 yaş altındaki kadınlarda 10 embriyo transferine rağmen gebelik elde edilememesi⁵³, en az 2 yüksek kalitede embriyo transferine rağmen gebelik elde edilememesi literatürdeki RIF tanımlamalarından bazılarıdır.

Normal bir siklusta başarılı implantasyon oranı %40'tır¹. Yardımcı üreme tekniklerinden faydalanan hastalarda ise IVF/ICSI sonrası %60-70 başarısızlık görülmektedir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı insidansı %10-15' olarak belirtilmiştir³. RIF IVF tedavisinde hız kısıtlayıcı basamaklardan birisi olmaya devam etmektedir.

Embriyoda, endometriyumda veya immun sistemdeki herhangi bir anormallik, implantasyon başarısızlığına sebep olacaktır. Bu nedenle embriyo, uterus ve fonksiyonel endometrium birlikte değerlendirilmelidir. Tedavi, tespit edilen sıkıntının düzeltilmesine yönelik olmalıdır³.

2.6.2. Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı Nedenleri

2.6.2.1. Gamet/Embriyo Faktörü

Oosit kalitesi yaş ilerledikçe düşerek anöploid embriyo sayısında artışa ve mitokondrial DNA hasarında artmaya sebep olarak oosit sayısında azalma ve immatür embriyo sayısında artma dolayısıyla, RIF için bir sebep olarak gösterilmektedir^{54,55}. Yumurtalık stimülasyonunda agresif protokollerin

kullanılmasının kalitesiz oositlerin üretilmesine ve dolayısıyla tedavide daha fazla başarısızlığa sebep olabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır.

Düşük sperm kalitesi de embriyo kalitesini bozan bir faktör olmakla birlikte sperm kalitesinin tekrarlayan implantasyon başarısızlığını artırdığını gösteren bir çalışma henüz yoktur⁵⁶. Bununla birlikte sperm DNA fragmentasyonunun arttığı hastalarda antioksidan ilaçlar fragmentasyonu azaltabileceği için kullanılabilmektedir⁵⁷.

Embriyo genetiği; RIF etyolojisinde ön planla düşünülmüş olup, prenatal tanı uygulamalarının gelişmesi ile PGT yapılmasının implantasyon oranlarını anlamlı artırmadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda RIF olan (%67) ve olmayan (%64) hastalardaki anöploidi oranlarının anlamlı farklılıkta olmaması, PGT'nin RIF tedavisinde yeterli etkinlikte olmadığını düşündürmektedir.

2.ya da 3. Gün embriyo transferinde implantasyon oranı %25-30 iken blastokist transferinde implantasyon oranı %40 'tır. Blastokist aşamasına daha iyi kalitede embriyoların ulaşabildiği doğal seçim mekanizması bu durumu açıklar. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda blastokist transferi önerilmektedir.

Embriyo Kültür Ortamı da IVF başarısı için oldukça önemli olup RIF olan hastalarda homolog endometrial kültürlerin kullanımı önerilmiştir ancak çoğu merkezde bu konuda yeterli donanım bulunmamaktadır.

2.6.2.2, Uterin ve Endometrial Faktörler

Müllerian kanalın oluşumu ya da füzyonunda meydana gelen defektler sonucu konjenital uterin anomaliler oluşur⁵⁸. Uterin septumun kanlanması az olmasından ve endometrial reseptiviteyi etkilemesinden dolayı implantasyon oranını azalttığı düşünülmektedir⁵⁹. Septumun histeroskopik rezeksiyonu septum fekunditeyi artırdığı ve gebelik komplikasyonlarını azalttığı için önerilmektedir⁵⁹. Bikornuat ve arcuat uterus da sık rastlanan uterin anomalilerden olup cerrahi tedavisine çoğunlukla gereksinim duyulmamaktadır⁶⁰.

Myomlar kontraktileteyi değiştirmeleri ve endometrial kaviteyle olan ilişkilerine göre reseptiviteyi etkileyebilir, HOXA-10 gen ekspresyonu ile reseptiviteyi azaltırlar. Kavitede düzensizliğe sebep olan submukoz ve intramural

myomların rezeksiyonu sonrasında klinik gebelik oranlarında artış izlenirken kaviteyi bozmayan myomların eksizyonunun faydası olduğuna dair kanıtlar sınırlıdır⁶¹⁻⁶⁴. Endometriumdaki adhezyonlar da endometrial reseptiviteyi azaltmaktadır⁶⁵.

Adenomyozisin fertilitiyi etkilediğini düşündüren yayınlar var olmakla birlikte tekrarlayan implantasyon başarısızlığındaki rolü, tanı koymadaki zorluğun da etkisiyle gerçekten az gibi görünmektedir⁶².

Endometrial polipler histeroskopik incelemede uterusu en sık saptanan patolojilerdir⁵⁹ ve implantasyonu olumsuz etkilediği düşünülmektedir.⁶⁶ Yapılan çalışmalar polipler çıkarıldığında spontan gebelik oranlarının arttığını göstermektedir.^{67,68} Randomize prospektif bir çalışmada, Histeroskopik polipektomi sonrası IUI sikluslarında gebelik oranlarının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir⁶⁸ İnfertil hastalarda polipektomi önerilen bir tedavidir.⁶⁹

2.6.2.3. Hidrosalpinks

Hidrosalpinks, distal tıkanıklığa bağlı fallopian tüpünün sıvı ile dolup genişlemesi durumudur. En sık nedeni cinsel yolla bulaşan hastalıklara sekonder gelişen pelvik inflamatuvar hastalıklardır. Tubalarda biriken sıvı mekanik etkiyle embriyolara zarar verebilirken yine bu sıvının endometrial reseptiviteyi etkileyerek implantasyon üzerine olumsuz etki gösterebildiği belirtilmiştir⁷⁰. Hidrosalpinks olan hastalara salpenjektomi yapılması gebelik oranlarında belirgin artış sağlamaktadır⁷¹.

2.6.2.4. Trombofilik Faktörler

Trombofilik faktörlerin tekrarlayan gebelik kayıplarında rolü olsa da tekrarlayan implantasyon ya da IVF başarısızlığında etkisi olup olmadığı henüz kanıtlanmamıştır. Aspirin ve heparin verilmesinin sonucu iyileştireceğine dair de yeterli kanıt yoktur⁷⁰.

2.6.2.5. İmmunolojik Faktörler ve Endometrial Reseptivite

Mid-luteal döneme denk gelen ‘Reseptif Pencere’ adhezyon molekülleri, hormonlar kemokinler, sitokinler, immun hücreler, growth faktörler ve bunların inflamatuvar cevaplarıyla düzenlenen bir süreçtir. Endometrial alıcılıkta anormallik, implantasyon başarısızlıklarının üçte ikisinden sorumludur⁷²

Endometriumun embriyoyu kabul ederek başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesi için immuntolerans gereklidir. Bu tolerans salgılanan sitokinler büyüme faktörleri ve kemokinler sayesinde düzenlenen hücre göçleri ile sağlanır ve bu sayede ‘graft versus host’ önlenmiş olur⁷³. TH1/TH2 oranının gebelikteki immünolojinin temel mekanizmasını oluşturduğu düşünülmektedir. TH1 IL-2 / IFN γ , TNF α salgılayarak inflamatuvar yanıt oluştururken TH-2 IL-4, IL-10 ve IL-5 salgılar ve anti-inflamatuvar yanıt oluşturur. TH1/TH2 oranının TH2 lehine değişmesi, uNK hücre sayısının düzenlenmesi ve bu hücrelerden salınan sitokinlerin oluşturduğu inflamatuvar cevap sayesinde embriyonun implantasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmektedir.

RIF tanılı hastalarda, NK hücre sayısı ve TH1/TH2 oranı artmış olup iv immunoglobulin verilmesinin implantasyon başarısını arttırdığını gösteren çalışmalar vardır ^{74,75}. Treg ise immunomodülatördür; TGF β salgılar^{76,77}. Gebelik ve canlı doğumlarda periferik kandaki düzeyi artırır. Breg hücreleri ise IL-10 ve Treg salgılayarak immunosupresif cevap oluşturur ve RIF izlenen hastalarda bu hücrelerde azalma görülmüştür⁷⁸.

Preimplantasyon döneminde endometrium progesteron aracılığıyla immün-tolerans özelliği kazanmaktadır. Stimulasyon amaçlı yüksek düzeyde verilen progesteron, endometriumu erken mature ederek reseptif pencerenin bu nedenle kaçırılmasına sebep olmaktadır⁷⁹.

Endometrial reseptivitenin aydınlatılması ile implantasyon başarısında en önemli faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir. Moleküler sinyal yolları aydınlatıldıkça reseptivitenin düzeltilmesi implantasyon ve gebelik oranlarını artırmaya katkıda bulunacaktır.

İmplantasyon başarısını arttırmaya yönelik tedavi modaliteleri tartışılmaya devam etmektedir. Tedavi öncesi histeroskopi, plataletten zengin plazma enjeksiyonu endometrial reseptif pencere aralığı tayini, immun tedaviler ve kontrollü endometrial hasarlama çalışma yapılmış tedavi modalitelerindendir.

Histeroskopinin RIF olan hastalarda gebelik oranlarını arttırdığı gösterilmiş olup hastalara önerilmektedir⁸⁰. Submükoz myom, endometrial polip, intrauterin adhezyon ve septumun gibi anomaliler histeroskopik olarak düzeltilerek gebelik ve implantasyon oranları artırılmaktadır.

Embriyo kalitesi ve endometrial gelişimin uygun olduğu ve pelvik bir patolojinin olmadığı durumlardaki transfer başarısızlıkları, endometrial reseptivitedeki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Endometrial hasarlama, reseptiviteyi arttırmak amacıyla en çok uygulanan yöntemlerden biridir ⁸¹.

2.7. KONTROLLÜ ENDOMETRİAL HASARLAMA

Kontrollü endometrial hasarlama; endometriuma yüzeysel olarak yapılan minimal hasarlama olarak tanımlanmaktadır. işlem sonrasında pro-inflamatuar sitokinler artar ve bu durum reseptiviteyi artırırken, desidualizasyonu da kolaylaştırır. İlk defa 2003 yılında Barash ve arkadaşları tarafından rastlantısal olarak tanımlanan kontrollü endometrial hasarlama yardımcı üreme tedavi sonuçlarını iyileştirmek için uygulanmaktadır⁸²⁻⁸⁴. Endometrial hasarlama histeroskopi sırasında, Karman kanülü, Novak küret veya pipelle yardımıyla siklusun değişen zamanlarında 1 ile 4 arası değişen sayılarda yapılmaktadır^{85,86}.

2003 yılında İsrail’de Barash tarafından yürütülen implantasyon başarısızlığı olan hastalarda, ‘gap junction’ proteini cx43’ün araştırıldığı bir çalışmada 12 hastaya endometrial örnek almak amacı ile Pipelle yardımıyla biyopsi yapılmış ve akabinde bu hastalardan 11 tanesinin gebe kalması üzerine, lokal endometrial hasarlamanın implantasyonu arttırdığı öne sürülerek yeni bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya 45 çalışma grubu 89 da kontrol grubu olmak üzere toplam 134 hasta alınmış ve çalışma grubundaki hastalara siklusun 8, 12, 21 ve 26. günlerinde Pipelle ile endometrial hasarlama yapılmıştır ve hasarlama yapılan grupta klinik gebelik 2 kat daha fazla oranda izlenmiştir. (%67’ye karşılık %30)⁸⁷.

1907’de pregestasyonel gine domuzlarının uterusunun çizilmesinden kaynaklanan yaralanmanın uterusda desidual hücre benzeri hücre gelişimini tetiklediği bildirilmiştir. Ratlarda yapılan diğer deneyler intrauterin yağ enjeksiyonu gibi diğer travma formları tarafından da endometrial desidualizasyonun induklenebileceğini göstermiştir^{88,89}.

Yapılan bir çok çalışma ve meta-analizde RIF tanılı hastalarda kontrollü endometrial hasarlamadan sonra klinik gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir.⁶⁶

Endometrial hasarlamanın desidualizasyonu kolaylaştırması, lokal bir inflamatuvar süreçle tetiklenen pro-inflamatuvar sitokin, interlökin ve growth faktorleri artırması, makrofaj ve dendritik hücre göçüne bağlı yarattığı immun cevapla reseptiviteyi arttırması etki mekanizmalarındandır. Mekanik bir teori, kontrollü endometrial hasarlamanın endometrial olgunlaşmada bir gecikmeye ve ardından endometriyum ile embriyo arasındaki eşzamanlılığın artmasına neden olduğunu belirtir⁹⁰.

2007 yılında Raziel ve ark. en az 4 başarısız embriyo transferi olan 60 hasta ile, stimulasyondan önceki siklusun luteal fazında 2 kere Pipelle ile kontrollü endometrial hasar oluşturmuş ve bu prospektif çalışmada klinik gebelik (%30'a karşılık %12 p=0.02) ve devam eden gebelik oranlarını (%22'ye karşılık %8 p=0.07) hasarlama yapılan grupta anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.⁶¹

2009'da Karimzadeh ve ark. iki ve daha fazla implantasyon başarısızlığı olan 115 hasta ile randomize kontrollü çalışma yapmış olup bu çalışmada, endometrial hasarlama luteal fazda tek seferde biyopsi katateri ile yapılmıştır ve sonucunda klinik gebelik oranı anlamlı yüksek izlenmiştir. (%27.1'e karşılık %8.9 P = 0.02)⁶²

2010 yılında Narvekar ve ark. tarafınca yapılan 115 hastayı içeren prospektif bir çalışmada, tedaviden önceki siklusun folliküler ve luteal fazında olmak üzere 2 farklı kez Pipelle ile endometrial hasarlama yapılmış ve çalışma grubunda klinik gebelik oranları anlamlı olarak yüksek izlenmiştir⁹¹. (%32.7'ye karşılık %13.7 P = 0.01)

2023 yılında Maged ve ark tarafından yayımlanan metaanalizde 9084 kadını içeren 41 çalışma analize dahil edilmiş ve endometrial hasarlamanın IVF/ICSI geçiren kadınlarda klinik gebelik, canlı doğum, çoklu gebelik ve implantasyon oranlarını arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre hasarlama stimülasyon döngüsünden önceki döngünün foliküler veya luteal fazı sırasında yapıldığında klinik gebelikte ve canlı doğum oranlarında önemli bir iyileşme vardı. Bu iyileşme, aynı stimülasyon döngüsünün foliküler fazında veya hem foliküler hem de luteal fazlarda hasarlama uygulananlarda anlamlı değildi. İlk IVF döngüsünü geçiren kadınlarda yararlı etkisi gösterilememiştir. Kontrollü hasarlamanın sayısı ve yoğunluğu ile ilgili olarak, tek ve hafif ila orta yoğunlukta bir çizik geçiren kadınlarda klinik gebelik oranının en çok arttığını göstermiştir⁹².

Hayvan deneylerinde, genetik ve immunolojik çalışmalarda endometrial hasarlamanın reseptiviteyi arttırdığı bildirilse de ⁹³Klinik çalışma sonuçlarında fikir birliğine varılamamıştır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının evrensel kabul gören bir tanımının olmamasından dolayı hasta popülasyonundaki farklılıklar bu durumun nedenlerinden birisi olarak düşünülebilir.

Birçok çalışmaya göre tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalar için endometrial hasarlama efektif bir yöntem olarak görülse de, endometrial hasarlama yöntemi, işlemin zamanlaması ve hasta seçimi için daha çok çalışma ve veriye ihtiyaç duyulmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Kliniği'nde Mayıs 2023-Ağustos 2023 tarihlerinde IVF tedavisi olan ve gerekli kriterleri karşılayan 22 hasta çalışma grubu ve 16 hasta kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. Katılımcıların tamamından bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Çalışmamız Hastanemiz Etik Kurulu tarafından 84 sayı numaralı karar ile onaylanmıştır.

Çalışma grubu 23-35 yaş arası IVF / ICSI sonrası en az 2 yüksek kaliteli blastokist transferine rağmen gebelik elde edilemeyen hastalardan oluşturuldu. Kontrol grubu; 23-45 yaş arasında en az 1 canlı doğumu olan, ovulatuvar siklusa sahip, infertilite dışındaki jinekolojik nedenlerle endometrial biyopsi yapılan hastalardan oluşturuldu.

Endometrial biyopsi sonucunda, kronik endometrit, endometrial polip, submüköz myom gibi patolojiler bulunan hastalar, Diyabetes Mellitus, herhangi bir jinekolojik malignite gibi endometrial reseptiviteyi etkileyebilecek sistemik hastalığı olan hastalar, Turner Sendromu, endometriozis, hidrosalpinks gibi infertiliteye neden olabilecek başka bir patolojisi bulunan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya dahil edilen hastalara siklusun 2.-3. Gününde kontrollü ovaryan stimülasyon için GnRH antagonist protokolü uygulanmıştır. Stimülasyon için gonadotropin dozları 75-450 IU arasında değişmektedir. Tedaviye hastanemizin tüp bebek konseyinde belirlenen dozlarda başlanmaktadır. Dominant folikül 13 mm'ye ulaştıktan sonra tedaviye GnRH antagonistleri eklenmiş ve kullanımı tetiklenme gününe kadar devam etmiştir. Antagonist olarak cetrorelix (Cetrotide/Serono®) günlük 0.25mg dozda subcutan olarak uygulanmıştır. Bu süreçte seri transvajinal

ultrasonografi ölçümleri yapılmış ve serum E2 düzeyleri takip edilmiştir. Ovulasyon tetiklenmesi dominant folikülün 18 mm'ye ulaşmasıyla 250µgr rekombinant hCG (Ovitrelle®) kullanılarak yapılmıştır. Ovulasyonun tetiklenmesinden yaklaşık 36 saat sonra oosit toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Olguların tamamına ICSI uygulanmış ve sonrasında kaliteli embriyolara vitrifikasyon ile blastosist aşamasında kriyoprezervasyon prosedürü uygulanmıştır.

Hastalara aynı siklusun 21-24. Gününde kontrollü endometrial hasarlama pipelle kullanılarak yapıldı..Hasarlama yapılırken; Pipelle servikal os'tan direnç hissedilene kadar nazıkçe ilerletildi. Cihazın iç pistonu daha sonra emme oluşturmak için çekildi ve Pipelle endometrial kavite içinde yaklaşık 2-3 cm yukarı ve aşağı hareket ettirildi, ancak servikal os'un distaline geçmedi. Bu esnada kanüle gelmiş olan endometrial örnek izotonik %0.9 NaCl çözeltisi içine aktarıldı ve doku laboratuvarına nakledildi. Doku Tipleme Laboratuvarı'na transfer edilen örnekler, 70 mikron porlu filtrelerden süzülerek tek hücre süspansiyonu elde edildi. Hücreler 300 g hızda üç dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) içinde süspanse edildi. Tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler, EpCAM-Alexa Fluor 488 (Biolegend #324210), HLA G-PE (Biolegend #335906), CD56-PC5 (Biolegend #304608), CD49a-PC7 (Biolegend # 328311), CD158-APC (Biolegend #339509), CD159a-Alexa Fluor 700 (Biolegend # 375119), CD45-Krome Orange (Beckman Coulter #A96416) ve CD16- Brilliant Violet605 (Biolegend #302039) antikorları ile oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edilerek işaretlendi. İnkübasyon süreci sonunda eritrositler, VersaLyse lisiz solüsyonu (Beckman Coulter #A09777) ile karanlıkta 15 dakika inkübe edilerek uzaklaştırıldı.

Hücreler DxFLEX akan hücre ölçer sistemi kullanılarak okutuldu ve veriler CytExpert for DxFLEX yazılımı ile analiz edildi. Veri analizi için CD45+ hücre popülasyonu üzerinde lenfosit grubundan kapılama yapıldı; NK hücreleri CD56 ifadelerine göre değerlendirildi¹, kapılanan NK hücre alt tipleri üzerinde HLA-G ifadesi değerlendirildi. Endometrial NK hücrelerinin alt tiplerinde ayrıca öldürücü hücre immünglobulin-benzeri reseptörler CD158 ve CD159a ifadeleri analiz edildi.

Kontrollü endometrial hasarlama yapılan hastalara işlemden sonraki siklуста Estradiol (Estrofem 2 mg, Novo Nordisk), döngünün ikinci gününden başlayarak günde 6 mg/gün dozla oral yoldan uygulandı. Estradiolün başlamasından 10-12 gün

sonra endometrial kalınlık ve paterni değerlendirmek için ultrason muayenesi yapıldı. Endometrial kalınlık ölçüldü ve myometriyum ile endometrial yüzey arasındaki maksimum mesafe (mm) olarak kaydedildi. $\geq 7,5$ mm'lik kalınlığa ulaşıldıktan sonra luteal fazı desteklemek için hastalara intravajinal olarak günde 3 x 200 mg mikronize progesteron uygulandı. Blastosistler progesteron uygulamasını takiben (gelişim aşamasına bağlı olarak) 5. günde veya 6. günde transfer edildi. Transfer sonrası 12. günde serum Beta hCG kontrolü yapıldı

3.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

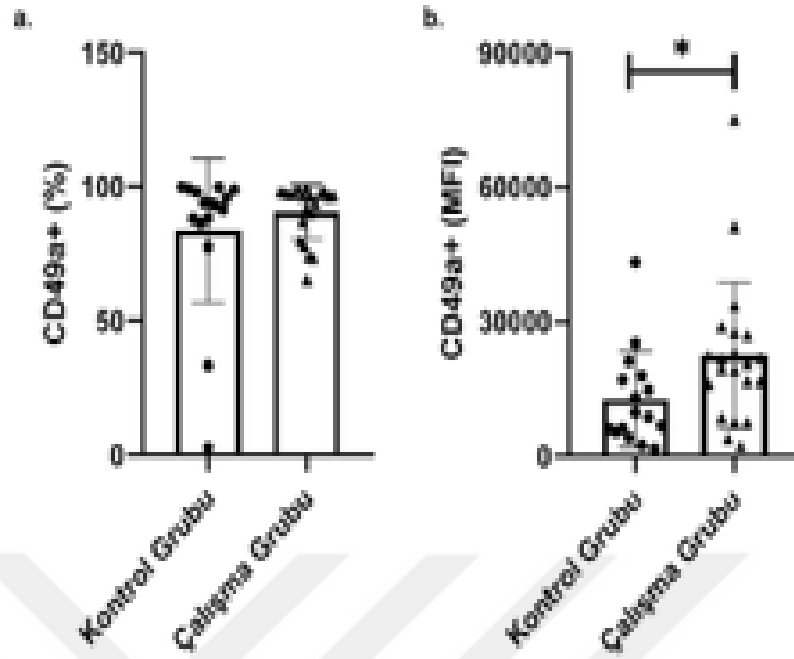
İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism (versiyon:8) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin kıyaslanmasında t-test, normal dağılım göstermeyen verilerin kıyaslanmasında ise Mann-Whitney U test uygulanmıştır. Parametreler arası korelasyon Pearson korelasyon analizi ile incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilme kriterlerini karşılayan 38 hasta katılmış olup bunların 22 si çalışma 16 sı kontrol grubuna dahil edildi. Çalışma ve kontrol grubundan 1'er hastanın doku analizinde gerekli incelemeyi yapabilmek için yeterli miktarda NK hücresi izlenmedi (< 2000 hücre) ve bundan dolayı 2 hasta çalışma dışı bırakıldı. Çalışma grubumuzun yaş ortalaması 31,7 kontrol grubumuzun yaş ortalaması 40,1 idi. Çalışma grubundaki 7 hasta açıklanamayan infertilite, 7 hasta düşük over rezervi, 3 hasta polikistik over, 2 hasta tubal faktör, 2 hasta da erkek faktör infertilite tanısına sahipti. 1 hastanın 7, 1 hastanın 6, 2 hastanın 4, 10 hastanın 3, 7 hastanın 2 başarısız ivf denemesi vardı.

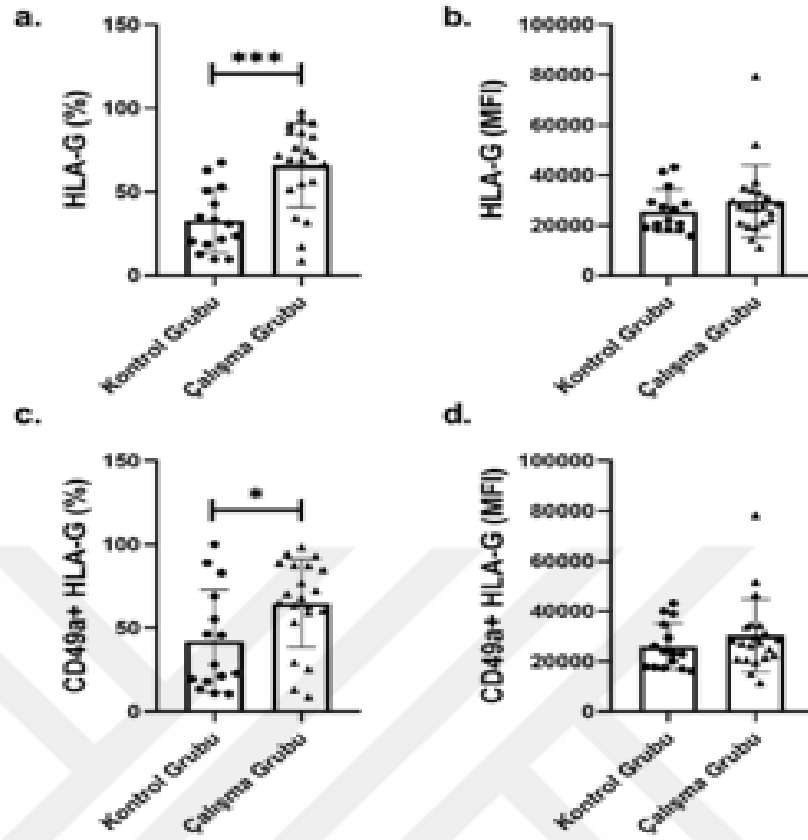
	Açıklanamayan İnfertilite Grubu (n:7)	Düşük Over Rezerv Grubu (n:7)	Tubal Faktör Grubu (n:2)	Pcos Grubu (n:3)	Male Faktör Grubu (n:2)
FSH	6.4	8.35	5.1	5.16	5.95
LH	6.02	6.81	4.2	9.36	7.7
ESTRADIÖL	39.02	42.4	27.1	40.3	45
PROLAKTİN	16.2	16	12.9	19.9	24
TSH	1.6	2.4	1.56	2.96	2.55

Tablo 1: Infertilite alt gruplarına göre bazal hormon düzeylerinin ortalaması



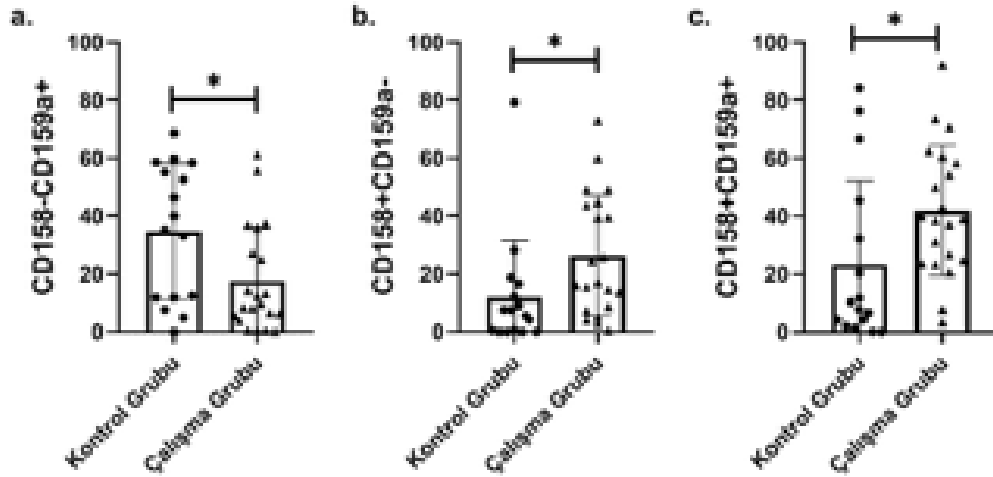
Şekil 1: Kontrol ve çalışma grubunun uterin NK incelemesi (yüzde ve MFI)

Kontrol grubu ve çalışma grubu arasında CD16+CD56+ NK hücreler üzerinde CD49a ifade eden hücre yüzdesi bağlamında anlamlı fark tespit edilememiştir (a). Gruplar arasında CD49a ifadesi ortalama floresan yoğunluğu (MFI) kıyaslandığında, çalışma grubu CD49a MFI değeri kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil-1).



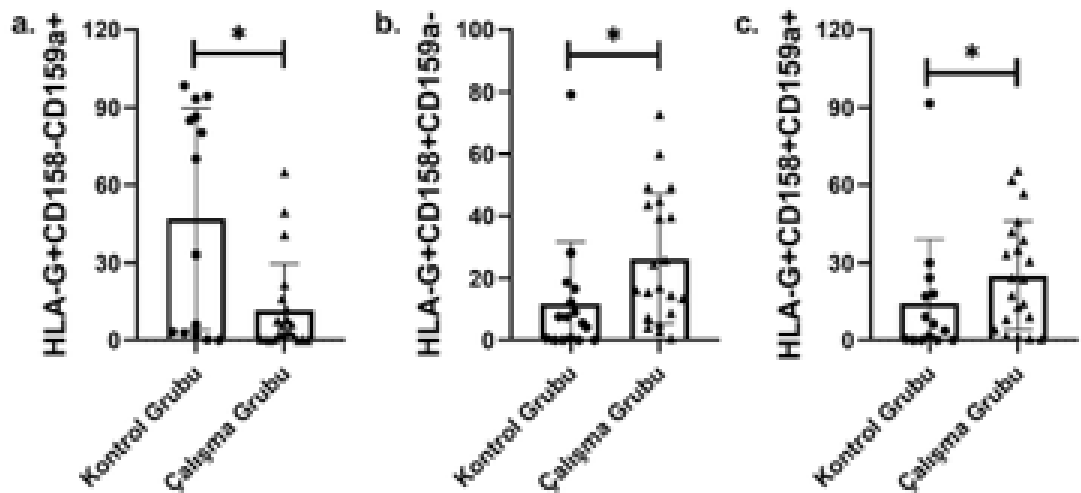
Şekil 2: Kontrol ve çalışma grubunun total ve uterin NK hücreleri yüzeyinde ifade edilen HLA-G incelemesi (yüzde ve MFI)

Kontrol grubu ve çalışma grubu arasında CD16+CD56+ NK hücreler üzerinde HLA-G ifade eden hücre yüzdesi çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (a) ($p < 0.001$). Gruplar arasında HLA-G ifadesi MFI değeri kıyaslandığında anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0.05$) (b). Benzer şekilde, kontrol grubu ve çalışma grubu arasında CD16+CD56+CD49a uterin NK hücreler üzerinde HLA-G ifade eden hücre yüzdesi çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (a) ($p < 0.05$), fakat HLA-G MFI değeri kapsamında fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).



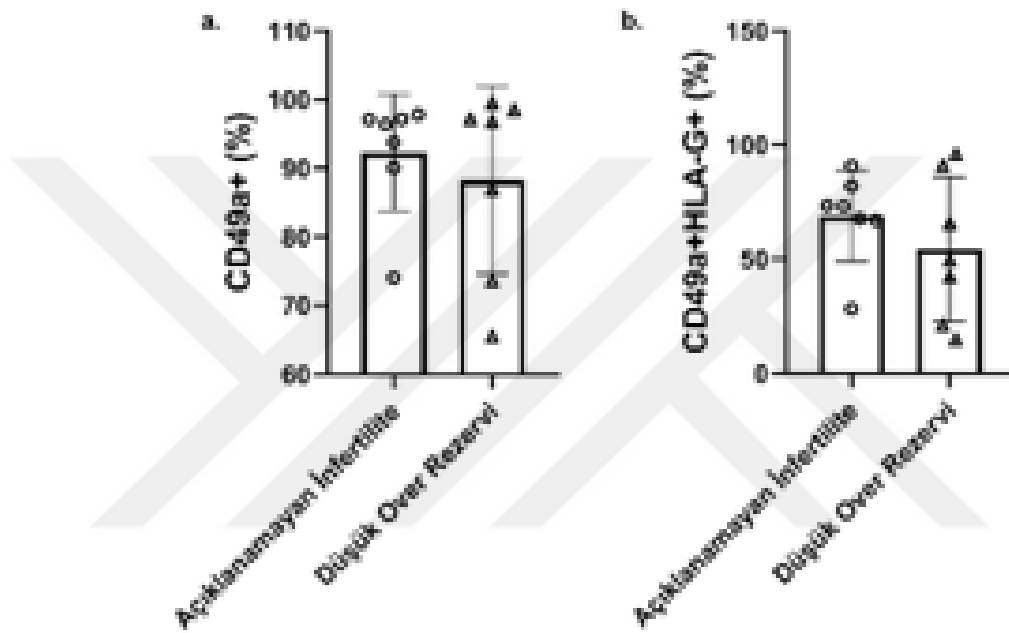
Şekil 3: Kontrol ve çalışma grubunun NK üzerindeki CD158-CD159a reseptörlerinin karşılaştırılması

Kontrol grubu ve çalışma grubu arasında NK hücre reseptörleri karşılaştırıldığında yalnızca CD159a ifadesine sahip hücre popülasyonunun kontrol grubunda (a), yalnızca CD158 ifadesine sahip hücre popülasyonunun ise çalışma grubunda (b) anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). CD158+CD159a+ hücreler ise çalışma grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (c).



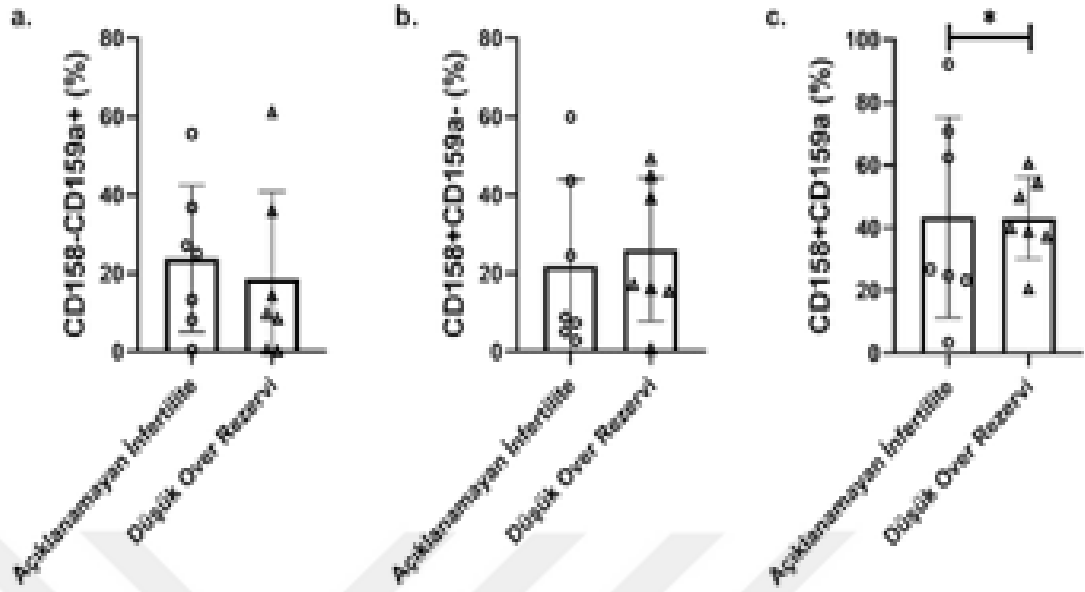
Şekil 4: Kontrol ve çalışma grubunun HLA-G ifadesine sahip NK hücreleri üzerinde eksprese edilen CD158 ve CD159a reseptörlerinin karşılaştırılması

Kontrol grubu ve çalışma grubu arasında HLA-G ifadesine sahip NK hücreler üzerinde CD158 ve CD159a reseptörleri karşılaştırıldığında yalnızca CD159a ifadesine sahip hücre popülasyonunun kontrol grubunda (a), yalnızca CD158 ifadesine sahip hücre popülasyonunun ise çalışma grubunda (b) anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). CD158+CD195a+ hücreler ise çalışma grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (c).



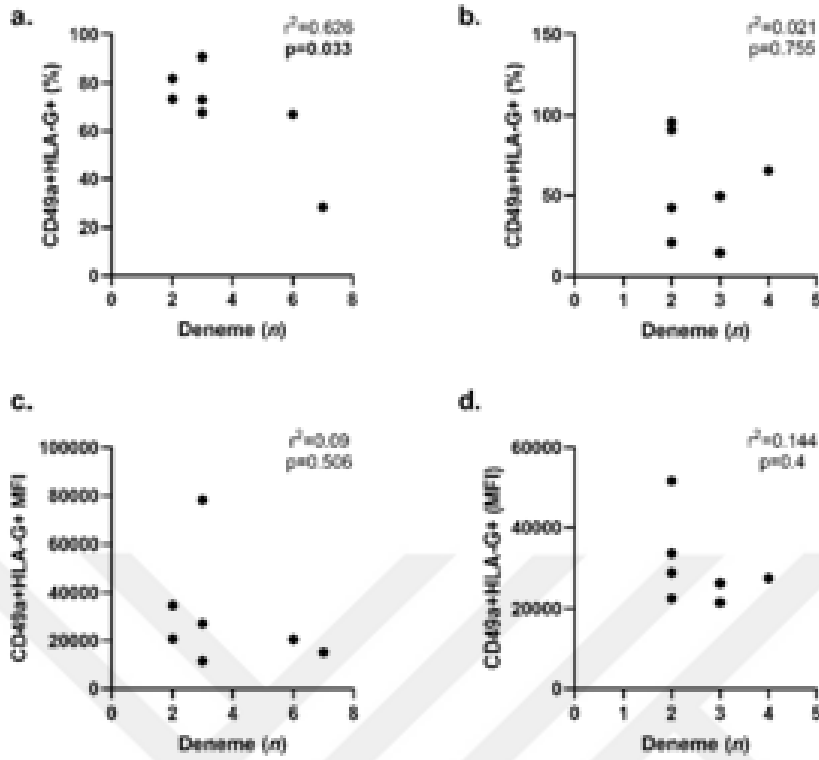
Şekil 5: Açıklanamayan infertilite ve DOR grubu hastaların uterin NK hücre ve HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri

Açıklanamayan infertilite ve düşük over rezervi tanımlı bireylerin örnek uterin NK hücre ve HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri kıyaslandığında gruplar arasında açıklanamayan infertilite grubunda hem CD49a+ uterin NK hücrelerinin yüzdesinin (a) hem de HLA-G ifade eden CD49a+ uterin NK hücrelerinin yüzdesinin (b) yüksek olduğu tespit edilmiş, ancak hasta grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



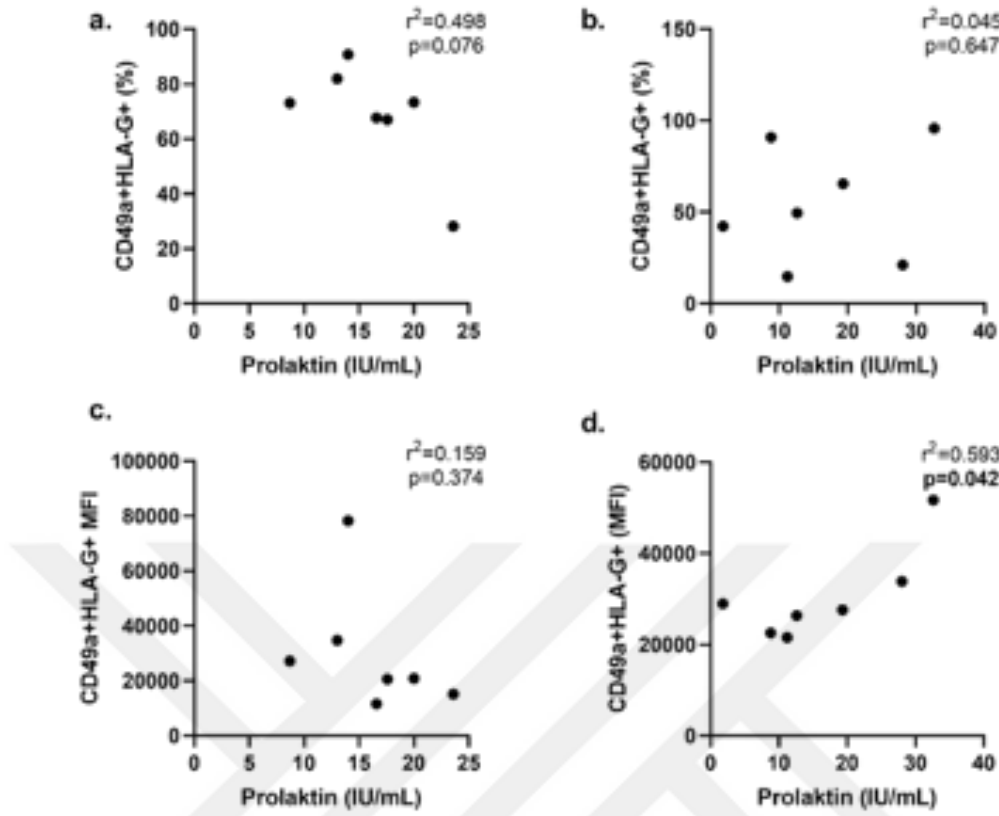
Şekil 6: Açıklanamayan infertilite ve DOR grubu hastaların CD158 ve CD159 NK hücre reseptörlerinin karşılaştırılması

Hasta grupları arasında NK hücre reseptörleri bakımından yapılan kıyaslamalarda yalnızca CD159a (a) ve yalnızca CD158 (b) ifadesine sahip hücre popülasyonlarının hasta grupları arasında anlamlı fark göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). CD158+CD159a+ hücreler açıklanamayan infertilite grubunda anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (c).



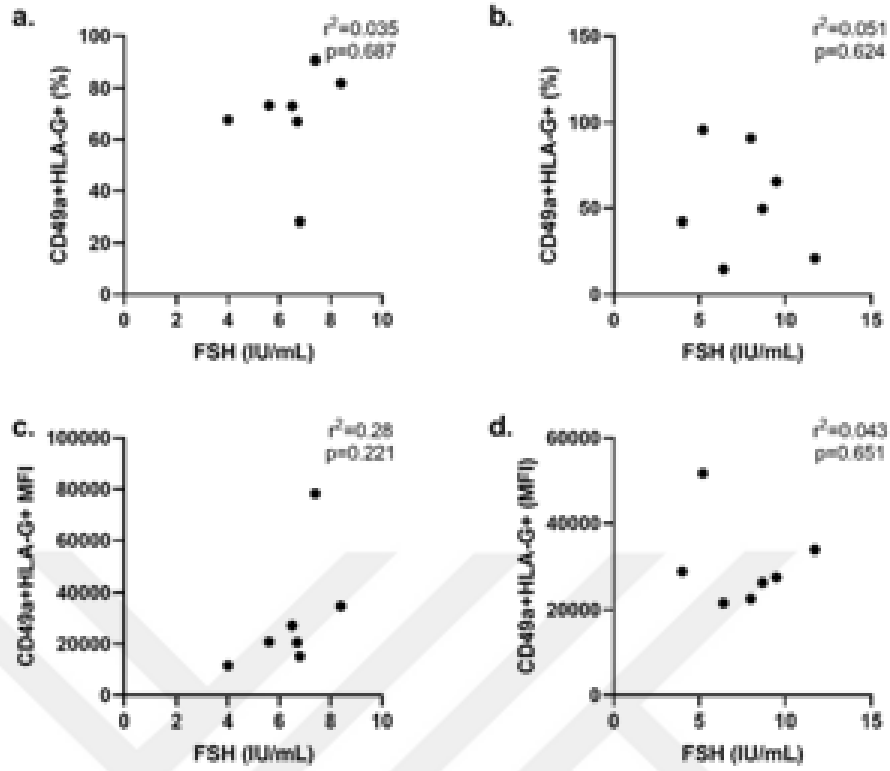
Şekil 7: Hasta gruplarının implantasyon deneme sayıları ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Hastaların implantasyon deneme sayıları ve HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizinde açıklanamayan infertilite grubunda implantasyon deneme sayısı ile HLA-G ifadesi arasında negatif yönlü korelasyon tespit edilmiştir (a) ($r^2=0.626$, $p=0.033$). Düşük over rezervi grubunda HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri ile implantasyon deneme sayıları arasında korelasyon bulunmamıştır (b) ($r^2=0.021$, $p=0.755$). Hasta gruplarında uterin NK hücreler üzerinde HLA-G ortalama floresan yoğunluğu ile implantasyon deneme sayısı arasındaki korelasyon incelendiğinde açıklanamayan infertilite (c) ($r^2=0.09$, $p=0.506$) ve düşük over rezervi (d) ($r^2=0.144$ $p=0.04$) grupları arasında korelasyon tespit edilememiştir.



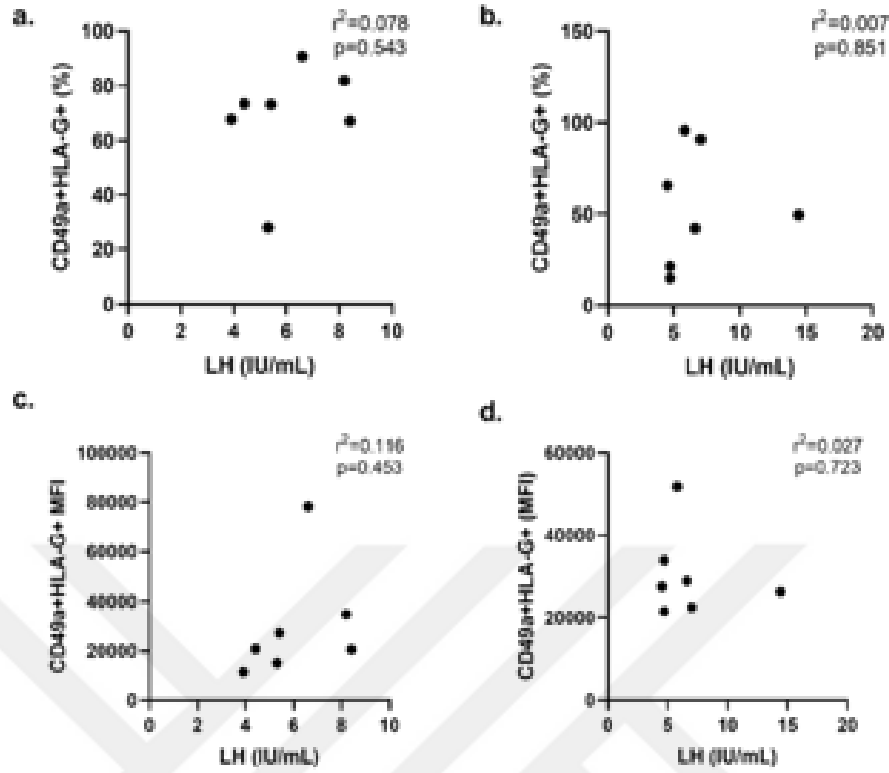
Şekil 8: Hasta gruplarının prolaktin seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Hastaların prolaktin seviyeleri ve HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizinde hem açıklanamayan infertilite (a) ($r^2=0.498$, $p=0.076$), hem de düşük over rezervi gruplarında (b) ($r^2=0.045$, $p=0.647$) HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri ve prolaktin seviyeleri arasında korelasyon tespit edilememiştir. Benzer şekilde açıklanamayan infertilite grubunda uterin NK hücreler üzerinde HLA-G ortalama floresan yoğunluğu ile prolaktin seviyesi arasında korelasyon bulunmamaktadır (c) ($r^2=0.159$, $p=0.374$). Ancak düşük over rezervi grubunda uterin NK hücreler üzerinde HLA-G ortalama floresan yoğunluğu ile prolaktin seviyesi arasında anlamlı pozitif yönlü korelasyon tespit edilmiştir (d) ($r^2=0.593$, $p=0.042$).



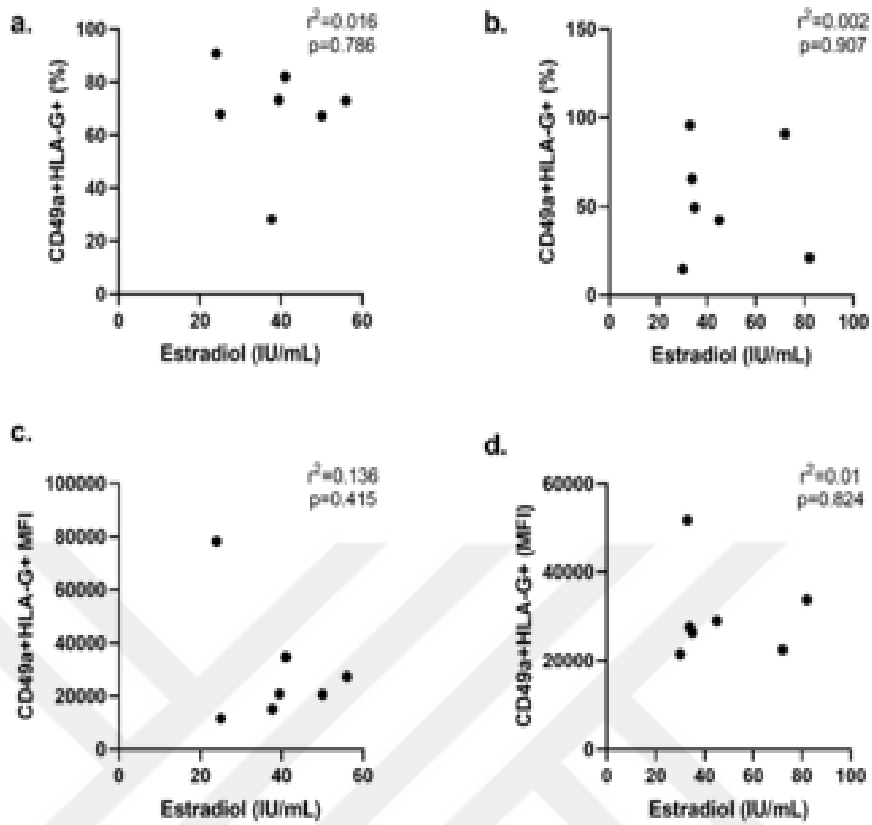
Şekil 9: Hasta gruplarının FSH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Her iki hasta grubunda da hem HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri (açıklanamayan infertilite grubu (a) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.035$, $p=0.687$; düşük over rezervi grubu (b) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.051$, $p=0.624$), hem de uterin NK hücreleri üzerinde HLA-G ifadesinin MFI değerleri (açıklanamayan infertilite grubu (c) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.28$, $p=0.211$; düşük over rezervi grubu (d) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.043$, $p=0.651$) ile folikül stimulan hormon (FSH) seviyeleri arasında korelasyon izlenmemiştir.



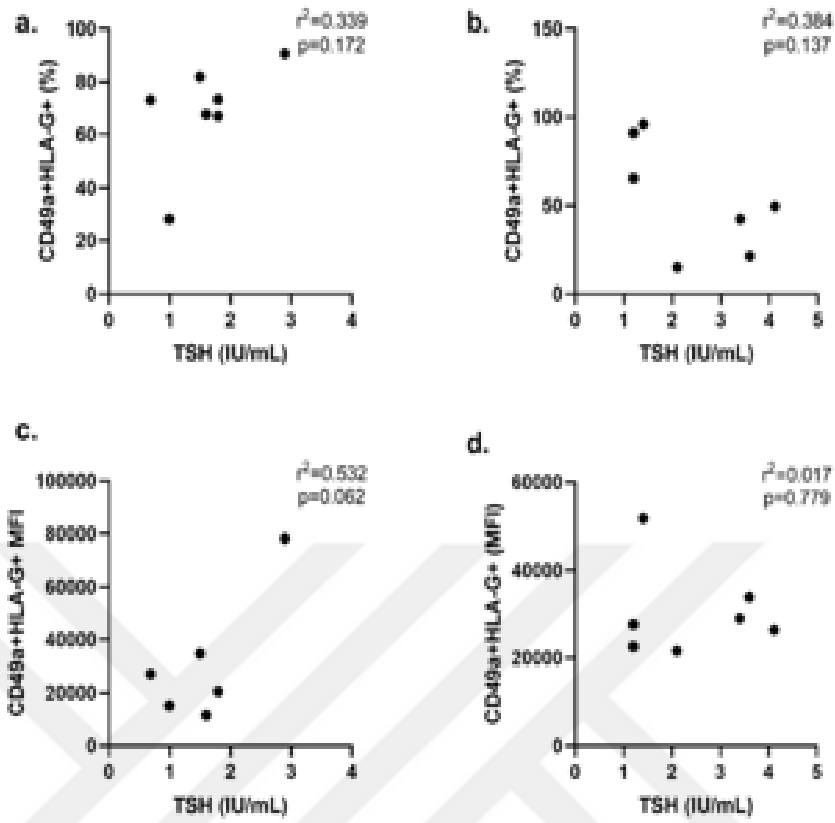
Şekil 10: Hasta gruplarının LH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Her iki hasta grubunda da hem HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri (açıklanamayan infertilite grubu (a) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.078$, $p=0.543$; düşük over rezervi grubu (b) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.007$, $p=0.581$), hem de uterin NK hücreleri üzerinde HLA-G ifadesinin MFI değerleri (açıklanamayan infertilite grubu (c) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.116$, $p=0.453$; düşük over rezervi grubu (d) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.027$, $p=0.723$) ile lüteinizan hormon (LH) seviyeleri arasında korelasyon izlenmemiştir.



Şekil 11: Hasta gruplarının estradiol seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Her iki hasta grubunda da hem HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri (açıklanamayan infertilite grubu (a) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.016$, $p=0.786$; düşük over rezervi grubu (b) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.002$, $p=0.907$), hem de uterin NK hücreleri üzerinde HLA-G ifadesinin MFI değerleri (açıklanamayan infertilite grubu (c) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.136$, $p=0.415$; düşük over rezervi grubu (d) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.01$, $p=0.824$) ile estradiol seviyeleri arasında korelasyon izlenmemiştir.



Şekil 12: Hasta gruplarının TSH seviyesi ve HLA-G+ uterin NK hücre ekspresyonu arasındaki korelasyon analizi (yüzde ve MFI)

Her iki hasta grubunda da hem HLA-G ifadesine sahip uterin NK hücre yüzdeleri (açıklanamayan infertilite grubu (a) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.339$, $p=0.172$; düşük over rezervi grubu (b) CD49a+HLA-G+ (%) $r^2=0.384$, $p=0.137$), hem de uterin NK hücreleri üzerinde HLA-G ifadesinin MFI değerleri (açıklanamayan infertilite grubu (c) CD49a+HLA-G+ (MFI) 0.532, $p=0.062$; düşük over rezervi grubu (d) CD49a+HLA-G+ (MFI) $r^2=0.017$, $p=0.779$) ile tiroid stimulan hormon (TSH) seviyeleri arasında korelasyon izlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı YÜT tedavilerindeki hız kısıtlayıcı basamaklardan biridir. Tanımlarda transfer edilen embriyonun genellikle iyi kaliteli olarak belirtilmesinden dolayı implantasyon başarısızlığı ile ilgili çalışmalar daha çok uterus üzerine yapılmaktadır. Endometrial alıcılıkta anormallik, implantasyon başarısızlıklarının üçte ikisinden sorumlu tutulmaktadır⁷². Endometrial reseptiviteyi etkileyerek RIF nedeni olabilecek moleküller üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Uterin NK hücreleri implantasyon sırasında endometriyumdaki ana lökosit popülasyonudur, bu da RIF patogenezi araştırılıyorsa uNK hücrelerine odaklanması gerektiğini düşündürmektedir. Bu hücrelerin, anne toleransını sürdürmede merkezi bir rol oynadığına inanılmaktadır ve yüksek NK hücre aktivitesi, gebelik başarısızlığı ve infertilite ile ilişkilidir. Düzenlenmemiş bir şekilde hareket eden yerel endometriyal NK hücrelerinin infertiliteye yol açabileceği hipotezi, yerel endometriyal NK hücre popülasyonunun karakterizasyonuna olan ilgiyi artırmıştır.

Endometriumun embriyoyu kabul ederek başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesi için immuntolerans gereklidir. HLA-G trofoblastik hücre invazyonunu kontrol etmek ve lokal immünosüpresif durumu korumak için sitokin sekresyonunu modüle ederek implantasyonda kilit rol oynar³⁰ ve NK hücre aracılı sitotoksiteyi inhibe eder³².

Bu çalışma nedeni belirlenemeyen tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastaların mid-luteal dönemde alınan endometrial biyopsilerinde NK hücreleri üzerindeki HLA-G, CD49, CD158, CD159a ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla yapıldı.

CD49a, kolajen ve laminin bağlayan bir integrin alfa alt birimidir ve farelerde dokuya yerleşik NK (trNK) hücre alt kümelerini tanımlamak için bir belirteç olarak doğrulanmıştır^{94,95}. Uterin dokuya yerleşik NK hücreleri CD49a eksprese etmektedir. Flow sitometri ve immünohistokimya kullanılarak yapılan bazı çalışmalar, RIF olan kadınların endometriyumunda peri-implantasyon döneminde uNK hücrelerinin sayısının arttığını bildirmiştir⁹⁶⁻⁹⁸. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan bir çalışma, uNK hücrelerinin endometrial arteriyollere göre sayısının ve dağılımının, RIF olan kadınlarda, IVF'den sonra embriyo implantasyonunun başarılı olduğu

kadınlarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı olmadığını göstermiştir ⁹⁹. Bir meta-analiz, uNK hücre sayısında artış olsun ya da olmasın kadınlar arasında IVF sonuçlarında farklılık olmadığını gösterdi ¹⁰⁰. Bu paradoksal sonuçlar, laboratuvar protokollerindeki farklılıklardan veya endometriyumdaki örneklemenin yapıldığı siklus zamanından kaynaklanabilir. Hücre analizi için şu anda kullanılan iki yöntemden biri olan IHC, uNK hücre popülasyonlarını ölçmede flow sitometriye göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü periferik kan hücrelerini içermez ve özellikle endometrial stromada uNK hücrelerinin tanımlanmasını sağlar. Aynı anda binlerce hücre üzerinde birden çok parametrenin değerlendirilmesine olanak sağlayarak, flow sitometri IHC ye bir alternatif olabilir. Bununla birlikte, IHC protokollerindeki farklılıklar, laboratuvarlar arasında bildirilen uNK hücrelerinin sayısında farklılıklara neden olmuştur ¹⁰¹. Belki de uygun endometrial numunelerin elde edilmesindeki zorluk nedeniyle, uNK hücrelerinin RIF'deki rolü üzerine çok az çalışma yapılmıştır.

2019 da fertil hastalara kıyasla RIF olan kadınlarda CD56+ ve CD16+ uNK hücre sayılarının ve bunların endometriyal arteriyollere göre dağılımının değişeceğini varsayarak yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar hipotezi desteklememiş, uNK hücre sayıları fertil hastalara kıyasla RIF olan kadınlarda farklılık göstermemiştir. Bu bulguları destekleyen iki çalışma daha mevcuttur^{102,103}. Yine bu çalışmada endometrial arterioller incelemeye alınmış fertil grupta arteriyollere en yakın uNK'lerde önemli bir artış gösterilmişken bu artış RIF grubunda gösterilememiş olup bu durum doğrulanırsa, RIF grubunda spiral arteriyollere uNK alımının azaldığı ve bunun bir şekilde implantasyonu tehlikeye attığı düşünülebilir. Genel olarak literatürde uNK hücre sayıları için normal aralığın ne olduğu ve bunların RIF hastalarında değişip değişmediği konusunda fikir birliği yoktur. Bu nedenle, 'anormal' uNK hücre sayıları için RIF öyküsü olan IVF uygulayan kadınları tedavi etmek için kabul edilebilir bir kanıt temeli bulunmamaktadır.

2013 yılında yayımlanan ve 22 çalışmanın dahil edildiği bir meta analizde de infertil ve doğurgan kadınlarda periferik ve uterin NK (uNK) hücre yüzdelerini değerlendiren çalışmaların meta analizi, iki grup arasında anlamlı bir fark göstermedi¹⁰⁴. Biz de çalışmamızda Kontrol grubu ve çalışma grubu arasında

CD16+CD56+ NK hücreler üzerinde CD49a ifade eden hücre yüzdesi bağlamında anlamlı fark tespit edemedik ancak gruplar arasında CD49a ifadesi ortalama floresan yoğunluğu (MFI) kıyaslandığında, çalışma grubu CD49a MFI değerini kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulduk

2022 yılında yapılan bir çalışmada, göbek kordon kanı hematopoetik kök hücrelerden (HSC'ler), kemik iliği kök hücrelerinden ve *in vitro* periferik kan NK hücrelerinden insan CD49a⁺ NK hücrelerini indüklemek için üç adet besleyici olmayan hücre indüksiyon sistemi kurularak yüksek seviyelerde CD49a, CD9, CD39, CD151 ekspresyonu, düşük CD16 ekspresyonu seviyeleri gösteren ve bariz sitotoksik özelliği olmayan desidual NK hücrelerine benzer indüklenmiş NK hücreleri üretilmiş ve *in vivo* bir murin gebelik modelinde fetal büyümeyi teşvik edip uterin arter kan akışını iyileştirebileceği öne sürülmüş olup bu araştırma, insan kaynaklı CD49a⁺ NK hücrelerinin, sonunda olumsuz gebelik sonuçları yaşayan hastaları tedavi etmek için kullanılabilecek üç hücreli indüksiyon sistemi yoluyla fetal büyümeyi destekleme yeteneğini göstermektedir¹⁰⁵.

Bir dizi yayınlanmış çalışma, spesifik HLA-G alelleri, genotip ve haplotipler ile IVF tedavisinin başarısı arasında önemli ilişkiler olduğunu bildirmiştir^{106,107}. Ayrıca, birkaç çalışma spesifik HLA-G polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kaybı riskinin artması veya azalması arasında önemli ilişkiler olduğunu bildirmiştir^{108,109}. HLA-G ve infertilite ilişkisini açıklayabilecek patofizyolojik mekanizmalar bulunamamasına rağmen genellikle implantasyon başarısızlığı ve gebelik kaybıyla endometriumda düşük HLA-G ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Papuchova ve arkadaşlarının 2022 yılındaki çalışmasında da bu genel kanının aksine HLA-G ekspresyonu infertil grupta daha yüksek bulunmuştur¹¹⁰. 2005 yılında Rizzo ve arkadaşları primer ve sekonder infertil hasta gruplarından uterin yıkama sıvısı alarak HLA-G ekspresyonunu karşılaştırmış ve primer infertil kadınlarda sHLA-G seviyesi daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, kontrol grubu ve infertil grup arasında CD16+CD56+CD49a uterin NK hücreler üzerinde HLA-G ifade eden hücre yüzdesi infertil grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda HLA-G ekspresyonunun yüksekliğinin; inflamasyon, enfeksiyon veya çevresel stresin implantasyon için elverişsiz ortam oluşturması ile ilgili olduğu

düşünülebilir. Sharkeyet ve arkadaşlarının çalışmasında da gösterildiği gibi HLA-G'nin koitus sonrasında implantasyon için gerekli olan inflamatuvar yanıtı engelleyebilecek aşırı bağışık yanıtı aracılık edebileceği düşünülmüştür. Aynı çalışmada artan CD138+ hücrelerinin kronik endometrit ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve artan HLA-G ekspresyonu kompanzatuvar mekanizma olarak düşünülmüştür¹¹¹. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de HLA-G yüksekliğinin bununla ilişkili olabileceğini düşündük.

HLA-G'nin IVF-ET başarısındaki potansiyel rolü, RIF tanısı olan kadınlar ve eşleri üzerinde HLA sınıf I, HLA sınıf II, HLA-G ve KIR alelleri için genotipleme yapan Lashley ve diğerleri (2014) tarafından da belirtildi ve sonuçlar ilk IVF prosedürlerinden sonra başarılı embriyo implantasyonu olan çiftlerden ve normal fertil çiftlerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Gruplar arasında RIF olan kadınlarda kontrollere kıyasla daha yüksek bir HLA-C2 sıklığı ve HLA-G'ye daha yüksek bir 14 baz çifti (bp) ekleme sıklığı bulundu. Araştırmacılar, bu iki genetik lokusun IVF'nin başarısını etkileyebilecek bir risk faktörü olduğu sonucuna vardılar¹¹².

2009 yılında Mc Grath ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada infertil kadınlardan menstruel siklusun proliferatif fazı sırasında alınan endometriyal numunelerden izole edilen NK hücrelerinde CD158a, sekretuar fazında da CD158b ekspresyonu fertil endometriumlara göre belirgin şekilde daha yüksek izlenmiş¹¹³. Biz de CD158(KIR2DL1) ifadesine sahip hücre popülasyonunu çalışma grubunda anlamlı derecede yüksek bulduk. HLA-G ifadesine sahip NK hücreleri üzerinde CD158 ifadesine sahip hücre popülasyonunu da yine çalışma grubunda anlamlı derecede yüksek izledik. NK hücreleri üzerinde inhibe edici bir etki sergileyen hem CD158a hem de CD158b'nin daha yüksek ekspresyon seviyeleri, lokal NK'yı baskılayarak doğurganlığı etkileyebilir. Azalan NK hücre aktivitesi (örn. sitokin ve büyüme faktörü salgılanması) trofoblast invazyonu ve vasküler büyüme dahil olmak üzere plasental gelişim süreçlerini etkileyerek implantasyonu kolaylaştırabilir.

Buna karşılık, Varla-Leftherioti ve diğerleri (2007,2010), 40 tane RIF hastasında kontrol grubuna kıyasla inhibe edici gen kombinasyonunun (KIR2DL1-HLA-C2)daha az eksprese edildiğini gösterdiler. Ancak, IVF sonrası altı implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda bu kombinasyonu hiç saptamadılar^{114,115}.

2011 de Morandi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma sHLA-G'nin periferik kan ve tonsil lenfoid hücrelerinde bulunan CD56^{bright} ve CD56^{dim} NK hücrelerindeki aktivator (NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, NTBA, 2B4 ve DNAM-1) ve inhibitor (KIR2DL1/S1, KIR2DL2,L3/S2, KIR2DL4 ve ILT2/CD85j) reseptör ekspresyonunu etkilemediğini gösterdi. Yine bu çalışmada sHLA-G'nin, CD94 ve NKG2A(CD159a) moleküllerinin fenotipik ve fonksiyonel bir down regülasyonunu indüklediği gösterildi.

CD94/NKG2A, HLA-E molekülünü bağlar.⁴⁵ HLA-E HLA sınıf I moleküllerinin lider dizisinden üretilen peptidleri bağlayarak CD94/NKG2A reseptörü ile etkileşim yoluyla NK hücrelerine sunar ve NK hücrelerinin HLA-sınıf I moleküllerinin hedef hücreler üzerindeki ekspresyonuna izin verir. HLA-E ve CD94/NKG2A arasındaki etkileşim, HLA-E⁺ hedef hücrelerinin NK hücresi aracılı lizisini inhibe eder.⁴⁵ SHLA-G'nin NK hücreleri üzerinde negative feed back gerçekleştirerek daha önce sHLA-G'ye duyarlı hale getirilmiş NK hücrelerini daha sonra HLA-E molekülü tarafından inhibe edilmeye daha az eğilimli hale getirdiğini tahmin etmek caziptir. sHLA-G'nin NK hücreleri üzerindeki CD94/NKG2A ekspresyonunu down regule etmesinin sitotrofoblast implantasyonu sırasında meydana gelen tolerans kırılması sürecinde ilgili olabileceği düşünüldü 45.Biz de çalışmamızda yalnızca CD159a ifadesine sahip NK hücre popülasyonunu ve HLA-G ifadesine sahip NK hücreleri üzerinde CD159a ifadesine sahip hücre popülasyonunun kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulduk(p<0.05).

Çalışmamızda hasta alt gruplarımızın reseptör ekspresyonlarını kıyasladığımızda CD158+CD159a+ hücreleri açıklanamayan infertilite grubunda anlamlı seviyede yüksek bulduk (p<0.05).Literaturde infertilite alt gruplarının NK hücrelerindeki inhibitör reseptör ekspresyonunu(KIR2DL1,NKG2A)kıyaslayan bir çalışma yoktur. Hasta sayımız kısıtlı olmakla birlikte bu konunun yeni yapılacak çalışmalarla desteklenebileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamız tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda, endometrial reseptivitedeki değişimlere ışık tutmuştur. Ancak çalışmamızdaki hasta sayısı kısıtlıdır ve çalışma grubu başarısız deneme sayısına göre heterojendir. Diğer yandan çalışma ve kontrol grupları hassas bir şekilde tespit edilmiştir. Homojen

popölasyonlarda daha geniş hasta ve kontrol gruplarında çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Hipotezimiz, üreme başarısının annenin fetüse karşı immünolojik toleransına bağlı olduğunu varsayar. Desiduadaki NK hücreleri ile trofoblast arasındaki tüm aktive edici ve inhibe edici sinyallerin dengesi en önemli faktördür ve embriyo implantasyonu üzerinde etkisi olabilir. Bu süreçte yer alan reseptörlerin (KIR, NKG, HLA-C ve HLA-G) genetik altyapısının araştırılmasının, RIF tanısında ve tedavi sonuçlarının tahmininde yardımcı olabileceğine ve hastalık patogenezinin aydınlatılmasına yardımcı olabileceğine inanıyoruz. Ancak homojen popölasyonlarda daha geniş hasta ve kontrol gruplarında çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKÇA

1. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):365-377. doi:10.1093/HUMUPD/DMM011
2. Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(11):1227-1239. doi:10.1007/S10815-012-9861-4/METRICS
3. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Mini Review-Developments in Reproductive Medicine Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Human Reproduction*. 2006;21(12):3036-3043. doi:10.1093/humrep/del305
4. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2012.09.023
5. (ESHRE) TEIMC (EIM) for the ES of HR and E, Gliozheni O, Hambartsoumian E, et al. ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open*. 2021;2021(3):1-17. doi:10.1093/HROPEN/HOAB026
6. Hull MGR, Glazener CMA, Kelly NJ, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985;291(6510):1693-1697. doi:10.1136/BMJ.291.6510.1693
7. YILMAZ F, TEKMEK I. Blastosist gelişimi; hücre soylarının farklanma mekanizmaları. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2018;32(3):243-250. doi:10.5505/DEUTFD.2018.92400
8. Sengupta J, Ghosh D. Multi-level and multi-scale integrative approach to the understanding of human blastocyst implantation. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014;114(1):49-60. doi:10.1016/J.PBIOMOLBIO.2013.12.001
9. Leita B, Jones MC, Fusi L, et al. Silencing of the JNK pathway maintains progesterone receptor activity in decidualizing human endometrial stromal cells exposed to oxidative stress signals. *The FASEB Journal*. 2010;24(5):1541-1551. doi:10.1096/FJ.09-149153
10. Martel D, Frydman R, Glissant M, Maggioni C, Roche D, Psychoyos A. Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol*. 1987;114(2):319-324. doi:10.1677/JOE.0.1140319
11. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod*. 1999;14 Suppl 2(SUPPL. 2):99-106. doi:10.1093/HUMREP/14.SUPPL_2.99

12. Hambartsoumian E. Leukemia inhibitory factor (LIF) production by human decidua and its relationship with pregnancy hormones. *Gynecol Endocrinol.* 1998;12(1):17-22. doi:10.3109/09513599809024965
13. Azargoon A, Mirrasouli Y, Barough MS, Barati M, Kokhaei P. The State of Peripheral Blood Natural Killer Cells and Cytotoxicity in Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *Int J Fertil Steril.* 2019;13(1):12-17. doi:10.22074/IJFS.2019.5503
14. Zhang T, Zhu W, Zhao Y, et al. Early transient suppression of immune checkpoint proteins T-cell immunoglobulin mucin-3 and programmed cell death-1 in peripheral blood lymphocytes after blastocyst transfer is associated with successful implantation. *Fertil Steril.* 2020;114(2):426-435. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2019.12.022
15. Harper MJK. Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? *Biol Reprod.* 1989;40(5):907-913. doi:10.1095/BIOLREPROD40.5.907
16. Sueoka K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. Platelet activating factor-induced early pregnancy factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduct. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(6):1580-1584. doi:10.1016/0002-9378(88)90598-4
17. Nicola C, Chirpac A, Lala PK, Chakraborty C. Roles of Rho guanosine 5'-triphosphatase A, Rho kinases, and extracellular signal regulated kinase (1/2) in prostaglandin E2-mediated migration of first-trimester human extravillous trophoblast. *Endocrinology.* 2008;149(3):1243-1251. doi:10.1210/EN.2007-1136
18. Weston G, Rogers PAW. Endometrial angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(6):919-936. doi:10.1053/beog.2000.0135
19. Miyara M, Sakumoto T, Takamiyagi N, Nakama K, Kimura H, Kanazawa K. Relationship between endometrial histology, morphometry and ultrasound texture in the follicular phase of infertile women with natural menstrual cycles. *Human Reproduction.* 1996;11(8):1719-1723. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019475
20. Bohrer MK, Hock DL, Rhoads GG, Kemmann E. Sonographic assessment of endometrial pattern and thickness in patients treated with human menopausal gonadotropins. *Fertil Steril.* 1996;66(2):244-247. doi:10.1016/S0015-0282(16)58447-7
21. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1975;122(2):262-263. doi:10.1016/S0002-9378(16)33500-1
22. Alfer J, Fattahi A, Bleisinger N, et al. Endometrial Dating Method Detects Individual Maturation Sequences During the Secretory Phase. *In Vivo.* 2020;34(4):1951-1963. doi:10.21873/INVIVO.11992
23. Alfer J, Fattahi A, Bleisinger N, et al. Endometrial Dating Method Detects Individual Maturation Sequences During the Secretory Phase. *In Vivo (Brooklyn).* 2020;34(4):1951. doi:10.21873/INVIVO.11992
24. Sadler, T. W. (2010). *Langman's Medical Embryology....* - Google Akademik. Accessed August 5, 2023. https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Sadler%2C+T.+W.+

- %282010%29.+Langman%E2%80%99s+Medical+Embryology. +%2811th+Ed.%29%2C+Balti
more%3A+Lippincott+Williams+and+Wilkins%2C+31-50&btnG=
25. Moore Keith L, TP and MGT. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 2. (Dalçık H YM, ed.). Nobel tıp Kitabevi ; 2009.
 26. Kostyu DD, Hannick LI, Traweek JL, Ghanayem M, Heilpern D, Dawson D V. HLA Class I Polymorphism: Structure and Function and Still Questions. *Hum Immunol.* 1997;57(1):1-18. doi:10.1016/S0198-8859(97)00175-4
 27. Nagamatsu T, Fujii T, Ishikawa T, et al. A primary cell culture system for human cytotrophoblasts of proximal cytotrophoblast cell columns enabling in vitro acquisition of the extra-villous phenotype. *Placenta.* 2004;25(2-3):153-165. doi:10.1016/j.placenta.2003.08.015
 28. Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, et al. Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol.* 1999;60(11):1054-1057. doi:10.1016/S0198-8859(99)00108-1
 29. Roussev RG, Coulam CB. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(7):288. doi:10.1007/S10815-007-9148-3
 30. Roussev RG, Ng SC, Coulam CB. Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57(4):262-269. doi:10.1111/J.1600-0897.2007.00473.X
 31. Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, et al. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc.* 2001;33(3):2355-2359. doi:10.1016/S0041-1345(01)02020-6
 32. Moffett A, Chazara O, Colucci F, Johnson MH. Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. *Reprod Biomed Online.* 2016;33(6):763-769. doi:10.1016/J.RBMO.2016.08.019
 33. Nowak I, Wilczyńska K, Radwan P, et al. Association of Soluble HLA-G Plasma Level and HLA-G Genetic Polymorphism With Pregnancy Outcome of Patients Undergoing in vitro Fertilization Embryo Transfer. *Front Immunol.* 2020;10. doi:10.3389/FIMMU.2019.02982
 34. Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(12):727-738. doi:10.1093/MOLEHR/GAR052
 35. Dahl M, Hviid TVF. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 2012;18(1):92-109. doi:10.1093/HUMUPD/DMR043
 36. Hviid TVF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update.* 2006;12(3):209-232. doi:10.1093/HUMUPD/DMI048
 37. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod.* 2005;20(1):138-146. doi:10.1093/HUMREP/DEH572
 38. Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, et al. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *Int J Immunogenet.* 2021;48(2):172-192. doi:10.1111/IJI.12513
 39. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta.* 2017;56:44-52. doi:10.1016/J.PLACENTA.2017.03.001

40. Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem.* 2011;113(2):82-91. doi:10.1016/J.ACTHIS.2009.12.001
41. Lédée N, Petitbarat M, Chevrier L, et al. The Uterine Immune Profile May Help Women With Repeated Unexplained Embryo Implantation Failure After In Vitro Fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):388-401. doi:10.1111/AJI.12483
42. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J Reprod Immunol.* 2010;87(1-2):60-66. doi:10.1016/J.JRI.2010.07.001
43. Zhang J, Dunk CE, Kwan M, et al. Human dNK cell function is differentially regulated by extrinsic cellular engagement and intrinsic activating receptors in first and second trimester pregnancy. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(2):203-213. doi:10.1038/CMI.2015.66
44. de Mendonça Vieira R, Meagher A, Crespo ÂC, et al. Human Term Pregnancy Decidual NK Cells Generate Distinct Cytotoxic Responses. *J Immunol.* 2020;204(12):3149-3159. doi:10.4049/JIMMUNOL.1901435
45. Vannuccini S, Bocchi C, Severi FM, Challis JR, Petraglia F. Endocrinology of human parturition. *Ann Endocrinol (Paris).* 2016;77(2):105-113. doi:10.1016/J.ANDO.2016.04.025
46. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature.* 2018;563(7731):347-353. doi:10.1038/S41586-018-0698-6
47. Papúchová H, Meissner TB, Li Q, Strominger JL, Tilburgs T. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/FIMMU.2019.02730
48. Xu X, Zhou Y, Wei H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/FIMMU.2020.592010
49. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006;4(1):0070-0086. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0040009
50. Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35(3):195-204. doi:10.1111/J.1600-0897.1996.TB00031.X
51. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1). doi:10.1186/S12958-018-0414-2
52. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(1):14-38. doi:10.1016/J.RBMO.2013.08.011
53. Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009;10(7):483. doi:10.1631/JZUS.B0820379

54. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1616-1624. doi:10.1093/HUMREP/DER092
55. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(1):14-38. doi:10.1016/J.RBMO.2013.08.011
56. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005;20(1):226-230. doi:10.1093/HUMREP/DEH590
57. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(1):14-38. doi:10.1016/J.RBMO.2013.08.011
58. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2012;97(5):1028-1032. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2012.03.039
59. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):161-174. doi:10.1093/HUMUPD/7.2.161
60. Metwally M, Farquhar CM, Li TC. Is another meta-analysis on the effects of intramural fibroids on reproductive outcomes needed? *Reprod Biomed Online.* 2011;23(1):2-14. doi:10.1016/J.RBMO.2010.08.006
61. Sunkara SK, Khairy M, El-Toukhy T, Khalaf Y, Coomarasamy A. The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2010;25(2):418-429. doi:10.1093/HUMREP/DEP396
62. Pritts EA, Parker WH, Olive DL. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1215-1223. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2008.01.051
63. Bernard G, Darai E, Poncelet C, Benifla JL, Madelenat P. Fertility after hysteroscopic myomectomy: Effect of intramural myomas associated. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2000;88(1):85-90. doi:10.1016/S0301-2115(99)00123-2
64. Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):237-245. doi:10.1111/AJI.12473
65. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(1):14-38. doi:10.1016/J.RBMO.2013.08.011
66. Shokeir TA, Shalan HM, El-Shafei MM. Significance of endometrial polyps detected hysteroscopically in eumenorrheic infertile women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2004;30(2):84-89. doi:10.1111/J.1447-0756.2003.00163.X
67. Pérez-Medina T, Bajo-Arenas J, Salazar F, et al. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1632-1635. doi:10.1093/HUMREP/DEH822
68. AAGL practice report: practice guidelines for the diagnosis and management of endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2012;19(1):3-10. doi:10.1016/J.JMIG.2011.09.003

69. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):14-38. doi:10.1016/J.RBMO.2013.08.011
70. Bildirici I, Bukulmez O, Ensari A, Yarali H, Gurgan T. A prospective evaluation of the effect of salpingectomy on endometrial receptivity in cases of women with communicating hydrosalpinges. *Hum Reprod*. 2001;16(11):2422-2426. doi:10.1093/HUMREP/16.11.2422
71. El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(4):345-354. doi:10.1016/J.RBMO.2012.06.012
72. Franasiak JM, Scott RT. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. *Fertil Steril*. 2017;107(6):1279-1283. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2017.04.019
73. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K, Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(2):141-147. doi:10.1111/AJI.12266
74. Li J, Chen Y, Liu C, Hu Y, Li L. Intravenous immunoglobulin treatment for repeated IVF/ICSI failure and unexplained infertility: a systematic review and a meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(6):434-447. doi:10.1111/AJI.12170
75. Nakagawa K, Kwak-Kim J, Ota K, et al. Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73(4):353-361. doi:10.1111/AJI.12338
76. Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol*. 2011;12(7):597-606. doi:10.1038/NI.2059
77. Koushaeian L, Ghorbani F, Ahmadi M, et al. The role of IL-10-producing B cells in repeated implantation failure patients with cellular immune abnormalities. *Immunol Lett*. 2019;214:16-22. doi:10.1016/J.IMLET.2019.08.002
78. Pathare ADS, Zaveri K, Hinduja I. Downregulation of genes related to immune and inflammatory response in IVF implantation failure cases under controlled ovarian stimulation. *Am J Reprod Immunol*. 2017;78(1). doi:10.1111/AJI.12679
79. Gao M, Sun Y, Xie H, Fang S, Zhao X. Hysteroscopy prior to repeat embryo transfer may improve pregnancy outcomes for asymptomatic women with repeated implantation failure. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;41(10):1569-1576. doi:10.1111/JOG.12773
80. Demirel A, Gurgan T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(5):590-594. doi:10.1016/S1472-6483(10)61108-X
81. El-Toukhy T, Campo R, Sunkara SK, Khalaf Y, Coomarasamy A. A multi-centre randomised controlled study of pre-IVF outpatient hysteroscopy in women with recurrent IVF implantation failure: Trial of Outpatient Hysteroscopy - [TROPHY] in IVF. *Reprod Health*. 2009;6(1):20. doi:10.1186/1742-4755-6-20
82. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2030-2036. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2010.02.022

83. Nastri CO, Lensen SF, Gibreel A, et al. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(3). doi:10.1002/14651858.CD009517.PUB3
84. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003;79(6):1317-1322. doi:10.1016/S0015-0282(03)00345-5
85. Wadhwa L, Mishra M. Therapeutic Efficacy of Endometrial Scratching in Repeated Controlled Ovarian Stimulation (COS) Failure Cycles. *J Hum Reprod Sci.* 2018;11(1):59. doi:10.4103/JHRS.JHRS_130_17
86. Karimzadeh MA, Ayazi Rozbahani M, Tabibnejad N. Endometrial local injury improves the pregnancy rate among recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilisation/intra cytoplasmic sperm injection: a randomised clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009;49(6):677-680. doi:10.1111/J.1479-828X.2009.01076.X
87. Seval MM, Şükür YE, Özmen B, et al. Does adding endometrial scratching to diagnostic hysteroscopy improve pregnancy rates in women with recurrent in-vitro fertilization failure? *Gynecol Endocrinol.* 2016;32(12):957-960. doi:10.1080/09513590.2016.1190818
88. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003;79(6):1317-1322. doi:10.1016/S0015-0282(03)00345-5
89. Humphrey KW. Interactions between oestradiol 3, 17 beta and progesterone on the induction and growth of deciduomata in ovariectomized mice. *Aust J Biol Sci.* 1969;22(3):689-699. doi:10.1071/BI9690689
90. Finn CA, Martin L. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol Reprod.* 1972;7(1):82-86. doi:10.1093/BIOLREPROD/7.1.82
91. Zhou L, Li R, Wang R, Huang H xiong, Zhong K. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1166-1176. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2007.05.064
92. Narvekar S, Gupta N, Shetty N, Kottur A, Srinivas M, Rao K. Does local endometrial injury in the nontransfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF? A randomized controlled pilot study. *J Hum Reprod Sci.* 2010;3(1):15-19. doi:10.4103/0974-1208.63116
93. Ueno J, De Mayrinck Salgado R, Ejzenberg D, et al. Is the length of time between endometrial scratching and embryo transfer important for pregnancy success? An observational study. *Rev Assoc Med Bras.* 2023;69(1):72-77. doi:10.1590/1806-9282.20220690
94. Gnainsky Y, Granot I, Aldo P, et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action. *Reproduction.* 2015;149(1):75-85. doi:10.1530/REP-14-0395

95. Sojka DK, Plougastel-Douglas B, Yang L, et al. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife*. 2014;3(3):1659. doi:10.7554/ELIFE.01659
96. Peng H, Jiang X, Chen Y, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1444-1456. doi:10.1172/JCI66381
97. Lédée-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermine A, Durand-Gasselin I, Frydman R, Chaouat G. A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;81(1):59-65. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.06.007
98. Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Sato S, Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 1999;41(6):413-422. doi:10.1111/J.1600-0897.1999.TB00456.X
99. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J Reprod Immunol*. 2010;87(1-2):60-66. doi:10.1016/J.JRI.2010.07.001
100. Donoghue JF, Paiva P, Teh WT, et al. Endometrial uNK cell counts do not predict successful implantation in an IVF population. *Hum Reprod*. 2019;34(12):2456-2466. doi:10.1093/HUMREP/DEZ194
101. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):429-438. doi:10.1093/HUMUPD/DMT056
102. Lédée N, Petitbarat M, Chevrier L, et al. The Uterine Immune Profile May Help Women With Repeated Unexplained Embryo Implantation Failure After In Vitro Fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):388-401. doi:10.1111/AJI.12483
103. Matteo MG, Greco P, Rosenberg P, et al. Normal percentage of CD56bright natural killer cells in young patients with a history of repeated unexplained implantation failure after in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2007;88(4):990-993. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2007.01.028
104. Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O'Herlihy C, O'Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 2000;43(4):209-217. doi:10.1111/J.8755-8920.2000.430405.X
105. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):429-438. doi:10.1093/HUMUPD/DMT056
106. Du X, Zhu H, Jiao D, et al. Human-Induced CD49a+ NK Cells Promote Fetal Growth. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/FIMMU.2022.821542
107. Hviid TVF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):209-232. doi:10.1093/HUMUPD/DMI048
108. Nilsson LL, Scheike T, Langkilde CH, et al. Examining extended human leukocyte antigen-G and HLA-F haplotypes: the HLA-G UTR-4 haplotype is associated with shorter time to

- pregnancy in an infertility treatment setting when both female and male partners are carriers. *Fertil Steril*. 2020;114(3):628-639. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2020.04.052
109. Meuleman T, Drabbels J, van Lith JMM, et al. Lower frequency of the HLA-G UTR-4 haplotype in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*. 2018;126:46-52. doi:10.1016/J.JRI.2018.02.002
 110. Christiansen OB, Kolte AM, Dahl M, et al. Maternal homozygosity for a 14 base pair insertion in exon 8 of the HLA-G gene and carriage of HLA class II alleles restricting HY immunity predispose to unexplained secondary recurrent miscarriage and low birth weight in children born to these patients. *Hum Immunol*. 2012;73(7):699-705. doi:10.1016/J.HUMIMM.2012.04.014
 111. Papú Chová H, Saxtorph MH, Hallager T, et al. Endometrial HLA-F expression is influenced by genotypes and correlates differently with immune cell infiltration in IVF and recurrent implantation failure patients. doi:10.1093/humrep/deac118
 112. Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. Seminal Fluid Induces Leukocyte Recruitment and Cytokine and Chemokine mRNA Expression in the Human Cervix after Coitus. *The Journal of Immunology*. 2012;188(5):2445-2454. doi:10.4049/JIMMUNOL.1102736
 113. Lashley LELO, van der Westerlaken LAJ, Haasnoot GW, et al. Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure after in vitro fertilization treatment. *Tissue Antigens*. 2014;84(6):536-544. doi:10.1111/TAN.12452
 114. Mcgrath E, Ryan EJ, Lynch L, et al. ORIGINAL ARTICLE: Changes in Endometrial Natural Killer Cell Expression of CD94, CD158a and CD158b are Associated with Infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009;61(4):265-276. doi:10.1111/J.1600-0897.2009.00688.X
 115. Varla-Leftherioti M, Keramitsoglou T, Spyropoulou-Vlachou M, et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report from the reproductive immunology component. *Tissue Antigens*. 2007;69(SUPPL. 1):297-303. doi:10.1111/J.1399-0039.2006.00782.X
 116. Varla-Leftherioti M, Keramitsoglou T, Parapanissiou E, et al. HLA-DQA1*0505 sharing and Killer Immunoglobulin-like Receptors in sub fertile couples: report from the 15th International Histocompatibility Workshop. *Tissue Antigens*. 2010;75(6):668-672. doi:10.1111/J.1399-0039.2010.01451.X