

İMLANTASYON FİZYOLOJİSİ VE İMLANTASYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Koray ELTER - Engin ORAL

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı - İSTANBUL

İmlantasyon genetik olarak birbirinden farklı olan uterus ve embryonun birbirleri ile olan ilişkileridir. İmlantasyon embryonun gelişim aşamalarına ve maternal hücrelerle ilişkisine göre bazı evrelerden oluşur. Bu aşamalar sırasıyla apozisyon, adezyon, invazyon ve maternal damarlara penetrasyondur (1). Apozisyon ve adezyon tüm canlılarda benzer olmakla birlikte invazyonun zamanlaması ve karakteristikleri önemli farklılıklar göstermektedir (1).

İmlantasyon fertilizasyon ile tuba uterinada başlar (Evre I) (1). Hücre bölünmesinin başlaması ve gelişen embryonun tubada ilerlemesi 2. evredir. Morula aşamasına gelmiş embryonun uterusu girilmesi evre 3 olarak değerlendirilir. Bu olaylar kısa bir zaman dilimi içinde olur. İnsanda embryo fertilizasyondan 72-96 saat sonra uterusu girer (2,3). Doğal bir menstrual siklusta foliküler fazda artan östrojenle hazırlanan endometriyumda artan progesteronun etkisiyle sekretuar değişiklikler gözlenir (4). İlk sekretuar değişiklikler siklusun 15-16. günlerinde başlar ve başarılı bir nidasyonun oluşması için gerekli olan uterin reseptivite dönemine kadar sürer (1).

Evre 4 apozisyonudur. Bu dönemin insanda çalışılması ve araştırılması zordur. Hertig ve arkadaşlarının çalışmaları bu dönemin aydınlatılmasına faydalı olmuştur (5). Fertil kadınlarda yapılan luteal faz histerektomileri incelendiğinde 34 olguda embryo gözlemlenmiştir. Bunlardan 19 günlükten küçük olan 8 embryonun tümünün dolaştığını, 21 günlükten büyük olan 26'sından ise tamamının endometriuma yapıştığını gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında apozisyonun 20. siklus gününde veya ovulasyondan 6 gün sonra olduğunu bildirmişlerdir.

Apozisyon aşaması kısa sürer ve hızla evre 5 olan penetrasyon ve invazyona geçilir (6). Blastosisti saran hücrelerin nasıl aniden endometriumu invaze etmeye başladığı tam olarak bilinmemektedir. Hücre adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri ve matriks metalloproteinazlar gibi bazı hücrel moleküller ve ekstrasellüler matriksin rol oynadığı ve bir orkestra gibi invazyonu regüle ettikleri düşünülmektedir.

Hayvan çalışmalarında devamlı progesteron verilmesinden birkaç gün

sonra uterusun blastosiste karşı kısa bir süre için reseptif olduğu gösterilmiştir (7,8). Uterusun blastosiste karşı reseptif olduğu bu döneme implantasyon penceresi denir. Bu reseptif duruma ek olarak uterusun nötral ve saldırgan ('hostile') dönemlerinin de olduğu düşünülmektedir (8). Nötral dönemde embryo uterus içinde yaşayabilmekte, saldırgan dönemde ise aktif olarak yok edilmektedir. Hayvanlarda reseptif dönemin dışında yapılan uterus lavajlarında embriyotoksik ajanlara rastlanmıştır (8,9). Benzer ajanların insanlarda da bulunduğu sanılmaktadır (10).

Hayvan çalışmalarında uterusun embryo gelişimini uyarabildiği veya areste uğratabildiği gösterilmiştir (11-13). Böylece uterusun senkroniyi ve reseptif olduğu dönemde embriyonun blastosist evresinde olmasını sağlayabildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla implantasyon için uterus ile embriyonun uyumu ve senkronisi önemlidir. Senkroni, embryo ve uterusun her ikisinin de implantasyona aynı anda uygun olmalarıdır (8). İmplantasyon penceresi embryo-uterus senkronisinin implantasyona imkan sağlamaya başladığı zaman ile bittiği zaman aralığıdır.

İMLANTASYONUN FİZYOLOJİSİ VE REGÜLASYONU

Steroid hormonlar ve implantasyon

Uzun zamandır östrojenin endometriumdaki östrojen ve progesteron reseptörlerini (ER, PR) artırdığı bilinmektedir (14,15). Progesteron ise luteal fazda ER ve PR'lerini azaltmaktadır (16). PR'lerinin azalması ile uterus-ta reseptivite başlamaktadır (1,17,18). PR'lerinin kaybolmaması implantasyon penceresinin gecikmesine yolaçmakta ve bu eksojen progesteron verilmesiyle düzeltilebilmektedir (19). ER ve PR'lerinin siklusun 20. gününden sonra kaybolmasıyla overin etkisinin azalması, stromanın ve implante olacak embriyonun endometriumda yaptığı değişikliklerin implantasyonda önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Östrojen ve progesteron ile suprese olan bazı gen ekspresyonlarının, reseptörlerdeki azalma ile tekrar eksprese olmaları muhtemel genel bir mekanizma olarak düşünülmektedir (20). Mekanizma ne olursa olsun ER ve PR'lerinin implantasyonun başlamasında kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Pinopodlar

Pinopodlar reseptif dönemde endometriumun apikal yüzeyinde bulunan, endositoz ve pinostozdan sorumlu yapılardır (21-23). Pinopodların yapıları ve görüntüleri progesteron düzeylerine bağlıdır (23). Görevleri tam olarak bilinmemekle beraber bazı makromoleküllerin ve uterus sıvısının temizlenmesi, adezyonu kolaylaştırma gibi fonksiyonlarının olabileceği düşünülmektedir (23). Elektron mikroskobu çalışmalarında düzenli adet gören kadınlardan postovuluar 6. günde alınan endometrium biopsilerinin %78'inde pinopodlara rastlanırken, 2. ve 9. günlerde bu oran %15'tir (23). Bu bulgu pinopodların implantasyon penceresine spesifik olabileceği görüşünü desteklemektedir. Elektron mikroskopisi pratik olmamasına

rağmen bu pinopodların araştırılması infertilite ve habitüel abort mekanizmalarının açıklanmasına faydalı olabilir.

Hücre adezyon molekülleri

İmplantasyona hazırlanan endometrium salgılanmak veya membranda eksprese edilmek üzere bazı glikoproteinler sentezler. İmplantasyon dönemindeki epitelde yüzey negativitesi azalır, PAS+ materyalde artma olur ve glikokaliks yapı daha bir fibriler yapıya dönüşür (24). Sialik asit epiteldeki negatif yükten sorumludur ve non-reseptivite ile ilişkilidir (23). Bu yapıların kaybolmasıyla reseptivite artar. Bunların dışında da implantasyon ile ilgili çok sayıda hücre adezyon molekülleri mevcuttur. Bunlardan önemli olanları musinler, integrinler ve trofinindir

Musinler

Musinler, hücrelerin yüzeylerinde bulunan büyük glikolize moleküllerdir. Apozisyonunda rol oynadıklarına inanılmaktadır (25). MUC-1 çok sayıda epitel hücresinde bulunan ve siklus evrelerine göre ekspresyonu değişen bir musindir (23). Sıçanda, MUC-1 apozisyonun başlangıç günü olan siklusun 4. - 5. gününde kaybolur (23). MUC-1'in implantasyonu engelleyen ve implantasyon için kaybolması gereken bir etken olduğu sanılmaktadır. İnsan da ise peri-implantasyon döneminde MUC-1 ekspresyonu artar (26). MUC-1'in karbonhidrat yapısının değişebileceği ve bunun insan da rol oynayabileceği düşünülmektedir (23). Diğer bir musin olan MAG (Mouse Ascites Golgi) implantasyonun çok erken dönemlerinde endometriumda gözlenir (27). Sadece 18.-19. günlerde endometrium yüzeyindedir (23). Bir çalışmada açıklanamayan infertilitesi olan kadınların %60'ında MAG ekspresyon bozukluklarına rastlanmıştır (23).

İntegrinler

Kadherinler immünglobulin ailesine ait transmembran glikoproteinlerdir (28). Hücre fenotipinin devamlılığı için önemlidirler. İntegrinler hücrenin dokudaki lokalizasyonu, şekil, polarite, steroid hormonlara cevabı gibi özelliklerini belirlerler (29). Fibronektin, kollajen, laminin gibi bazı ekstrasellüler matriks proeinler için reseptör görevi görürler (28). Endometriumda en çok çalışılmış adezyon molekülleri integrinlerdir. Endometriumda ilk saptandıkları günden sonra hem sabit hemde siklik değişen integrinlerin bulunduğu anlaşılmıştır endometriuma özel bir durumdur (5,30-32). Sabit olan 3 integrin aynı zamanda kollajen/laminin reseptörleri olan $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ 'tür (32). Fibronektin reseptörü olan $\alpha_5\beta_1$ endometrium stromasında devamlı bulunan tek integrindir. Diğer stroma integrinleri $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ - siklus içinde değişiklikler gösterirler (5). İmplantasyon döneminde, endometrium epitel hücrelerinde estrojen ve progesteron reseptörleri bulunmamaktadır (33). $\alpha_v\beta_3$ 'ün artmasıyla beraber progesteron reseptörleri kaybolur ve bu integrinin implantasyonda önemli bir rolü olduğu ve reseptivitenin bir belirteci olabileceği görüşünü

desteklemektedir (5). Endometriumda β_3 integrin ekspresyonu tip I defekt denilen klasik luteal faz defektinde ve histolojik gecikmenin olmadığı tip II defektte bozulabilir (5). $\alpha_v\beta_3$ 'ün olmaması ve $\alpha_4\beta_1$ 'in kaybolmasının açıklanamayan infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (34). β_3 'ün farmakolojik ajanlarla kontrolü bilinmemektedir, ancak over supresyonunun ve pelvik endometriozis ablasyonunun $\alpha_v\beta_3$ ekspresyonunu arttırdığı preli-miner çalışmalarda gösterilmiştir (23).

Trofinin/tastin

Trofinin, trofoblast adezyonunda rol oynayan önemli bir membran proteindir (35). Tastin ise trofininin fonksiyonu için gerekli sitoplazmik bir proteindir (35). Her iki protein de insan endometriumunda sadece implantasyon döneminde eksprese olurlar (23). Bu implantasyonda önemli rolleri olduğunu düşündürmekteyse de tam fonksiyonları bilinmemektedir.

Büyüme faktörleri ve sitokinler

Büyüme faktörleri ve sitokinlerin endometriumda östrojen ve progesteronun etkilerini yönettiklerine inanılmaktadır. Bu ailenin üyeleri koloni stimulan faktör (CSF), epidermal growth faktör (EGF), lösemi inhibitör factor (LIF), interlökin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor (TGF), IGF bağlayıcı proteindir (IGFBP). Bunlar apozisyonda rol oynadığı gibi invazyonda da rol oynamaktadır.

EGF

EGF, TGF α , heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF), amfiregulin ve betaselülin EGF ailesinin üyeleridir (29). Bunlar EGF reseptörü üzerinden etki gösterir ve mitozu arttırmaları (29). Sıçanda HB-EGF geni implantasyondan hemen önce blastosisti saran epitelde eksprese olur (36). Ayrıca, HB-EGF blastosist gelişmesini, zona delinmesini ve trofoblast büyümesini uyarır (36). Bu bulgular HB-EGF'in implantaşyonda önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

CSF

CSF, gebelik sırasında sıçan uterusunda 1000 kat artar (37). Konjenital CSF geni olmayan farelerde osteopetroz benzeri bir tablo ve infertilite gelişmektedir (38). Bu farelere eksojen CSF verildiğinde fertilitate düzelmektedir (39). Endometrium epiteli tarafından salgılanan CSF'in trofoektodermdeki reseptörleri üzerinden blastosist apozisyonunu uyardığı sanılmaktadır (29).

LIF

LIF, proliferatif ve diferensiyatif etkileri olan bir glikoproteindir (29). Homozigot LIF geni olmayan sıçanlarda blastosist oluşumu normal olmakta ancak imlantasyon kusuru gelişmektedir (40). LIF'in sitotrofoblastlarda fib-

ronektin sentezini arttırarak ve hCG sentezini azaltarak trofoblastların fenotipini daha yapışkan ve invazif olma yönünde değiştirdiği gösterilmiştir (41,42).

İnterlökin-1

IL-1 ailesi IL-1 α , IL-1 β , IL-1R (3 tane), IL-1ra'dan oluşur (23). İnsanda hem endometriumda hem de embryoda gösterilmişlerdir (23). Sıçanda IL-1ra intraperitoneal verildiğinde imlantasyonu anlamlı olarak azaltmaktadır (43). Ancak, değişik tür sıçanlarda aynı etkinin gözlenmemesi ve IL-1R eksikliği olan sıçanlarda implantasyonun etkilenmemesi interlökinlerin imlantasyonda çok önemli etkileri olmadığını düşündürmektedir (44).

IGF

IGF-I ve IGF-II insüline benzeyen mutajenik büyüme faktörleridir. Bu büyüme faktörlerini bağlayan ve reseptörelere biyoyararlılıklarını etkileyerek fonksiyonlarını etkileyen 6 adet bağlayıcı protein vardır (45). Bunlardan stromada en fazla bulunan ve hem epitel hem de stroma hücreleri tarafından salgılanan IGFBP-1'dir (46). IGFBP-1 düzeyini progesteron regüle eder (47). İnsülin, IGF-I ve IGF-II desidualizasyonu inhibe eder (1). IGFBP-1, IGF'leri bağlayarak onların etkilerini azaltır (48). IGF-II sitotrofoblastlar tarafından da salgılanır ve invazyon yeteneğini arttırır (49). Desidua tarafından salgılanan IGFBP-1'in bu IGF-II'yi bağlayarak invazyona bir sınır oluşturduğu düşünülmektedir (50,51).

Ekstrasellüler matriks (ESM) proteinler

ESM proteinleri olan ve stroma hücreleri tarafından salgılanan laminin ve fibronektin invazyonda önemli rol oynarlar (52,53). Laminin sekretuar fazda üretilir ve implantasyon ve gebelik ile beraber daha da artar (53). Laminin, prolaktin ve IGFBP-1 düzeylerinde azalmaya yolaçar ve trofoblast invazyonunu arttırmada rolü olduğu düşünülmektedir (54). Fibronektinin ise materno-fetal aralıkta invazyonu azaltan ajanlardan biri olduğu sanılmaktadır. Fibronektinde bulunan RGD sekansı (Arg-Gly-Asp) trofoblastlar ile ilişkide önemli rol oynar. Yukarıda da bahsedildiği gibi fibronektin reseptörleri integrinlerdir. Sitotrofoblastların integrinler yoluyla fibronektinde bulunan bu reseptöre bağlanması invazyonu yavaşlatır (55).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve inhibitörleri (TIMP)

MMP'ler ESM proteinlerini parçalayan endopeptidazlardır. Parçaladıkları proteine göre 3 gruba ayrılırlar. Salınımları, steroid hormonlar ve büyüme faktörler ile düzenlenir. MMP'ler inaktif olarak salgılanırlar ve ısı, proteinazlar veya diğer proteazların etkisiyle aktive olurlar (56). Trofoblast invazyonu sırasında kollajen (Tip IV) gibi matrix proteinlerinin yıkımında ve ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında rol oynarlar (57,58). MMP'leri inhibe eden doku inhibitörleri (TIMP, 'tissue inhibitors of metalloproteinases') de implantasyonda rol oynarlar. TIMP'ler desidua ve sitot-

rofoblastlar tarafından salgılanırlar ve bunların 4 tipi vardır (23). İnsan endometriyumunda 1 ve 2 tiplerinin ekspresyonu siklusun fazıyla orantılı olarak değişmezken, tip 3 progesteron ile uyarılır ve implantasyona yakın desidualada bulunur (59). İnvazyonu sınırlamada rolü olduğu düşünülmektedir.

HOXA-10

Homeobox (HOX) genleri embriyonik gelişimde çok önemli olan transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Bunlardan Hoxa genleri Müller kanalının gelişmesinde önemlidir. Özellikle Hoxa-10 uterusda eksprese olur (60). Homozigot olarak bu geni olmayan dişi sıçanlar infertildirler (23). Mutagenез çalışmaları ile patolojinin implantasyon aşamasında olduğu gösterilmiştir (23). Mutantlardan gelişen embriyoların normal dişilere transferi fertilitiyi düzeltmektedir (23). Tüm bunlar Hoxa-10'un implantasyon endometriyumda önemli bir görevi olduğunu desteklemektedir.

Siklooksijenaz - 2 (COX-2)

Siklooksijenaz prostoglandin sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir ve 2 izoformu vardır, COX-1 ve COX-2. Sıçanda COX-2'nin selektif inhibisyonu çok sayıda reproduktif patolojiye yolaçar ve ovulasyon, fertilizasyon, implantasyon ve desidualizasyon bozulur (61). COX-2 eksikliği olan homozigot sıçanlarda implantasyon olmaz (61). Bu sıçanlarda LIF ve amfiregulin ekspresyonlarının normal olması COX-2 'nin bunlardan sonra fonksiyon gösterdiğinin bir işaretidir (61).

Büyük granüler lökositler (LGL)

Lökositler erken gebelikte stromal hücrelerin %30'unu oluştururlar (29). Endometriyumda plazma hücreleri bulunmaz ve B hücrelerine az miktarda sadece stromada rastlanır (29). Ağırlıkla T hücreleri, makrofajlar ve granüle lenfositler mevcuttur (62). Luteal fazda en fazla bulunan lökositler CD56+16- olan büyük granüler lenfositlerdir (63). İmplantasyon döneminde lökositlerin %70-80'ini oluştururlar (64). LGL'ler "natural killer" (NK) aktivitesine sahiptirler (63). Trofoblastlar tarafından eksprese edilen HLA-G MHC molekülleri bunları LGL sitotoksitesinden korur (64). HLA-G 'nin eksprese edilmediği durumlarda sitotrofoblastlar LGL'ler tarafından lizise uğrarlar.

Sonuç olarak tüm bu yukarıda özetlediğimiz bilgiler ışığında implantasyon fazlasıyla kompleks ve zengin bir orkestra gibi yönetilmesi gereken, karmaşık hücresel ve kimyasal olaylar zinciridir. İmplantasyon için endometriyumun hazırlanması ağırlıkla embriyodan bağımsız olmakta ise de son araştırmalarla embriyo ile endometriyum arasında parakrin ve jukstakrin sinyal iletişiminin yoğun olduğu ve bu ikisinin diyalogu ile implantasyonun başarıyla tamamlanabileceği anlaşılmaktadır.

İMLANTASYONU ETKİLEYEN PATOLOJİLER

Bilinmeyen veya gizli reseptivite defektleri

İnfertil çiftlerin %20 ile 37'sinde sebep açıklanamamaktadır (65). Yukarıda da bahsedildiği gibi tip I ve tip II defektler bu olguların bir kısmını açıklayabilir. Tip I defektte implantasyon döneminin başlaması ile beraber eksprese olması gereken $\alpha_v\beta_3$ integrinin eksprese olması gecikir (5). Bu defektte alınana endometrium biopsisinde endometriumda bir maturasyonel gerilik söz konusudur. Tip II defektte ise endometrium histolojik olarak normaldir, ancak $\alpha_v\beta_3$ integrin ekspresyonu yoktur (65). Bu tipe gizli reseptivite defekti de denir. Tip I defekti olan olgulara progesteron verildiğinde düzelme gözlenir (34). Açıklanamayan infertilitesi olan kadınların %26'sında tip I defekte, %39'unda ise tip II defekte rastlanmıştır (65).

Luteal faz defekti (LFD)

Noyes kriterlerine göre değerlendirilen endometriumun histolojik gelişiminin siklus gününe uymamasına denir (66). İnfertilite ile direkt ilişkisi gösterilmemiş olmasına rağmen infertilitesi olan kadınlarda LFD'ne daha sık rastlanmaktadır (67,68). Normal popülasyondaki sıklığı %0-4 iken infertil kadınlarda %6-33'tür (67,68). LFD tedavisi de ampirik sayılabilir. Sadece bir prospektif randomize çalışmada progesteron verilmesiyle normal endometrium histolojisine sahip kadınların arttığı gösterilmiştir (69).

Hidrosalpenks

IVF sikluslarında hidrosalpenksi olan kadınlarda implantasyon oranlarının daha düşük olduğu ve düşüklerin arttığı bildirilmiştir (65). İmplantasyonun %50 azaldığını bildiren metaanalizler vardır (70,71). Mekanizma ile ilgili çeşitli teoriler vardır. Uterusa sızan sıvının embriyotoksik bir ortam oluşturduğu düşünülmektedir (72). Direkt veya indirek olarak endometriumu ve implantasyonu bozduğunu önesürenler de vardır (65). Salpenjektominin implantasyon oranlarını arttırdığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (73,74). Ultrasonda görülebilen hidrosalpenksin zararı yanında görülemeyen hidrosalpenksin de zararlı olduğunu bildiren yazarlar vardır (65). Hidrosalpenksi olan kadınların endometriumunda $\alpha_v\beta_3$ integrinin daha az eksprese edildiği bildirilmiştir (75). Bu kadınların %32'sinde tip I defekte, %29'unda ise tip II defekte rastlanmıştır.

Polikistik over sendromu (PCOS)

PCOS'unda ovulasyon indüksiyonu uygulamalarında ovulasyon oranları ile gebelik oranları arasında beklenenden fazla fark vardır (76). Bu hastalarda düşük oranları da artmıştır (65,77). PCOS olgularında endometrial androjen reseptörlerinin artan östrojen sonucu arttığı ve implantasyon döneminde $\alpha_v\beta_3$ integrinin kaybolduğu bildirilmiştir (65).

Preeklampsi

İnvazyon olmadan önce sitotrofoblastlarda endovasküler invazyona yönelik bazı farklılaşmalar olur. Bu doğrultuda epitel kaynaklı olan bazı adezyon molekülleri (E-kadherin, integrin $\alpha_6\beta_4$) ekspresyonu azalırken endotel hücre fonksiyonu için önemli olanların (VE-kadherin, integrin $\alpha_v\beta_4$, $\alpha_1\beta_1$) ekspresyonu artar (78). Diğer bir deyişle normal gebelikte invazif sitotrofoblastlar endotel hücre reseptör fenotipini gösterirler. Preeklampside, uterusu diferensiyeye olmamış sitotrofoblast kök hücrelerinin bulunduğu ve bu farklılaşmanın olmadığı gösterilmiştir (79). Bu sebepten uygun plasantasyon olamamakta, maternal kan fetusa yeterli miktarda ulaşamamakta ve preeklampsi gelişmektedir.

Endometriosis

Endometriozis reproduktif bozukluğa yolaçabilir ve hemen hemen her aşamada fertilitiyi etkileyebilir (78,79). Endometriozisi olan infertil kadınlardaki ART uygulamalarında implantasyon oranlarının düşük olduğunu bildirilmiştir (78-80). Endometriozisli kadınlardan elde edilen embryolarda gelişme arestine daha sık rastlanmaktadır. Bu embryolardaki bölünmenin daha yavaş olduğu ve 72. saatteki blastomer sayısının daha az olduğu bildirilmiştir (81-83). Embryotoksik ortama ek olarak endometriumdaki intrinsik bir defektten de şüphelenilmektedir. Araştırmalar özellikle integrinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Minimal veya hafif endometriozisi olan kadınlarda integrin $\alpha_v\beta_4$ ekspresyonunda bozukluk bildirilmiştir (84). Bunun yanında embryo kalitesini etkileyerek de implantasyonu bozduğu düşünülmektedir.

Tekrarlayan düşükler

Tekrarlayan düşüklerin genetik, endokrin, anatomik, enfeksiyöz ve otoimmün sebeplerinin yanında %40-50'sinin sebebi açıklanamamaktadır. Wilcox ve arkadaşları infertilite sorunu olmayan 221 kadını takip etmişler ve %25'inde erken düşüğe (6 haftadan önce), %8'inde ise geç düşüğe rastlamışlardır (85). Geç düşük yapanlar ile canlı doğum yapanlar arasında implantasyon günü olarak fark bulamazken (9,1'e karşı 9,2. gün), erken düşük yapanlarda implantasyonun anlamlı olarak geç olduğunu (10,5. gün) gözlemişlerdir (85). Açıklanamayan tekrarlayan düşük olgularında özellikle endometriumdaki immün sistem hücreleri üzerinde durulmuştur. Lachapella ve arkadaşları endometriumdaki CD16+ ve CD16- NK hücrelerinin fertil kontrollerle açıklanamayan tekrarlayan düşükleri olan olgular arasında anlamlı olarak farklı olduğunu bildirmişlerdir (86). Clifford ve arkadaşları da CD56+ hücrelerin arttığını bildirmişlerdir (87).

IVF'TE İMPLANTASYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

İleri anne yaşının fekunditeyi azalttığı eskiden beri bilinmektedir (8). Bu hem doğal sikluslar için hem de ART için geçerlidir (88). Özellikle 40

yaşından sonra çarpıcı şekilde azalmaktadır. Bu ileri yaşlı kadınlarda oosit donasyon ile implantasyon oranlarının beklenen değerlere dönmesi özellikle embryonun bu implantasyonu azaltmada etkin olduğunu göstermektedir (8).

İyi kalite embryo için iyi kalite gametlere ihtiyaç vardır (89). Oosit ve embryo skorlarının herbirinin iyi olmasının implantasyon oranını arttırdığı bildirilmiştir (90). Embryo kalitesinin iyi olması için over stimülasyonunun uygun olması ve uygun kültür ortamlarının sağlanması gerekmektedir. Hardy ve arkadaşları farklı ovulasyon indüksiyonu protokollerinin farklı kalitede embryolar geliştirdiğini göstermişlerdir (91). McKiernan ve arkadaşları ise hayvan modelinde yaptıkları stimülasyon ile elde ettikleri embryoların doğal sıklısta elde ettiklerinden daha düşük kalitede olduğunu bildirmişlerdir (92). Over stimülasyonunun embryo kalitesini etkilediği bilinmektedir (93). İmplant olma ihtimali yüksek embryoların in-vitro geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir. Alternatif bir yol blastosist transferidir. İn-vitro beslenme ortamından belki de eksojen ilaçlarla bozulmuş uterus ortamına erken verilen embryoların bundan etkilenebilecekleri ve geç transfer yapmanın embryodaki nutrisyonel stresi azaltarak implantasyonu arttıracığı düşünülmektedir (94). Bazı kromozomal defektli embryoların blastosist evresine gelememesi ve bunların seleksiyon ile elenmesi de implantasyonu arttırabilecektir. Ayrıca, uterus kontraksiyonlarının da ovum toplamayı takip eden birkaç gün fazla olması implantasyonu azalttığı düşünülen bir etkidir (95). Transferin geciktirilmesi ile embryoların uterus dışına atılmasının önlenebileceği düşünülmektedir. Gerçekten de blastosist transferi ile implantasyon oranlarının arttığı bildirilmiştir (96,97). Ancak, 3. gün embryolarından blastosist gelişme oranının %50 civarında olması gebelik oranlarını aynı oranda arttırmamaktadır (94). Colorado Reproduktif Tıp Merkezi'nde yapılan 301 hastalık bir çalışmada 3. ve 5. gün transferlerinde implantasyon oranlarının sırasıyla %30 ve 50 olduğu bildirilmiştir (96). Gebelik oranları ise sırasıyla %66 ve 71'dir. Kültür ortamlarının daha da iyileştirilmesi ve blastosist elde etme oranlarının artırılması için çalışmalar sürmektedir.

Eksojen gonadotropinler endometriumu da etkileyerek implantasyonu bozabilmektedir. Simon ve arkadaşları aşırı cevap aldığı olgularda implantasyon ve gebelik oranlarının düştüğünü ve bu olgularda step-down protokolüne uygun olarak gonadotropin dozunu azaltığında implantasyon oranlarının arttığını bildirmişlerdir (98,99). Ayrıca, düzenli adet gören kadınlardan postovulatuvar 6. günde alınan endometrium biopsilerinin %78'inde pinopodlara rastlanırken, klomifen sitratla veya gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonu yapılan kadınlarda bu oranın %15 olduğu gözlenmiştir (23). Dolayısıyla, ovulasyon indüksiyonu ilaçlarının endometrium reseptivitesini etkilediği görüşü kabul görmektedir.

Atravmatik bir transfer yapılması çok önemlidir (96). Ultrason kateterin yerleşimini hızlandırmaktadır ve ultrason eşliğinde yapılan transferin gebelik oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (100). Transfer sıvısının içinde hya-

luronan olmasında implantasyon oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (94). Bu konuyla ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir.

Daha önce IVF sonucu implantasyon gelişmiş olgularda implantasyon ihtimali artmaktadır. Speirs ve arkadaşları hiç implantasyonu olmayan çiftlerde implantasyon oranını %7, 2 implantasyonu olanlarda ise %10 olarak bildirmişlerdir (90).

IVF 'te ilk 4 siklusta implantasyon oranları benzer iken 5. siklusta anlamlı bir azalma bildirilmiştir (90).

Sonuç olarak implantasyonu klinik ve moleküler olarak birçok faktör etkileyebilmektedir. IVF'teki implantasyonda embryo ve endometrium esas rolü oynarken transfer tekniği de hız sınırlayıcı faktör olarak rol oynamaktadır. Kaliteli bir embryo ve endometrium için stimülasyon protokolünün ve in vitro koşulların uygun olması gerekmektedir. Halen doğal implantasyon mekanizmasının ve değişik IVF protokollerinin implantasyona etkileri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lessey BA, Lovely LP. Implantation. In: Keel BA, May JV, De Jonge CJ (Ed), Handbook of the assisted reproduction laboratory, 1. baskı. CRC Press, FL, 2000, 33-76.
2. Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. Am J Obstet Gynecol 1978;132:629-34.
3. Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA, Thorneycroft IH, Marshall JR. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. Am J Obstet Gynecol 1985;153:211-7.
4. Brenner RM, West NB. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. Annu Rev Physiol 1975;37:273-302.
5. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castellbauer A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest 1992;90:188-95.
6. Enders AC. Current topic: structural responses of the primate endometrium to implantation. Placenta 1991;12:309-25.
7. Humphrey KW. Induction of implantation of blastocysts transferred to ovariectomized mice. J Endocrinol 1969;44:299-305.
8. Rogers P, Leeton J. Uterine receptivity and embryo transfer. In: Trounson AO, Gardner DK (Ed), Handbook of in vitro fertilization, 2nd Ed., CRC Press, FL, 2000, 499-528.
9. Weitlauf HM. Factors in mouse uterine fluid that inhibit the incorporation of [3H]uridine by blastocysts in vitro. J Reprod Fertil 1978;52:321-5.
10. Psychoyos A, Roche D, Gravanis A. Is cholic acid responsible for embryo-toxicity of the post-receptive uterine environment? Hum Reprod 1989;4:832-4.
11. Sandell M. The evolution of seasonal delayed implantation. Q Rev Biol 1990;65:23-42.
12. Lundkvist O, Nilsson BO. Endometrial ultrastructure in the early uterine res-

- ponse to blastocysts and artificial decidualogenic stimuli in rats. *Cell Tissue Res* 1982;225:355-64.
13. Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil* 1988;84:437-46.
 14. Flickinger GL, Elsner C, Illingworth DV, Muechler EK, Mikhail G. Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of humans and monkeys. *Ann N Y Acad Sci* 1977;286:180-9.
 15. Sanborn BM, Kuo HS, Held B. Estrogen and progesterone binding site concentrations in human endometrium and cervix throughout the menstrual cycle and in tissue from women taking oral contraceptives. *J Steroid Biochem* 1978;9:951-5.
 16. Savouret JF, Chauchereau A, Misrahi M, Lescop P, Mantel A, Bailly A, Milgrom E. The progesterone receptor. Biological effects of progestins and antiprogestins. *Hum Reprod* 1994;9 Suppl 1:7-11.
 17. Geisert RD, Pratt TN, Bazer FW, Mayes JS, Watson GH. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterone receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 1994;6:749-60.
 18. Mead RA, Eroschenko VP. Changes in uterine estrogen and progesterone receptors during delayed implantation and early implantation in the spotted skunk. *Biol Reprod* 1995;53:827-33.
 19. Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO, Korzeniowski P, Sun J, Chwalisz K. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 1996;65:477-83.
 20. Somkuti SG, Yuan L, Fritz MA, Lessey BA. Epidermal growth factor and sex steroids dynamically regulate a marker of endometrial receptivity in Ishikawa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2192-7.
 21. Ferenczy A, Richart RM, Agate FJ Jr, Purkerson ML, Dempsey EW. Scanning electron microscopy of the human endometrial surface epithelium. *Fertil Steril* 1972;23:515-21.
 22. 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;114:319-24.
 23. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999;14 Suppl 2:3-16.
 24. Aplin JD. Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation. *J Reprod Fertil* 1991;92:525-41.
 25. Carson DD, Rohde LH, Surveyor G. Cell surface glycoconjugates as modulators of embryo attachment to uterine epithelial cells. *Int J Biochem* 1994;26:1269-77.
 26. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:337-42.
 27. Kliman HJ, Feinberg RF, Schwartz LB, Feinman MA, Lavi E, Meaddough EL. A mucin-like glycoprotein identified by MAG (mouse ascites Golgi) antibodies. Menstrual cycle-dependent localization in human endometrium. *Am J Pathol* 1995;146:166-81.
 28. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*

- 1990;4:2868-80.
29. Giudice LC. Implantation and endometrial function. In: Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF III, Van Steirteghem A (Ed), *Molecular biology in reproductive medicine*, 1.baskı. The Parthenon Publishing Group, Lancs., 1999,333-52.
 30. Tabibzadeh S, Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992;7:1214-21.
 31. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994;62:497-506.
 32. 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;35:195-204.
 33. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:334-40.
 34. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995;63:535-42.
 35. Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, Klier G, Mikami M, Aoki D, Nozawa S. Trophoblast and tasin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995;9:1199-210.
 36. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994;120:1071-83.
 37. Pollard JW. Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. *J Reprod Fertil* 1990;88:721-31.
 38. Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley ER. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* 1991;148:273-83.
 39. Wiktor-Jedrzejczak W, Urbanowska E, Aukerman SL, Pollard JW, Stanley ER, Ralph P, Ansari AA, Sell KW, Szperl M. Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic op/op mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor. *Exp Hematol* 1991;19:1049-54.
 40. Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1994;39:233-8.
 41. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:801-6.
 42. Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:225-30.
 43. Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994;134:521-8.

44. Abbondanzo SJ, Cullinan EB, McIntyre K, Labow MA, Stewart CL. Reproduction in mice lacking a functional type 1 IL-1 receptor. *Endocrinology* 1996;137:3598-601.
45. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
46. Bell SC, Patel SR, Jackson JA, Waites GT. Major secretory protein of human decidualized endometrium in pregnancy is an insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol* 1988;118:317-28.
47. Bell SC, Jackson JA, Ashmore J, Zhu HH, Tseng L. Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 synthesis and secretion by progestin and relaxin in long term cultures of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1014-24.
48. Irwin JC, de las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. *Regul Pept* 1993;48:165-77.
49. Giudice LC. Multifaceted roles for IGFBP-1 in human endometrium during implantation and pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1997;828:146-56.
50. Zhou J, Bondy C. Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology* 1992;131:1230-40.
51. Han VK, Bassett N, Walton J, Challis JR. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2680-93.
52. Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1991;129:2385-92.
53. Zhu HH, Huang JR, Mazela J, Elias J, Tseng L. Progestin stimulates the biosynthesis of fibronectin and accumulation of fibronectin mRNA in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 1992;7:141-6.
54. Brar AK, Frank GR, Richards RG, Meyer AJ, Kessler CA, Cedars MI, Klein DJ, Handwerger S. Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Cell Physiol* 1995;163:30-7.
55. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994;120:3657-66.
56. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.
57. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
58. Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* 1990;36:131-53.
59. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development* 1995;121:1005-14.
60. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997;57:1338-45.

61. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91:197-208.
62. Bulmer JN, Sunderland CA. Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology* 1984;52:349-57.
63. Johnson PM, Christmas SE, Vince GS. Immunological aspects of implantation and implantation failure. *Hum Reprod* 1999;14 Suppl 2:26-36.
64. Ghazeeri GS, Clark DA, Kutteh WH. Immunologic factors in implantation. *Infert Reprod Med Clin North Am* 2001, 12:315-37.
65. Castelbaum AJ, Lessey BA. Infertility and implantation defects. *Infert Reprod Med Clin North Am* 2001;12:427-46.
66. Noyes RW, Hertig AI, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;1:3-25.
67. Davidson BJ, Thrasher TV, Seraj IM. An analysis of endometrial biopsies performed for infertility. *Fertil Steril* 1987;48:770-4.
68. Li TC, Dockery P, Cooke ID. Endometrial development in the luteal phase of women with various types of infertility: comparison with women of normal fertility. *Hum Reprod* 1991;6:325-30.
69. Balasch J, Vanrell JA, Marquez M, Burzaco I, Gonzalez-Merlo J. Dehydrogesterone versus vaginal progesterone in the treatment of the endometrial luteal phase deficiency. *Fertil Steril* 1982;37:751-4.
70. Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL. Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:492-9.
71. Camus E, Poncelet C, Goffinet F, Wainer B, Merlet F, Nisand I, Philippe HJ. Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod* 1999;14:1243-9.
72. Beyler SA, James KP, Fritz MA, Meyer WR. Hydrosalpingeal fluid inhibits in-vitro embryonic development in a murine model. *Hum Reprod* 1997;12:2724-8.
73. Andersen AN, Lindhard A, Loft A, Ziebe S, Andersen CY. The infertile patient with hydrosalpinges-IVF with or without salpingectomy? *Hum Reprod* 1996;11:2081-4.
74. Murray DL, Sagoskin AW, Widra EA, Levy MJ. The adverse effect of hydrosalpinges on in vitro fertilization pregnancy rates and the benefit of surgical correction. *Fertil Steril* 1998;69:41-5.
75. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, Lessey BA. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997;12:1393-8.
76. Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1995;10:1962-7.
77. Tulppala M, Stenman UH, Cacciatori B, Ylikorkala O. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:348-52.
78. Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohi J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994;9:725-9.

79. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1996;65:603-7.
80. Yovich JL, Matson PL, Richardson PA, Hilliard C. Hormonal profiles and embryo quality in women with severe endometriosis treated by in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1988;50:308-13.
81. Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA, Frank JB, Worilow KC. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:106-12.
82. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 2:91-7.
83. Tanbo T, Omland A, Dale PO, Abyholm T. In vitro fertilization/embryo transfer in unexplained infertility and minimal peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:539-43.
84. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:643-9.
85. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-9.
86. Láchapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996;156:4027-34.
87. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999;14:2727-30.
88. Yaron Y, Botchan A, Amit A, Kogosowski A, Yovel I, Lessing JB. Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effect of ovarian function. *Fertil Steril* 1993;60:314-8.
89. Gardner DK, Schoolcraft WB. Human embryo viability: what determines developmental potential, and can it be assessed? *J Assist Reprod Genet* 1998;15:455-8.
90. Speirs AL, Baker HW, Abdullh N. Analysis of factors affecting embryo implantation. *Hum Reprod* 1996;11 Suppl 1:187-91.
91. Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, Wicks R, Franks S, Winston RM. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1995;10:2125-35.
92. McKiernan SH, Bavister BD. Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos. *Hum Reprod* 1998;13:724-9.
93. Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fertil* 1992;95:119-27.
94. Gardner DK. Improving implantation rates in in vitro fertilization. *Infert Reprod Med Clin North Am* 2001;12:403-26.
95. Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD. Uterine junctional zone contractions during assisted reproduction cycles. *Hum Reprod Update* 1998;4:440-5.
96. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A pros-

- pective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:3434-40.
97. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-8.
98. Simon C, Cano F, Valbuena D, Remohi J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432-7.
99. Simon C, Garcia Velasco JJ, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril* 1998;70:234-9.
100. Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martinez F, Belil I, Hereter L, Barri PN. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000;15:616-20.