

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

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTALARININ
ENDOMETRİYAL MİKROBİYOTA SONUÇLARI İLE FERTİL
HASTALARIN ENDOMETRİYAL MİKROBİYOTA
SONUÇLARININ 16S rRNA *SEQUENCING* YÖNTEMİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Gonca ÖZTEN

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2019

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

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTALARININ
ENDOMETRİYAL MİKROBİYOTA SONUÇLARI İLE FERTİL
HASTALARIN ENDOMETRİYAL MİKROBİYOTA
SONUÇLARININ 16S rRNA *SEQUENCING* YÖNTEMİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Gonca ÖZTEN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gürkan BOZDAĞ

ANKARA

2019

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Gürkan Bozdağ' a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği olan başta Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. G. Serdar Günalp olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca doğumhane, poliklinik, ameliyathane, servisler, perinatoloji ve tüp bebek ünitelerinde birlikte çalıştığım tüm asistan, hemşire ve sağlık personeli arkadaşlarıma tek tek teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasındaki katkıları ve laboratuvar ve analiz aşamalarındaki desteğinden dolayı Dr. Öğretim Üyesi Çağman Tan'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Dicle Orhan'a ve finansal desteğinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Yetişmemde ve bugünlere gelmemde büyük emeği ve desteği olan sevgili annem ve babam Nilgün ve Ekrem Özten'e teşekkür ediyorum.

Tezimin her aşamasında desteğini hissettiğim ve yardımını hiç bir zaman esirgemeyen nişanlım İsmail Gökhan Dere'ye teşekkür ediyorum.

ÖZET

Özten G., Açıklanamayan İnfertilite Hastalarının Endometriyal Mikrobiyota Sonuçları ile Fertil Hastaların Endometriyal Mikrobiyota Sonuçlarının 16s rRNA Sequencing Yöntemi ile Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi, Ankara 2019.

Açıklanamayan infertilite etiyojisi günümüzde bilinmemekle beraber mevcut klinik tanı yöntemlerinin değerlendiremediği konsepsiyon ve implantasyon basamaklarındaki problemlerin neden olabileceği düşünülmektedir. Mikrobiyota, bir habitatta bulunan tüm mikroorganizmalar anlamına gelmektedir ve yakın zamanda eskiden steril kabul edilen endometriyumun bile bir bakteriyel profil içerdiği bulunmuştur. Mikrobiyotada meydana gelen beklenmeyen değişiklikler disbiyozis olarak adlandırılmış ve çeşitli hastalıklar ile ilişkisi saptandığından endometriyal disbiyozisin fekundabilite üzerinde de kritik bir role sahip olabileceği öne sürülmüştür. Biz de çalışmamızda açıklanamayan infertilite hastaları ile fertil hastaların endometriyal mikrobiyota profillerini değerlendirmeyi amaçladık. Bu doğrultuda açıklanamayan infertilite tanısı almış 15 hasta ve son iki yıl içerisinde canlı doğum yapması nedeni ile fertil kabul edilen 15 hastadan yapılan endometriyal örneklemeler 16s rRNA sequencing yöntemi ile analiz edilmiş ve her iki grupta da örneklerin büyük çoğunluğunda *Lactobasillus* hakimiyeti olduğu gözlenmiştir. Endometriyal mikrobiyotalardaki median *Lactobasillus* yüzdeleri arasında fertil ve infertil hastalar için istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p= 0.9$). Steril endometriyum paradigmasının terkedilmesi gerektiği bir kez daha bu sonuçlarla desteklenmektedir. Endometriyal mikrobiyota profillerinin nedenine ve olası etkilerine yönelik yüksek örneklem grubu içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, açıklanamayan infertilite, endometriyal mikrobiyota

Destekleyen Kuruluşlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

ABSTRACT

Özten G., Comparison of Endometrial Microbiota Results between Patients with Unexplained Infertility and Fertile Patients through 16s rRNA Sequencing Method, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Dissertation, Ankara 2019. Although the etiology of unexplained infertility remains unclear, inherent problems in conception and implantation process that cannot be identified with current clinical diagnostic methods might be considered as possible causes. The microbiota refers to the whole community of microorganisms inhabiting in a particular environment. Recent studies showed that even endometrium, formerly considered sterile, contains a bacterial profile. Dysbiosis is defined as the presence of altered microbiota and several diseases are found to be associated with this entity. The aim of this study was to investigate whether endometrial microbiota profiles among patients with unexplained infertility and fertile patients presents any diversity. In this context, a total of 15 patients with unexplained infertility and 15 patients who had a live birth in the last two years with proven fertility were recruited. Endometrial samples were collected and analysed through 16s rRNA sequencing method. As a result, lactobacillus represented the majority of the bacterium in both groups. The median percentage of the endometrial Lactobacillus between infertile patients and fertile patients was not statistically significant ($p= 0.9$). Those results once again suggest that the sterile uterus paradigm should be totally abandoned. Further studies with larger sample size are needed to characterize the endometrial microbiota and its impact on reproduction.

Keywords: Microbiota, unexplained infertility, endometrial microbiota

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.2 İnfertilite nedenleri	3
2.3 İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi.....	6
2.3.1 Öykü ve Fizik muayene.....	6
2.3.2 Tanısal Testler.....	7
2.4 Açıklanamayan İnfertilite	12
2.4.1 Açıklanamayan İnfertilitede Tedavi Yöntemleri	14
2.5 Mikrobiyota.....	15
2.5.1 Mikrobiyota Analizi	16
2.6 Ürogenital Mikrobiyota	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hasta Seçimi.....	21
3.2 Endometriyum Örneklerinin Toplanması	22
3.3 Endometriyum Örneklerinin DNA Ekstraksiyonu	22
3.4. 16s rRNA Sekanslama ile Metagenom Tayini	24
3.5 İstatistiksel Analiz	27
3.6. Etik Kurul Onayı	27
4. SONUÇLAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ	41
7. KAYNAKLAR.....	42

KISALTMALAR

AFS	:	Antral Folikül Sayımı
AMH	:	Anti Mülleriyan Hormon
ASRM:		American Society of Reproductive Medicine
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
ERA	:	Endometriyal Reseptivite Analizi
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	:	Gonadotropin Sekrete Edici Faktör
HGP	:	İnsan Genom Projesi
HMP	:	İnsan Mikrobiyom Projesi
HSG	:	Histerosalpingografi
IUI	:	İntrauterin İnseminasyon
IVF	:	İn Vitro Fertilizasyon
L	:	<i>Lactobasillus</i>
LH	:	Luteinizan Hormon
OS	:	Ovaryan Stimülasyon
OTU	:	Operasyonel Taksonomik Ünite
rRNA	:	ribozomal Ribonükleik Asit
VKİ	:	Vücut Kitle İndeksi
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Endometriyal örneklerde saptanan bakteri <i>cinslerinin</i> OTU dağılımı	29
Şekil 4.2. Endometriyal örneklerde saptanan bakteri <i>türlerinin</i> OTU dağılımı	29
Şekil 4.3. NLD grubunda olan hastaların endometriyal örneklerinin bakteriyel dağılımı	31
Şekil 4.4. Bakteri cinslerine göre Bray- Curtis beta çeşitlilik koordinatlar analizi	32
Şekil 4.5. Bakteri türlerine göre Bray- Curtis beta çeşitlilik koordinatlar analizi	33
Şekil 4.6. Bakteri cinslerine göre Shannon Çeşitlilik Analizi	33
Şekil 4.7. Bakteri cinslerine göre Chao 1 indeksi	34

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri	4
Tablo 2.2. Sık görülen erkek infertilitesi nedenleri	5
Tablo 2.3. WHO Anovulasyon Sınıflaması	9
Tablo 3.1. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon koşulları	24
Tablo 3.2. Barkodlama için kullanılan karışım bileşenleri	26
Tablo 3.3. qPZR programı	26
Tablo 4.1. Gruplara ait demografik özellikler	28

1.GİRİŞ

Açıklanamayan infertilite tüm infertilite nedenlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (1). Temel infertilite değerlendirmesi sonucunda saptanabilen bir patoloji olmaması ile tanı koyulmakta olup aslında bir dışlama tanısı olarak tanımlanabilir. Etiyolojisinde günümüzdeki tanı testleri ile saptanması güç olan nedenlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Mikrobiyota bir habitatta bulunan mikroorganizmaların bütünü ifade eder. Günümüzde yeni nesil moleküler tanı yöntemleri ile kültürde üretilmeyen mikroorganizmaların varlığı kanıtlanmış, farklı vücut bölgelerinde farklı miktar ve çeşitte bakterilerin kolonize oldukları anlaşılmıştır. İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) ile değerlendirilen 7 vücut bölgesinden biri de vajendir (2). Vajinal mikrobiyota profilinin hastaların yaş, vücut kitle indeksi (VKİ), etnik köken gibi çeşitli faktörler ile değiştiği fark edilmiş, bu durumun nedenleri araştırılmaya başlanmıştır (3). Yapılan çalışmalarda reproduktif yolun mikroorganizmalara en çok maruz kalan bölgesindeki mikrobiyota profilinin reproduktif sistem üzerine olası etkileri değerlendirilmiştir. Hatta probiyotikler ile vajinal mikrobiyota profilinin değiştirilebileceği gösterilmiş ve bu durum mikrobiyota profilini düzenleyerek olası tedaviler açısından yeni çalışmalara yol açmıştır (4).

Sağlıklı bir implantasyon için endometriyumun önemi bilinmektedir. Endometriyal reseptivite testlerinin güç kazanması ile reseptiviteyi etkileyen nedenler gündeme gelmiştir. Vajinal mikrobiyotanın tanımlanıp infertilite üzerine olası etkilerinin araştırılmasından sonra endometriyal mikrobiyota çalışmaları başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda endometriyumun bir mikrobiyal profile sahip olduğu belirlenmiş, uterusun sterilitesi hakkında soru işaretleri oluşmuştur (5).

Günümüzde endometriyal mikrobiyota profili ve etkileyen faktörler geniş çaplı çalışmalar ile kanıtlanmış olmasa da, bu profilin jinekolojik hastalıklar, jinekolojik kanserler, obstetrik sonuçlar ve infertilite ile ilişkileri araştırılmaktadır. Yapılan çalışmaların bir bölümünde endometriyal mikrobiyotanın infertilite tanısı almış, implantasyon başarısızlığı olan, tekrarlayan gebelik kayıpları yaşayan hastalarda değişiklik gösterebildiği saptanmıştır (6, 7).

Biz de çalışmamızda açıklanamayan infertilite tanısı almış hastalar ile sağlıklı, fertil bir kontrol grubu oluşturarak gruplar arası endometriyal mikrobiyota profilleri arasında farklılıklar olup olmadığını karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

İnfertilite psikolojik, ekonomik, demografik ve medikal etkileri olan bir sağlık durumu olup Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmaktadır. Dünya üzerinde yaklaşık 48.5 milyon çifti etkilemektedir (8). İnfertilite bir çiftin, 35 yaş altı kadınlarda 12 ay veya daha uzun süre; 35 yaş üzeri kadınlarda ise altı ay veya daha uzun süre korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır (9).

Fekundabilite bir menstrüel siklusta gebelik elde edebilme, fekundite ise bir menstrüel siklusta canlı doğuma ulaşma olasılığıdır (10). Düzenli ilişkiye giren fertil bir çiftin siklus başına fekundabilitesi yaklaşık %20-25'tir (11). Çiftlerin %85-90'ı çoğunluğu ilk altı ayda olmak üzere bir yıl içerisinde gebelik elde edebilmektedir (12). 30-44 yaş arası kadınların dahil edildiği bir prekonsepsiyonel kohort çalışmasında fekundabilitenin 34 yaşından itibaren azalmaya başladığı görülmüştür (13). Yaşa bağlı azalmanın foliküler havuzla ilişkili olduğu düşünülmektedir çünkü oosit kalitesinde de yaş ile azalma olduğu kabul edilmektedir (14). Kadın fertilitesi 20-24 yaşlar arası en yüksek oranda olup, 30-32 yaşlarına doğru göreceli bir azalma izlenirken bu yaşlardan sonra fertilitede hızlı bir azalma görülmektedir (15).

Her ne kadar konsepsiyon ihtimalinin aylar süresince göreceli olarak stabil olduğu düşünülse de, genellikle ilk aylarda daha yüksek olduğu kabul edilmektedir (16). Aylık fekundabilite ilk üç ayda en yüksektir (16). Yapılan bir çalışmada 1946-1956 yılları arasında korunmasız beraberlik yaşayıp gebe kalan kadınların konsepsiyona ulaşma ayları incelenmiştir. Hastaların yüzde 85'inin 12 ay içerisinde gebe kaldığı gözlemlenmiştir. İlk üç ay içerisinde fekundabilite %25'lerde iken sonraki dokuz ay içerisinde %15'lere kadar gerilediği görülmüştür (17).

2.2 İnfertilite nedenleri

İnfertilite nedenlerinin erkek veya kadın faktör olarak kesin bir ayrımı yapılamamakla beraber, tüm infertilite vakalarının %20'sini ovaryan disfonksiyon, %20'sini tubal ve pelvik patolojiler, %30'unu erkek faktör ve geriye kalan %30'unu ise bu faktörlerin kombinasyonlarının oluşturduğu kabul edilmektedir (18). Sık görülen kadın ve erkek infertilitesi nedenleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri (19).

Ovulatuvar Bozukluklar	Polikistik over sendromu Hiperprolaktinemi Hipotalamik hipogonadizm Prematür ovaryan yetmezlik Hipotiroidizm Konjenital adrenal hiperplazi
Tubal Patolojiler	Tubal tıkanıklık Endometriyozis Pelvik adezyon
Uterin Patolojiler	Myom Endometriyal polip Mülleryan anomali Servikal stenoz İntrauterin sineşi
Oosit Kalitesi	Yaşa bağlı anöploidi

Tablo 2.2. Sık görülen erkek infertilitesi nedenleri (20).

Hipotalamo-hipofizer bozukluklar	<p>İdiyopatik izole gonadotropin eksikliği</p> <p>Kallmann sendromu</p> <p>Tek gen mutasyonları</p> <p>Hipotalamus ve hipofiz tümörleri (kraniyofarengiyom, makroadenom)</p> <p>İnfiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiyositoz, hemokromatozis)</p> <p>Hiperprolaktinemi</p> <p>İlaçlar (androjenler, östrojenler, glukokortikoidler)</p> <p>Kronik sistemik hastalıklar, malnütrisyon</p> <p>Enfeksiyonlar (örneğin; menenjit)</p> <p>Obezite</p>
Primer gonadal bozukluklar	<p>Klinefelter sendromu</p> <p>Y kromozom delesyonları</p> <p>Tek gen mutasyonları ve polimorfizmler</p> <p>Kriptorşidizm</p> <p>Varikosel</p> <p>Enfeksiyonlar (örneğin; viral orşit, tüberküloz)</p> <p>İlaçlar (örneğin; alkileyici ajanlar, alkol, antiandrojenler, simetidin)</p> <p>Radyasyon</p> <p>Çevresel gonadotoksinler (örneğin; ısı, sigara kullanımı, metaller, organik çözücüler, böcek ilaçları)</p> <p>Kronik hastalıklar (renal yetmezlik, siroz, kanser, orak hücreli anemi, amiloidoz, vaskülit, çölyak hastalığı)</p>
Sperm transport bozuklukları	<p>Epididim obstrüksiyonu veya işlev bozukluğu</p> <p>Konjenital vas deferens yokluğu</p> <p>Enfeksiyonlar (örneğin; gonore, klamidy, tüberküloz)</p> <p>Vazektomi</p> <p>Kartagener sendromu (primer siliyer diskinezi)</p> <p>Young sendromu</p> <p>Ejekülatuar disfonksiyon (otonom disfonksiyon)</p>

2.3 İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde en önemli nokta infertilitenin tek bir nedeni olmayabileceğinin göz önünde bulundurulması ve değerlendirmenin buna göre yapılmasıdır. Çiftin bir bütün olarak değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (21).

2.3.1 Öykü ve Fizik muayene

İnfertilite öyküsü alınırken önemli noktalar:

- İnfertilite süresi ve daha önceki değerlendirme veya tedavinin sonuçları,
- Ovulatuvar disfonksiyon değerlendirilmesi açısından menstrüel hikaye (siklus uzunluğu, karakteri),
- İnfertilite ile ilişkili olabilecek medikal, cerrahi ve jinekolojik öykü (cinsel yolla bulaşan hastalıklar, pelvik inflamatuvar hastalıklar, anormal pap testi, tiroid hastalığı bulguları, galaktore, hirsutizm, pelvik ağrı, dismenore, disparoni, kemoradyoterapi öyküsü)
- Obstetrik öykü,
- Seksüel öykü, seksüel disfonksiyon varlığı ve ilişki sıklığı,
- Ailede infertilite öyküsü, doğum defekti, genetik mutasyon, mental retardasyon varlığı,
- Yaşam tarzı özellikleri, egzersiz, diyet, stres varlığı ile sigara ve alkol kullanımı sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede infertiliteye neden olabilecek durumlar değerlendirilmelidir.

- VKİ hesaplanmalıdır. Yüksek VKİ azalmış fertilitate ve insülin direnci ile ilişkilidir.
- Sekonder seks karakterlerinin inkomplet gelişimi hipogonadotropik hipogonadizmin bulgusu olabilir.
- Guatr, galaktore veya androjen fazlalığı bulguları (hirsutizm, akne, virilizasyon, erkekte saç dökülmesi) endokrinopati göstergesi olabilir.
- Pelvik muayenede hassasiyet veya ele gelen kitle kronik pelvik inflamatuvar hastalığın veya endometriozisin bir bulgusu olabilir. Douglasta, uterosakral ligamentte, rektovajinal septumda palpasyonla hassas nodüllerin varlığı endometriozis bulguları olabilir.

- Servikal, vajinal yapısal anomalilerin varlığı mülleriyan anomalilerin bulgusu olabilir.
- Uterin boyut artışı, irregülarite, mobilizasyonun kaybı, myom, adenomyozis veya pelvik adezyonlar gibi uterin anomalilerin bulgusu olabilir.

2.3.2 Tanısal Testler

Temel infertilite değerlendirilmesi için önerilen testler:

- Erkek infertilitesini saptamak için semen analizi
- Normal ovulatuvar fonksiyonun tespiti
- Uterin oklüzyonun dışlanması ve tubal patensin belirlenmesi için histerosalpingografi (HSG) veya histerokonstrastsonografi yapılması
- Ovaryan rezervin belirlenmesi için antral folikül sayımı (AFS) veya anti-mülleryan hormon (AMH) ölçümü

Semen Analizi: Semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde en önemli parametredir. Standart semen analizi; semen volümü ve pH ölçümü, aglütinasyonun değerlendirilmesi, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinin değerlendirilmesi, sperm lökosit sayısının ve immatür germ hücrelerin değerlendirilmesini içerir. Semen analizi 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası verilmelidir (22). Standart semen analizinin değerlendirilmesinde WHO 2010 sınıflamasına göre en düşük sınır değerler aşağıda gösterilmiştir (22):

- Volüm: 1.5 ml
- Sperm konsantrasyonu: 15 milyon spermatozoa/ml
- Total sperm sayısı: 39 milyon spermatozoa/ejakülat
- İleri hareketli sperm oranı: %32
- Total hareketli sperm oranı: %40
- Morfoloji: %4 normal

Azoospermi ve oligozoospermi ile birlikte düşük semen volümü genital trakt obstrüksiyonunu gösterir. Sperm hareketliliği mikroskopik olarak değerlendirilir ve progresif hareketli, nonprogresif hareketli, ve hareketsiz olarak sınıflandırılır. Spermatozoaların en az %40'ı hareketli olmalı ve en az %32'si progresif hareketli olmalıdır.

Semen anormalliklerinin tanımları:

- Aspermi: Ejakülatın olmaması
- Hematospermi: Ejakülatta kan olması
- Lökositospermi: Ejakülatta beyaz küre olması
- Hipospermi: Ejakülat volümünün <1 ml olması
- Hiperspermi: Ejakülat volümü >6 ml.
- Azoospermi: Ejakülatta sperm olmaması
- Oligozoospermi: <15 x 10⁶ sperm /ml olması
- Polizoospermi: >250 x 10⁶ sperm /ml olması
- Asthenozoospermi: Zayıf motilite ve/veya ileri doğru hareketlilik olması.
- Teratozoospermi: Normal şekilli sperm yüzdesinin azalmış olması (<% 14 Kruger)
- Nekrozoospermi: Supravital boyama ile tüm spermilerin ölü olması
- Globozoospermi: Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olması şeklinde tanımlanmaktadır.

Ovulatuvar fonksiyon: 28 günde bir düzenli adet gören kadınlar ovulatuvar olarak kabul edilir ve ek test ihtiyacı yoktur. Menstrüel düzensizlik tarifleyen hastalar için laboratuvar testleri önerilmektedir. Bu testlerden en sık kullanılanı mid-luteal dönemde progesteron seviyesinin ölçümüdür. Genellikle beklenen menstrüasyondan bir hafta önce progesteron düzeyinin bakılması önerilmektedir. 3 ng/dl üzeri saptanan progesteron düzeyi ovulasyonun gerçekleştiğini gösterir (23). Diğer bir yöntem üriner luteinizan hormon (LH) monitorizasyonudur ve bu yöntem de ovulasyonu başarı ile değerlendirmektedir. Mevut idrar kitleri yardımı ile yapılabilen olup pozitif olması durumunda ovulasyonun LH pikinden sonraki 48 saat içerisinde gerçekleştiği bilinmektedir (24). Yine ultrasonografide dominant folikül takibi ve ovulasyon sonrası folikülün kaybolduğunun gözlenmesi de bir diğer yöntemdir (25). Bazal vücut ısısı ölçümü standardizasyonu olmaması nedeni ile günümüzde aktif olarak kullanılmamaktadır. WHO anovulasyon sınıflaması Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. WHO Anovulasyon Klasifikasyonu.

<p>WHO grup 1: Hipogonadotropik hipogonadal anovulasyon (hipotalamik amenore)</p> <p>Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'un hipotalamik sekresyonunda azalma veya hipofizin GnRH'ya yanıtınlığına bağılı olarak bu kadınlarda düşük veya düşük-normal serum folikül stimüle edici hormon (FSH) konsantrasyonu ve düşük serum östradiol konsantrasyonu mevcuttur. En az görülen gruptur ve anovulatuvar kadınlara %5-10'unda görülür.</p>
<p>WHO grup 2: Normogonadotropik normoöstrojenik anovulasyon</p> <p>Bu kadınlar normal miktarda gonadotropin ve östrojen sekrete edebilirler. Bununla birlikte siklusun foliküler fazı sırasında FSH sekresyonu subnormaldir. Bu grup polikistik over sendromlu kadınları da içerir. Çoğu hastada oligomenore olur. En sık görülen gruptur ve vakaların %70-85'i bu gruba girer.</p>
<p>WHO grup 3: Hipergonadotropik hipoöstrojenik anovulasyon</p> <p>Primer nedenler prematür over yetmezliğı ve ovaryan rezistansdır. Vakaların %10-30'u bu gruba girer.</p>
<p>Hiperprolaktinematik anovulasyon</p> <p>Hiperprolaktinemi gonadotropin salınımı inhibe etmektedir. Hastalar regüler anovulatuvar siklulara sahip olabilirler, ancak çoğu oligomenoreik veya amenoreiktir. Serum gonadotropin konsantrasyonları genellikle normaldir.</p>

Ovaryan rezervin değerlendirilmesi: Overlerdeki oosit sayısı intrauterin 20. haftada maksimum seviyededir. Doğumda 1-2 milyon, pubertede ortalama 400.000, otuzlu yaşların ortasında 25.000'e düşer (26). Granüloza hücreleri ile çevrili primer oositin meydana gelen ovaryan folikül, overin fonksiyonel ünitesidir. Primordiyal folikül primer oositi çevreleyen tek sıra düz granüloza hücrelerinden oluşur. Ara folikül primer oositi çevreleyen bazıları düz bazıları küboidal granüloza hücrelerinden oluşur. Primer folikül ise primer oositi çevreleyen küboidal granüloza hücrelerinden oluşur (27). Bu üç folikül tipi overin dinlenmekte olan folikül havuzunu oluşturur. Havuzdaki foliküller sırayla preantral, erken antral, antral ve Graffian folikül evrelerine gelirler. Bu süreçte foliküllerden çok azı ovulasyona giderken büyük

bölümü atreziye uğrar (26). Yaşla beraber geride kalan foliküllerin hem sayı hem de kalitesinde azalma olur (28).

Azalmış ovaryan rezerv, reproduktivite potansiyelini belirleme açısından önem taşımaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda aynı yaştaki hastaların farklı ovaryan rezerv değerlerine sahip olduğu görülmektedir (25). Ovaryan rezerv testlerinin birbirine üstünlüğü konusunda bir konsensüs bulunmamaktadır. Bununla beraber klomifen sitrat testi gibi provokatif testler günümüzde kullanılmamaktadır (29).

Günümüzde en çok bazal FSH seviyesi, AFS ve AMH kullanılmaktadır.

- Erken foliküler fazda (siklusun 2-4. günleri) bakılan FSH değerinin $>10-11$ mIU/mL olması azalmış over rezervini işaret eder (30). Bununla beraber özellikle 40 yaş altındaki hastalarda gebeliği ön görmeye düşük duyarlılığa sahip olması nedeni ile başarısız bulunmaktadır (31). Bazal FSH değerine ek olarak östradiol seviyesinin değerlendirilmesi ek bilgi sağlar. FSH normal olan hastalarda östradiol seviyesinin yüksek olması ($>60-80$ pg/mL) ileri erken foliküler gelişimi gösterir. Azalmış over rezervinde FSH baskılanması sonucu normal görünür (18).
- Antral folikül sayımı; erken foliküler fazda 2-10 mm foliküllerin ultrasonografi ile sayımıdır, hem gözlemciler arası hem de sikluslar arası değişiklik gösterebilmektedir (32). AMH; over rezervini göstermede bulunan en yeni belirteçtir. Geç preantral ve küçük antral foliküllerin granüloza hücrelerinden salgınır. Overin folikül havuzunun göstergesidir ve siklus ile değişkenliği minimaldir (32). Yapılan meta-analizlerde AMH ve AFS'nin benzer prediktif değerlere sahip olduğu belirtilmiştir (32, 33). Azalmış ovaryan rezerv tanımı için genel bir konsensüs olmasa da $AFS < 5-7$ ve $AMH < 0,5- 1.1$ ng/ml düşük ovaryan rezerv olarak kabul edilir (34).

Tubal patensin değerlendirilmesi: HSG, tubal devamlılığın ve patolojilerin objektif değerlendirilmesinde aynı anda tedavi imkanı sağlaması nedeni ile tercih edilmektedir (35). Aynı zamanda kavitenin şeklini, yer kaplayan lezyon olup olmadığını gösterir. Serviksten verilen radyopak madde sonrası floroskopik görüntülemeyi içerir. HSG duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %95'tir. Tubal geçişin görüldüğü durumlarda tüpler neredeyse her zaman açıktır. Distal tubal obstrüksiyonu da genellikle doğru olarak göstermektedir (36). Proksimal tubal obstrüksiyonlarda,

sıklıkla tubal spazm veya kontrast madde içerisinde hava-debris karışması nedeni ile %3 yanlış pozitiflik oranı mevcuttur (19). Bununla beraber peritubal adezyonları ve endometriozisi değerlendirmekte başarılı değildir (36). 20 çalışmayı değerlendiren bir metaanalizde 4179 hastanın HSG ve günümüzde altın standart kabul edilen laparoskopik kromotubasyon prosedürleri değerlendirilmiş ve tubal patensi değerlendirmede HSG' nin duyarlılığı %65, özgüllüğü %83 olarak bulunmuştur (36).

Laparoskopi ile kromotubasyon, laparaskopi sırasında metilen mavisi verilerek tüplerin açıklığının değerlendirilmesi işlemidir. Laparoskopi ile tüp devamlılığı ve açıklığı değerlendirilirken, tubal patolojiler, endometriozis veya peritubal adezyonların tanı ve tedavisi eş zamanlı gerçekleştirilebilir. Günümüzde altın standart olmakla beraber invaziv bir işlem olması, genel anestezi ihtiyacı ve diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında pahalı olması nedeni ile sadece tanı testi olarak spesifik bir popülasyonda kullanılmaktadır (37).

Histerosalpingo-kontrast sonografi: Transservikal olarak enjekte edilen kontrast madde sonrası ultrasonografi ile tubal patensin değerlendirmesi mantığına dayanır. Hem tubal patens hem kaviter lezyonların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Laparoskopik tubal kromotubasyon ile karşılaştırma yapılan çalışmalarda histerosalpingo-kontrast sonografinin duyarlılığı %75-96, özgüllüğü %67-100 arasında bulunmuştur (38).

Uterin kavitenin değerlendirilmesi: Kavitenin değerlendirilmesinde transvajinal ultrasonografi, 3-boyutlu ultrasonografi, salin infüzyon sonografisi, HSG ve histeroskopi gibi çeşitli tanı modaliteleri mevcuttur. Transvajinal ultrasonografi ile kıyaslandığında transservikal salin infüzyonunu takiben ultrasonografi eşliğinde kavitenin değerlendirilme mantığına dayanan salin infüzyon sonografi intrauterin adezyonların tanınmasında, polip ve konjenital uterin anomalilerin saptanmasında daha etkin bulunmuştur (39). Bununla beraber myometriyum ve adneksler hakkında bilgi sağlanması gibi yararları da mevcuttur. Uterin kavitenin değerlendirmesinde histeroskopi ile karşılaştırıldığında benzer performansa sahiptir (39). HSG öncelikli olarak tubal patens değerlendirilmesinde kullanılsa da intrakaviter patolojileri de göstermektedir. Histeroskopi kavite anomalilerinin değerlendirilmesinde altın standarttır. Eş zamanlı tedavi şansı sağlaması yararlarından bir tanesidir.

Endometriyal biyopsi: Amerikan Üreme Sağlığı Derneği (ASRM) eşlik eden bir patoloji olmadığı durumlarda infertilite değerlendirmesinde endometriyal örnekleme yararının tartışmalı olduğunu belirtmiş ve rutin kullanılmamasını önermiştir (40). İmplantasyon ve embriyonel gelişim için progesteronun önemi bilinse de luteal faz eksikliğinin bir infertilite nedeni olduğu kanıtlanmamıştır. Endometriyal histolojik değerlendirmenin fertilité ile korelasyonu düşük bulunmuştur (41).

Kromozom analizi: Şiddetli oligospermi olgularında karyotip analiz endikasyonu bulunmakla beraber Y kromozom mikrolezyonlarının değerlendirilmesi de önerilebilir. Prematür ovaryan yetmezlik tanısı alan hastalara ya da aile hikayesi olanlara karyotip analizi önerilmektedir. Genellikle spesifik nedenler dışında genetik anomalilerin düşük insidansı nedeni ile rutin karyotip analizi önerilmemektedir (41).

2.4 Açıklanamayan İnfertilite

İnfertil çiftlerin yaklaşık %22–28’inde altta yatan bir neden bulunamamaktadır (42). Korunmasız düzenli ilişkiye rağmen 1 yıl içinde gebelik elde edememiş çiftlere yapılan temel infertilite testlerinin normal sınırlarda saptanması sonucunda açıklanamayan infertilite tanısı koyulur. Yakın zamanlı bir çalışmada fertilité kliniğine başvuran 35 yaş altı kadınlarda açıklanamayan infertilite prevalansının %21 ve 35 yaş üzeri kadınlarda %26 olduğu belirtilmiştir (43). Açıklanamayan infertilitenin bir dışlama tanısı olması ile ve ekspektan yaklaşım sonucunda çiftlerin gebelik elde edebilmesi nedeni ile bir yayında açıklanamayan infertilite tanısının subfertilite olarak değiştirilmesi önerilmiştir (44). Açıklanamayan infertilite tanısı alan 253 hastayı içeren bir randomize kontrollü çalışmada, ekspektan izlem grubunda devam eden gebelik oranı %27 olarak bulunmuştur (45). Yine bir başka çalışmada IVF planı bulunan, infertilite süresi 2 yıl ve üzerindeki hastaların %13’ünün spontan gebelik elde ettiği belirtilmiştir (46). Bir başka kohortta IVF tedavisi için bekleme sırasında olan hastaların 12 ay içerisindeki kümülatif gebelik oranı %5.9 olarak bulunmuştur (47). ASRM tanı için aşağıdaki testleri önermektedir:

- Semen analizi,
- Ovulasyonun değerlendirilmesi,
- Tubal patensin değerlendirilmesi.

Her ne kadar temel değerlendirme, açıklanamayan infertilite tanısı koymak için yeterli olarak görülse de günümüzde hala reproduktif sistem ile ilgili değerlendirilmesi mümkün olmayan durumlar mevcuttur. Spermatozoanın kapasitasyon yeteneği, akrozom reaksiyonu veya zona pellusidaya bağlanma yeteneği, spermatozoanın fertilizasyon yeteneği, defektif oosit, tubal motilite gibi durumları saptamak için rutin testler bulunmamaktadır. Gleicher ve arkadaşlarının (48) bir yazısında açıklanamayan infertilite tanımının terk edilmesi gerektiğine değinilmiştir çünkü tanı tanısal testlerin kalite ve kantitesine dayanmaktadır.

İnfertiliteye yol açabilecek bir patolojinin izlenmediği hastalarda çiftlerin gebelik elde edememe nedeni konusunda birkaç olasılık belirtilmiştir. Folikül gelişiminde, ovulasyonda ve luteal fazda minimal değişiklikler bu hastaların bir kısmında gözlenmiştir (49). Yine çiftlerin bir bölümünde erkek hastaların semen analizinde sperm konsantrasyonu ve motilitesinin normalin alt sınırlarında seyrettiği gösterilmiştir (50). İmplantasyon başarısızlığı, minimal servikal faktörler, sperm veya ovum transport problemleri, sperm - ovum ilişkisindeki patolojilerin etiyolojide yeri düşünülmektedir (51).

Defektif endometriyal reseptivitenin açıklanamayan infertilite ve tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan hastalarda blastokistin normal tutunma ve invazyonuna engel olduğu da düşünülen bir diğer olasılıktır (52). Endometriyum, hormonal regülasyonu olan, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın kontrolünde, fonksiyonel ve morfolojik değişimlere uğrayan ve embriyo için hazırlanan geniş plastisiteye sahip bir organ olarak kabul edilir. Reseptif endometriyum, diğer adı ile implantasyon penceresi, mid-sekretuar fazda embriyonun tutunmasına maksimum imkan sağlayan zaman dilimi olarak tanımlanır (53).

LH pikinin her kadında ve her siklusta ovulasyon ile sonlanmadığı, menstruel siklus içerisinde birden fazla sayıda pikler oluşabildiği günümüzde bilinmektedir (54). Bununla beraber, klinik değerlendirmede endometriyal reseptivite aralığı ovulasyondan sonraki 7-9 gün olarak belirlenmiştir. Son yıllarda geliştirilen yeni moleküllerin tanı yöntemleri ile implantasyon aralığının bireylere göre değişiklik gösterebildiği ve implantasyon penceresinin 12 saat ile 2 gün arasında değişebildiği gösterilmiştir(55). Endometriyumun reseptif faza geçişindeki başarısızlık infertilitenin önemli bir nedenini oluşturmaktadır (56). Endometriyal siklusta reseptivite ile ilişkili

spesifik genlerin saptanması ve bu genlerin transkriptomik bir imzaya sahip olduğunun görülmesi endometriyal reseptivite analizinin (ERA) temelini oluşturmuştur (57).

2.4.1 Açıklanamayan İnfertilitede Tedavi Yöntemleri

Açıklanamayan infertilitede nedene yönelik bir tedavi şansı bulunmaması nedeni ile ampirik olarak çeşitli tedavi modaliteleri uygulanmaktadır. Tedavi basamakları açısından bir konsensüs bulunmasa da günümüzde en sık yaklaşımlar ekspektan tedavi, ovaryan stimülasyon (OS), intrauterin inseminasyon (IUI), OS - IUI veya in vitro fertilizasyondur (IVF). Tedavi planlanmadan önce çiftlerin yaşı, infertilite süresi, daha önceki gebelik öyküsü göz önünde bulundurulmalıdır.

Ekspektan yaklaşım: Yapılan bir çalışmada Hollanda'da bulunan 26 klinikte açıklanamayan infertilite tanısı almış 253 çift 6 ay ekspektan yaklaşım veya OS - IUI gruplarına ayrılmıştır. Ardından OS - IUI başarısızlığında IVF tedavisine geçilmiş ve çiftler 3 yıl boyunca izlenmiştir. İki grup arasında gebeliğe ulaşma süresinde anlamlı fark izlenmemiştir. Kümülatif gebelik yüzdesi ekspektan grup ve OS - IUI grubu için %72 - %73 olarak bulunmuştur (relatif risk 0.99) (58). Hayat tarzı değişiklikleri ile bu faktörlerin kontrol altına alınması açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde fertilitiyi olumlu etkilemektedir (59).

IUI: IUI ile amaçlanan konsantre edilmiş çok sayıda spermin küçük bir katater yardımıyla uterus içine enjeksiyonudur. Bhattacharya ve arkadaşlarının 2.5 yıl ve üzerinde infertilite şikayeti olan 580 çift ile yaptığı bir randomize kontrollü çalışmada hastalar 3 gruba ayrılmış, 193 hastaya ekspektan yaklaşım, 194 hastaya klomifen sitrat, 193 hastaya OS eklenmeden IUI planlanmış ve 6 ay sonra 3 grup karşılaştırıldığında canlı doğum oranları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (60).

OS: Klomifen sitrat, letrozol, gonadotropinleri içeren bir grup medikasyon ile fertilizasyon için bir veya birden fazla folikülün gelişimini sağlamak; uygun bir veya daha fazla matür oositin oluşumunu hazırlamak olarak tanımlanabilmektedir. Klomifen sitratın açıklanamayan infertilitede anlamı olduğuna yönelik kanıt bulunmamaktadır (61). Bir sistemik derlemede açıklanamayan infertilitede sadece klomifen sitrat veya letrozol kullanımı karşılaştırılmış klomifen sitrat kullanılan grupta gebelik oranı %20.8, letrozol grubunda %24.5 bulunmuştur. İki oran arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (62).

OS - IUI: Farquhar ve arkadaşlarının (63) yaptığı 101 hastayı içeren bir randomize kontrollü çalışmada 3 ay süre ile oral ajanlar sonrasında IUI yapılan grup ile 3 ay ekspektan yaklaşım karşılaştırılmış, oral ajanlar ve IUI grubunun kümülatif canlı doğum oranı %31, ekspektan yaklaşım grubunun ise %9 olarak bulunmuştur. Bu nedenle ekspektan tedavi ile gebelik elde edemeyen çiftlerde IVF'ten daha az invaziv ve maliyet etkin olması nedeni ile OS - IUI ilk basamak tedavi seçeneği olarak belirtilmektedir (64). OS - IUI tedavisinde seçilecek ajan ile ilgili ortak bir kanı bulunmamaktadır. Letrozol, klomifen sitrat ve gonadotropinlerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada klinik gebelik ve canlı doğum oranları arasında gonadotropinlerin siklus iptal oranı daha çok olmasına rağmen daha etkin olduğu belirtilmiştir (65). Günümüzde iki yaklaşım da uygun olarak değerlendirilmektedir.

IVF: Kısa zaman aralığında siklus başına gebelik oranı en yüksek olan tedavidir.

2.5 Mikrobiyota

Doğduğumuz anda sadece kendi hücrelerimizden ibaret olan vücudumuzun çeşitli bölümleri hayatımızın ilk birkaç yılı içerisinde çok sayıda bakteri, mantar ve virüs ile kolonize olmaktadır. Bu hücrelerin tamamının oluşturduğu topluluk insan mikrobiyomu olarak adlandırılır ki mikrobiyom neredeyse vücudumuzun geri kalanındaki hücrelerin 10 katı kadar hücre içermektedir ve insan genomundan çok daha fazla sayıda gene sahiptir (66).

Mikrobiyom, belirli bir çevre veya konak ile ilişkili mikroorganizmalar topluluğunu içeren biyotik ve abiyotik habitat olarak da tanımlanabilmektedir. Mikrobiyota ile eş anlamlı olarak kullanılsa da, mikrobiyota mikrobiyomun gen tabanlı biyotik komponenti için kullanılmaktadır (67). İnsan mikrobiyom çalışmaları, sağlıklı bireylerin bile bağırsak, cilt, vajen gibi bölgelerini işgal eden mikroorganizmaların çeşitliliği ve miktarının birbirinden oldukça farklı olduğunu ortaya koymuştur.

Bu konuyla ilgili çalışmalar yıllardır sürmektedir. İnsan Genom Projesi (HGP) ile, insan genom diziliminin büyük kısmı paylaşıldıktan sonra 2007 yılında İnsan Genom Projesinin devamı niteliğinde İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) başlatılmıştır. Bu projeye mikrobiyota olarak isimlendirilen mikroorganizma topluluklarının tespit edilmesi ve özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır (68). İkinci genom projesi olarak

da adlandırılan çalışmada 250 sağlıklı gönüllünün 7 farklı vücut bölgesi değerlendirilmiştir. Her ne kadar diyet, çevre, konağın genetik yapısı ve erken mikrobiyal maruziyetin bakteriyel profiller üzerinde etkilerinin olduğu belirtilmiş olsa da bu çeşitliliğin nedenleri tam olarak açıklanamamıştır. İnsan ilişkili mikrobiyal toplulukları karakterize etmek için HMP bugüne kadarki en büyük kohortu oluşturmuş ve farklı bölgelerin habitatlarını analiz etmiştir (68).

Mikrobiyotanın vücutta inflamasyon, immün sistem, beslenme, endokrin sistem, epitel maturasyonu ve bağırsak epitelizasyonundaki işlevleri düşünüldüğünde birçok hastalık ile ilişkisi gündeme gelmiştir. Çeşitli faktörlerin etkisi ile mikrobiyotanın iç dengesi bozulabilir. Bununla birlikte mikrobiyota hem içerik hem de sayısal olarak bir değişime uğrar (69). Bu durum disbiyozis olarak tanımlanır. Günümüzde mikrobiyotadan kaynaklanan hastalıkların temelinde disbiyozisin var olduğu düşünülmektedir (70).

Yapılan çalışmalar mikrobiyotanın çeşitli hastalıklarla ilgili olduğunu göstermektedir (71). Gastrointestinal sistem, geniş yüzey alanı ve mikroorganizmalar için zengin besin öğeleri içermesi nedeniyle kolonizasyon için en uygun ortamı sunmaktadır. Doğumla birlikte şekillenmeye başlayan mikrobiyotamızın değişimi ve gelişimi hayat boyu devam etmektedir. İnsan mikrobiyota kompozisyonu yaş, cinsiyet, ırk, beslenme durumu, kişisel alışkanlıklar, yaşam şekli ve belli hastalık durumlarının varlığına göre kişiden kişiye değişebilmektedir. (72).

Sindirim sistemi mikrobiyotasının immün sistem gelişimine ve düzenlenmesine katkıda bulunduğu, immün toleransı artırdığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Tüm bu etkilerinden dolayı intestinal mikrobiyotanın inflamatuvar barsak sendromu, Chron hastalığı, ülseratif kolit gibi sindirim sistemi hastalıklarının yanı sıra; alerji, diyabet, otizm, çölyak hastalığı, obezite, hipertansiyon ve birçok kanser türünün patogenezinde rol oynadığı ve bu hastalıklarda intestinal mikrobiyota kompozisyonunun değiştiği bildirilmiştir (73-78). Tüm bu mikrobiyota değişikliklerinin hastalıkların temelini oluşturup oluşturmadığı ya da hastalıkların sonucunda gerçekleşip gerçekleşmediği ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.5.1 Mikrobiyota Analizi

Mikrobiyota elemanlarının büyük bölümünü kültürde üretilmesi güç olan anaerobik mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Günümüze kadar kültür bazlı

yöntemler kullanılmış ancak moleküler yöntemlerin gelişmesiyle kültürde üretilmeyen bakteri türlerinin tanımlanması için bir olanak oluşmuştur. Mikrobiyota kompozisyonlarının büyük kısmını bakteriler oluşturduğundan hedef bölge olarak 16S ribozomal RNA (rRNA) geni seçilmektedir. DNA izolasyonu sonrası 16S rRNA amplifikasyonu ile bakteriler tanımlanmaktadır (79). 16S rRNA gen sekanslaması tür seviyesine kadar bakterilere özgü olan hiperdeğişken bölgeleri tanımlayabilmektedir (80).

Metagenomik çalışmalar genellikle 1500 baz uzunluğundaki prokaryotik 16S rRNA geninin analiziyle yapılmaktadır. Bu sayede rRNA molekülü bakterilerin filogenetik identifikasyonu için kullanılmaktadır (81). Bakteri hücresi içerisinde binlerce kopya 16S rRNA bulunduğundan, bu gen bölgesini temel alan yöntemlerin duyarlılığı daha yüksektir. 16S rRNA gen bölgesinde 9 adet değişken bölge bulunmaktadır (V1 - V9) (82). Değişken bölgeler, filogenetik sınıflandırmalarda tür tespiti için kullanılan özel bölgelerdir. Tür tespitinde en sık kullanılan değişken bölgeler V3 ve V4 bölgeleridir. Bu sayede geniş mikrobiyal popülasyon aralığında, her bir türün ayrı tespitini yapmak mümkün olmaktadır (83).

Neredeyse özdeş etiketlerden oluştuğu varsayılan kümeler Operasyonel Taksonomik Ünite'ler (OTU) olarak adlandırılmaktadır. Belirlenen OTU'lar tanımlanmış organizmalara ait veri tabanları ile karşılaştırılarak etiketlenmektedir (81).

Yeni Nesil Dizileme yöntemleri, düşük maliyet ile ve hızlı bir şekilde dizilerin elde edildiği yöntemleri kapsamaktadır. Bu yeni nesil dizileme yöntemlerinde tipik olarak klonlanmış ampikonlar yerine, DNA ampikonu ya da total topluluk DNA'sı kullanılmaktadır (84).

Total metagenomik DNA dizilenip fonksiyona yönelik veri tabanları ile karşılaştırılabilir veya dizilenen topluluk DNA'sı referans genomlar ile karşılaştırılarak mikrobiyal dizi varyantları ve polimorfizmleri tanımlanabilir, spesifik organizmaların varlık ve miktarları belirlenebilir. İnsan mikrobiyotası ile ilgili mevcut moleküler çalışmaların çoğu, klinik ölçümlerle belirli OTU'ları veya organizmaları ilişkilendirmeye çalışan hipotezler üretmek üzere yapılmaktadır.

Dizileme yöntemi olarak geliştirilmiş dört ana yaklaşım bulunmaktadır (66):

- Klonlanmış 16S rRNA Gen Ampikonlarının Dizilenmesi

- Yeni Nesil Dizileme
- 16S rRNA Gen Amplikonlarının Direkt Dizilenmesi
- Mikrobiyom Shotgun Dizileme Ve Metagenomik

Mikrobiyotada tür çeşitliliklerini belirlemek için çeşitli ölçekler kullanılmaktadır. Bir mikrobiyom verisinde hangi tür bakterilerin olduğunu ve miktarını ölçmek için alfa çeşitlilik ölçümü kullanılır. Alfa çeşitlilik bir mikrobiyota örneğinin kendi içinde ne kadar farklı olduğunu değerlendirir. Ölçüm için; OTU'ların sayımı, filogenetik farklılık tayini, Simpson indeksi, Shannon indeksi ve Chao 1 indeksi gibi analiz yöntemleri mevcuttur. Beta çeşitlilik ise örneklerin birbirinden ne kadar farklı olduğunu belirler. Beta çeşitlilik için Öklid ölçümü, Bray-Curtis farklılık indeksi gibi ölçümler kullanılmaktadır (85).

2.6 Ürogenital Mikrobiyota

Ürogenital sistemde bulunan bakteriler insan vücudundaki tüm bakterilerin %9'unu oluşturmaktadır (86). Barsak mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalar bazal sağlıklı bir immünite için kommensal kolonizasyonun gerekliliğini göstermiştir (7, 87). Barsak mikrobiyotası çalışmalarında disbiyozis sonucu oluşan değişikliklerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğinin belirtilmesinden sonra vajinal, servikal ve endometriyal mikrobiyotanın çeşitli hastalıklar ve infertilite ile ilgisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Vajinal mikrobiyota HMP'de çalışılan 7 vücut bölgesinden biridir ve düşük alfa çeşitlilik oranına sahiptir. Düşük alfa çeşitlilik vajinal mikrobiyotada tür çeşitliliğinin kısıtlı olduğunu göstermektedir (2, 68).

Vajinal mikrobiyotanın kadın genital sistemindeki patojenlere karşı direnç için önemli mekanizmalar olan adaptif bağışıklık sistemlerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (88). Vajinal mikrobiyotanın yenidoğanların immünizasyon ve nöral gelişimine katısı olduğu düşünülen ilk kolonizasyon için de kritik bir öneme sahip olduğuna değinilmiştir (89). Yapılan vajinal mikrobiyota çalışmalarında *Lactobacillus* üstünlüğü mevcuttur (90, 91). Yine tek bir mikrobiyom profilinden ziyade etnik kökenlere göre değişen çeşitli profiller olduğu ve bu ana mikrobiyomların kategorize edilebileceği düşünülmüştür (92). Yapılan çalışmalarda vajinal mikrobiyota en çok saptanan baskın mikroorganizmalar üzerinden beş kategoriye ayrılmıştır: *Lactobacillus (L) crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* ve *Anaerococcus*,

Peptoniphilus, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Atopobium* ve *Gardnerella* gibi anaerob bakterilerin baskın olduğu son grup (91).

Vajinal mikrobiyom kompozisyonundaki farklılıkların enfeksiyon ve flora değişikliklerini etkileyebileceği düşünülmektedir (93). Ayrıca vajinal mikrobiyotanın etnik farklılıklar dışında hayat boyunca çeşitli nedenlerle fluktuasyona uğradığı ve baskın türlerin reproduktif sonuçları da etkileyebileceği belirtilmiştir (93). Sağlıklı bir vajinal mikrobiyotanın temelini *Lactobasillus spp.* oluşturmaktadır. Bakteriyel vajinozis bozulmuş mikrobiyota profili veya beşinci kategori vajinal mikrobiyota olarak da tanımlanabilir. Laktobasiller kompetitif inhibisyon ile patojenlerin vajinal epitelyuma yapışmasını önlerler. Ayrıca hidrojen peroksit üreterek vajen pH'sını düşürür ve bakteriosin üreterek epitele tutunmasını engellerler (91). Beşinci kategori vajinal mikrobiyom grubu olarak kabul edilen bakteriyel vajinozisin çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Vajinal mikrobiyotanın jinekolojik kanser, pelvik inflamatuvar hastalık ve infertilite üzerinde potansiyel etkileri birçok derlemede tartışılmıştır (94-97). Romero ve arkadaşları (98) bir çalışmada vajinal mikrobiyotanın farklı gebelik dönemlerinde tutarlı kaldığını, gebe olmayan kadınların vajinal mikrobiyotalarının farklı zaman noktalarında daha değişken olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir şekilde, başka bir araştırma, etnik kökene bakılmaksızın doğumdan 6 hafta sonraki vajinal mikrobiyotanın gebelik sırasındaki vajinal mikrobiyotadan daha farklı olduğunu ortaya koymuştur (99).

Steril uterus 20. Yüzyılda pediatrist Henry Tisser tarafından oluşturulan, fetusun steril bir ortamda geliştiği görüşünün öncüsü bir dogma olarak kabullenilmiş ancak kanıtlanmamıştır (100). Yakın dönemde yeni nesil sekanslama yöntemlerinin bulunması endometriyal mikrobiyotanın varlığını göstermiştir (100-102). Uterusun steril olmadığına yönelik çalışmalar endometriyal mikrobiyotanın reseptivite ve plasental formasyon üzerine olan etkilerini düşündürmüştür.

Önceleri mikrobiyal karakterizasyonun tespitinin zorluğu nedeni ile endometriyal bakterilerin varlığının göz ardı edilmiş olabileceği düşünülmektedir (103). Yakın zamanda yapılan çalışmalar steril uterus paradigmasının değişme ihtimalini doğurmuştur (104). İnsan endometriyal mikrobiyomunun incelenmesi ve reproduktif bozuklukların yönetimindeki faydalarının değerlendirilmesi henüz başlangıç aşamasındadır. Günümüzde endometriyal mikrobiyom biyoçeşitliliğinin

üreme üzerine etkisi, endometriyal çevredeki kolonizasyonun mekanizması, bakteriler ve endometriyum arasındaki kommensal veya patojenik ilişkiler üzerine çalışmalar yapılmaktadır (5, 101, 105, 106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma grubuna Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı almış uygun hastalar dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak da aile planlaması bölümüne rahim içi araç takılma amacıyla başvurmuş uygun hastalar dahil edilmiştir.

Çalışma grubuna dahil edilme kriterleri şunlardır:

- 25- 35 yaş arası olmak
- VKİ < 30 kg/m² olmak
- 12 aydan uzun süredir korunmasız beraberliğe rağmen gebelik elde edememiş olmak
- Düzenli ve ovulatar siklusa sahip olmak
- HSG’de en az tek taraflı tubal açıklık izlenmesi
- Over rezervi testlerinin normal olması (AMH düzeyi > 1 ng/mL veya AFS bilateral > 7)
- Eşin sperm analizinin WHO 2010 kriterlerine göre normal referans aralıklarında olması (1.5 ml, 15 milyon spermatozoa/ml, 39 milyon spermatozoa/ejakülat, %4 normal morfoloji, %32 ileri hareketli sperm, % 40 total hareketli sperm)

Kontrol grubuna dahil edilme kriterleri şunlardır:

- 25- 35 yaş arası olmak
- VKİ < 30 kg/m² olmak
- Düzenli ve ovulatar siklusa sahip olmak
- Son 2 yıl içerisinde canlı doğum yapmış olmak

Kriterlere uygun hastalar öncelikle uygun şartlarda çalışma ile ilgili ayrıntılı olarak bilgilendirilmiştir. Belirli bir düşünme süresi sonrasında çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan yazılı olarak bilgilendirilmiş gönüllü onam alınmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden hastaların son menstrüasyon tarihi hesaplanmış ve sekretuar dönemde oldukları teyit edilmiştir.

Dışlanma kriterleri:

- Ek dahili hastalığa sahip olmak

- Son 3 ay içinde hormonal tedavi veya antibiyotik tedavisi (oral, sistemik veya vajinal) almış olmak olarak belirlenmiştir.

3.2 Endometriyum Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya dahil olmayı kabul eden gönüllülerin endometriyum örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Aile planlaması bölümünde pipelle kanül ile toplandı. Vajinal kontaminasyonu önleme amacı ile spekulum yerleştirildikten sonra serviks klorheksidin ile temizlendi ve varsa servikal mukus ortamdaki mekanik olarak kaldırıldı. Ardından pipelle kanül vajen duvarı ve eksternal servikal os çevresine değdirilmeden servikal kanaldan uterin kaviteye yerleştirildi. Bir kere ileri-geri hareketle örnek alındı. İşlemden hemen sonra alınan örnekler DNA içermeyen steril kaplarda steril distile su içerisine aktarıldı. Kontaminasyonu önleme amacı ile saklama kapaklarına parafin eklendi. Örnekler çalışma grubu için "ÇG", kontrol grubu için "KG" kodu altında kodlandı ve asla hastaya ait kişisel bilgiler ile etiketleme yapılmadı. Alınan örnek sırasına göre 01'den başlanarak her bir gönüllüye numara verildi. Alınan tüm örnekler oda ısısında bekletilmeden Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümüne ait dolapta kilitli olarak -20 °C'de saklandı.

Veri toplama formunda hastaların yaşı, gravidası, paritesi, VKİ, HSG sonucu, antral folikül sayısı, eş sperm analizi sonucu, menstrüel düzeni, son 3 ay içerisinde hormon kullanım öyküsü, antibiyotik kullanım öyküsü, infertilite süresi, geçmiş infertilite tedavilerine ait öyküleri ve dahili hastalıkları kayıt altına alındı.

Vücut kitle indeksi, $VKI = \frac{\text{Vücut ağırlığı (kg)}}{\text{boy(m}^2\text{)}}$ formülü ile hesaplandı.

3.3 Endometriyum Örneklerinin DNA Ekstraksiyonu

Tüm endometriyal örnekler toplandıktan sonra aynı anda oda sıcaklığında bekletilerek çözüldü ve DNA ekstraksiyonu için doku ekstraksiyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanıldı. Bu kapsamda aşağıda tarif edilen işlemler sırasıyla uygulandı.

- Endometriyum örnekleri 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı.
- Her bir tüp üzerine 180 µL Bufer ATL eklendi.

- Örnekler üzerine 20 µL proteinaz K eklendi, 15 saniye vortekslenerek karışma sağlandı ve doku tamamen lizise uğrayana kadar 56 derecede inkübe edildi.
- Örnekler en yüksek devirde 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 200 µL Bufer AL eklendi, 15 saniye boyunca tüpler vortekslendi ve 70 derecede 10 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından partiküllerin çökmesi için en yüksek devirde santrifüj edildi.
- Her bir tüp içine 200 µL % 96'lık etanol eklenerek tüpler 15 saniye boyunca vortekslendi. Ardından partiküllerin çökmesi için en yüksek devirde santrifüj edildi.
- Ardından karışım 2 ml'lik tüplere yerleştirildi. Tüpler 1 dakika boyunca 6000 g'de santrifüj edildi. Örnekler yeni tüplere alındı, filtratın bulunduğu tüpler atıldı.
- Tüplere 500 µL Bufer AW1 eklendi. Tüpler 1 dakika boyunca 6000 g'de santrifüj edildi. Örnekler yeni tüplere alındı.
- Tüplere 500 µL Bufer AW2 eklendi. Tüpler 3 dakika boyunca 20000 g'de santrifüj edildi. Örnekler yeni tüplere alındıktan sonra en yüksek devirde 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Örnekler 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı ve kalan filtrat atıldı. Örnekler 200 µL Bufer AE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon sonrası 6000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- DNA ekstraksiyonundan sonra Qubit florometre ile DNA miktar tayini yapıldı.
- İşlem sonrası % 1,5 konsantrasyonda agaroz jel hazırlandıktan sonra her örnekten 5 µl yüklendi. Elektroferez tamamlandıktan sonra bantlaşma göstermeyen örnekler için bir sonraki basamağa geçilmedi.

3.4. 16s rRNA Sekanslama ile Metagenom Tayini

Analiz için Ion Torrent 16s Metagenomiks kiti (Thermo Fisher, Almanya) kullanıldı. Kit, bakterilerin 16S bölgesine karşılık gelen hiper değişken bölgelerini seçici olarak amplifiye eden iki primer seti içeriyordu:

- Primer set V2- 4-8
- Primer set V3-6, 7-9

İşlem basamakları Ion Torrent 16s Metagenomiks Kit manuel kitapçığının protokolüne göre yapıldı.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için metagenomiks kit içerisinde 2 ayrı primer set mevcuttu. Bu nedenle 2 ayrı karışım hazırlandı. *Eshershia Coli* pozitif kontrol olarak kullanıldı ve direktiflere uygun olarak 1:20 oranında sulandırıldı. Her bir örnek için 30 µL amplifikasyon karışımı hazırlandı:

- 15 µL mastermix
- 2 µL şablon
- 3 µL primer
- 10 µL DNA

Gerçek zamanlı PZR için amplifikasyon koşulları Tablo 3.1’de yer almaktadır. Her bir örnek için 1. ve 2. amplikonlar 40 µL hacimde birleştirildi.

Tablo 3.1. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	95°C	10 dakika
18-25 devir	95°C	30 saniye
	58°C	30 saniye
	72°C	20 saniye
	72°C	7 dakika
Bekleme	72°C	7 dakika
Bekleme	4°C	∞

Amplifikasyon ürünlerinin pürifikasyonu: Pürifikasyon için 72 µL ampure ve 40 µL amplikonlar birleştirilip 5 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından tüpler Dynamag-2 magnette 3 dakika bekletildikten sonra oluşan süpernatant atıldı. % 70’lik

etanolden 300 μ L her tüpe eklendi, 30 saniye bekletildikten sonra süpernatant atıldı. Oda ısısında tüpler 4 dakika inkübe edildi. Tüpler magnetten alındıktan sonra 15 μ L nükleaz içermeyen su eklendi. Tüpler yeniden Dynamag Magnete yerleştirildi. 1 dakikalık bekleme sonrası süpernatant yeni ependorfa alındı. Qubit florometre ile DNA miktar tayini yapıldı. Kütüphane Hazırlığı Aşamasında sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Kütüphane hazırlığı aşaması için hazır bulunan Ion Plus Library Kit kullanıldı.
- 1.5 ml lik ependorflara; 79 μ L amplikon, 20 μ L end repair bufer ve 1 μ L end repair enzim eklendi. Oluşan karışım 20 dakika oda ısısında bekletildi.
- Ardından 180 μ L AMPure XP Reagent karışıma eklendi, kısa süre vortekslendikten sonra 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Tüpler Dynamag-2 magnet üzerine yerleştirildikten sonra 3 dakika solüsyon berraklaşana kadar bekletildi ve oluşan süpernatant atıldı. Ardından 500 μ L %70 etanol tüplere eklendi. 30 saniye bekletildikten sonra berraklaşan süpernatant atıldı. Yıkamalar sonrası rezidü etanolün uzaklaşması amacı ile 4 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüpler magnetten alındıktan sonra 25 μ L TE eklenip vortekslendikten sonra yeniden magnete alındı ve 1 dk bekledi. Oluşan süpernatant yeni ependorflara alındı.

Barkodlama için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- DNA barkodlama amacı ile hazır bulunan Ion Xpress Barcode Adapters Kit kullanıldı.
- Hazırlanan karışım bileşenleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Her örnek için ayrı barkod kullanıldı.
- 0.2 ml'lik tüplerde oluşturulan karışımın qPZR programı Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Barkodlama için kullanılan karışım bileşenleri.

Bileşen	Kütüphane hacmi
DNA	~25 µL
10X Ligaz Bufer	2 µL
Ion P1 Adaptörü	2 µL
Ion Xpress X Barkodu	2 µL
DNTP Karışımı	2 µL
Nükleazsız su	49 µL
DNA Ligaz	2 µL
Nick polimerazı	8 µL
Toplam	100 µL

Tablo 3.3. Barkodlama sonrası qPZR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	25°C	10 dakika
Bekleme	72°C	5 dakika
Bekleme	4°C	Bekleme

İşlem sonrasında oluşan tüm karışım yeniden 1.5 ml'lik tüplere alındı. Ardından pürifikasyon için 140 µL AMPure X eklendi ve oda ısısında 5 dakika bekletildi. Dynamag-2 Magnet üzerine alınan tüpler 3 dakika bekledikten sonra oluşan süpernatant atıldı. 500 µL %70'lik etanol eklenip 30 saniye bekleme süresi sonrası oluşan süpernatant yeniden atıldı. Tüpler oda ısısında 4 dakika bekletildi. Ardından magnetten alınan tüplere 20 µL TE eklenip yeniden magnet üzerinde bekletildikten sonra oluşan süpernatant 1,5 ml'lik ependorflara alındı.

İşlem sonrasında kütüphane miktarına karar vermek için Qubit florometre ile DNA miktarı tayini yapıldı. Bu miktara göre dilüsyon formülü kullanılarak (pM birimindeki kütüphane volümü / 26 pM) dilüsyon gerçekleştirildi. Oluşturulan kütüphane 25 µl final hacmine getirildi. Ardından Ion Chef cihazına yüklenerek

kütüphanenin çipe aktarımı tamamlandı ve metagenom programı başlatıldı. Bu işlem sonrasında çip Ion Torrent 5S cihazı ile 16s rRNA sekanslama gerçekleştirildi.

3.5 İstatistiksel Analiz

OTU, alfa çeşitlilik ve beta çeşitlilik analizleri için Ion Reporter Software 5.12 ve demografik veriler ile *Lactobasillus* yüzdelerinin karşılaştırılması için SPSS 21.0 programları kullanıldı. İki sayısal değerin karşılaştırılması non parametrik testlerden Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Korelasyon testi amacıyla Spearman's rho test kullanıldı.

3.6. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 20.12.2018 tarihinde KA17-104 numarası ile onay alınmıştır. Karar No: 2018/22-35

Araştırma bütçesi ise Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje ID: 17812

4. SONUÇLAR

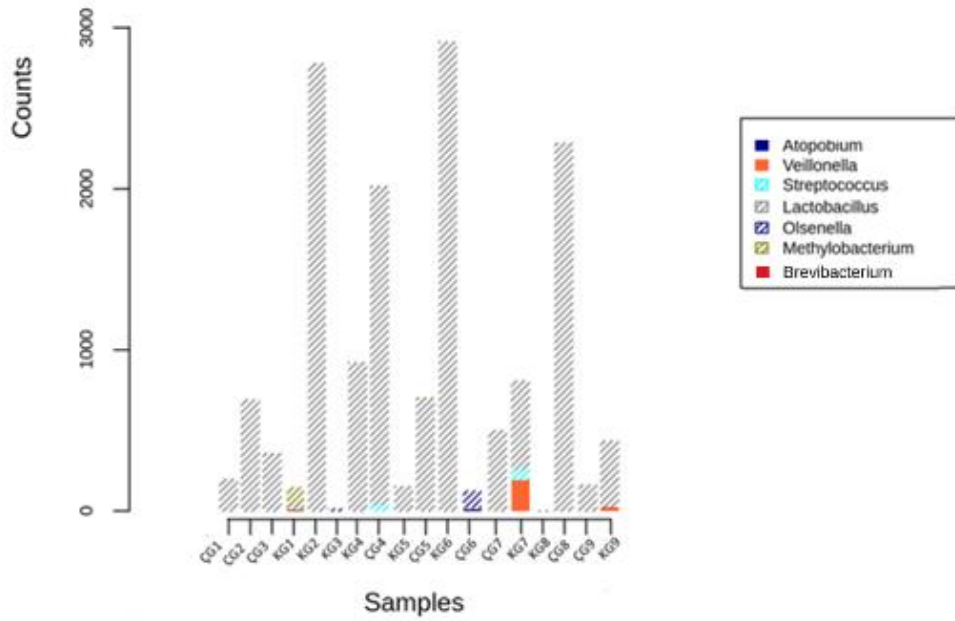
Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniğine infertilite şikayeti ile başvurup açıklanamayan infertilite tanısı alan 15 hasta çalışma grubu olarak ve Aile Planlaması Birimine rahim içi araç takılması amacı ile başvuran son iki yıl içerisinde canlı doğum yapmış 15 hasta kontrol grubu olarak dahil edildi.

Çalışma grubundaki hastaların yaş ortalaması 28.5 ± 3.2 (25 - 35), kontrol grubunun yaş ortalaması 29.9 ± 3.5 (26 - 35) idi. İki grubun yaş ortalaması arasında anlamlı fark yok idi ($p > 0.05$). Grupların VKİ ortalamalarına bakıldığında çalışma grubunda 24.1 ± 4.4 kg/m² ve kontrol grubunda 24.4 ± 2.4 kg/m² idi ve iki grup arasında istatistiksel fark izlenmedi ($p > 0.05$). Çalışma grubundaki hastaların ortalama infertilite süresi 29.4 ± 9.7 ay idi. Çalışma grubundaki hastaların %66.7'si daha önceden IUI tedavisi almıştı (n=10). Çalışma grubunda sadece bir hastanın IVF hikayesi mevcuttu. Çalışma grubunda bulunan hastaların ortalama AFS 16.2 ± 3.5 olarak hesaplandı. Gruplara ait demografik özellikler Tablo 4.1'de verilmiştir.

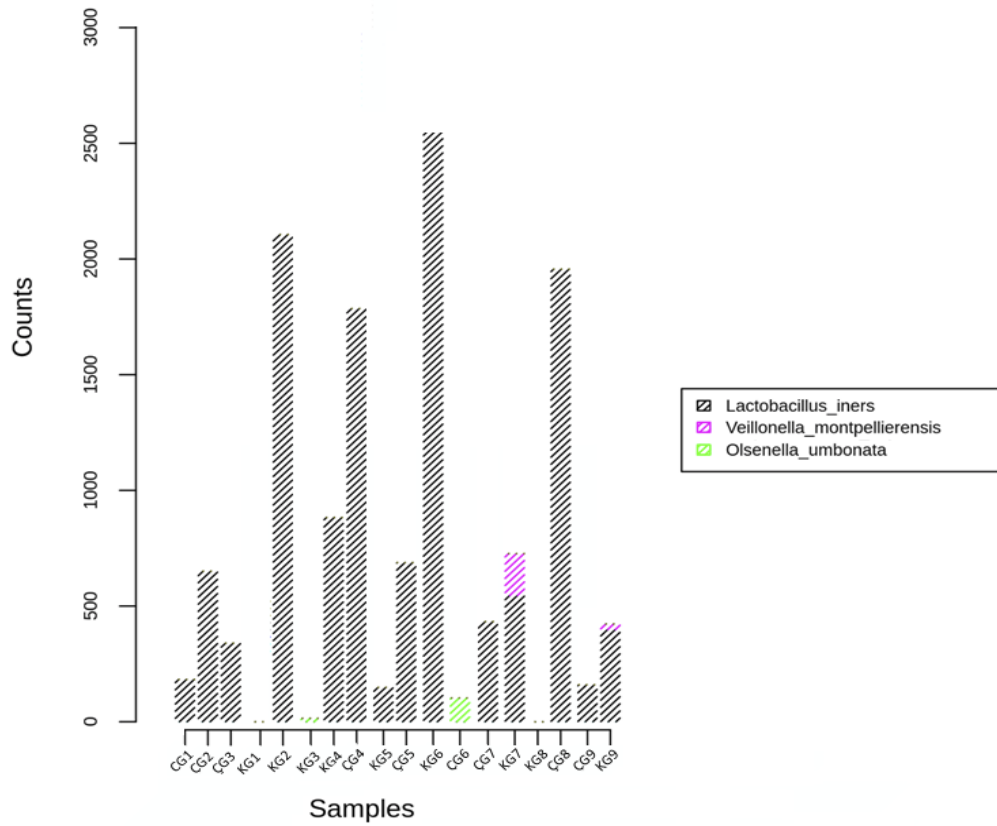
Tablo 4.1. Gruplara ait demografik özellikler

Değişkenler	Çalışma Grubu (n= 15)	Kontrol Grubu (n=15)
Yaş (yıl)	28.4 ± 3.2	29.9 ± 3.5 ($p > 0.05$)
VKİ (kg/m ²)	24.1 ± 4.4	24.4 ± 2.4 ($p > 0.05$)
İnfertilite süresi (ay)	29.4 ± 9.7	-
İnfertilite tedavisi (%)	66.7 (n= 10)	-
AFS	16.2 ± 3.5	-
Multiparite (% , n)	-	46 (n= 7)

Endometriyal örnek alınan 30 hastadan toplam 12 tanesinde agaroz jel elektroforezi basamağında bant oluşturulamadı. Geriye kalan 18 hastanın endometriyal örneklerinde saptanan bakteri *cinsleri* ve *türlerine* ait OTU dağılımı her örnek için Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Endometriyal örneklerde saptanan bakteri *cinslerinin* OTU dağılımı.



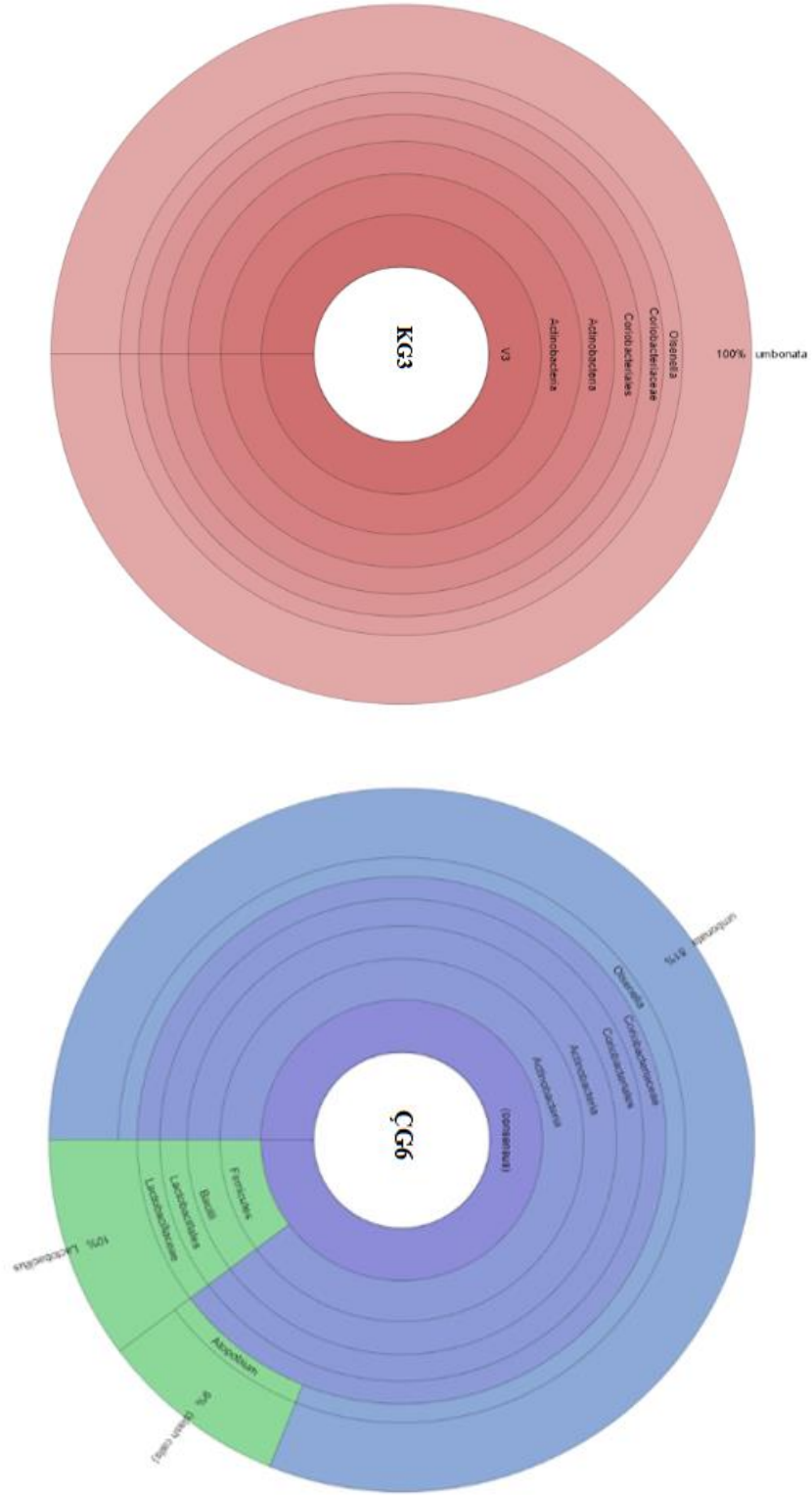
Şekil 4.2. Endometriyal örneklerde saptanan bakteri *türlerinin* OTU dağılımı.

OTU dağılımına göre en çok izlenen bakteri cinsinin *Lactobasillus* olarak saptanması nedeni ile gruplar *Lactobasillus* dominant (*Laktobasil spp.* > %90, LD) ve *Lactobasillus* dominant olmayan (NLD) olmak üzere iki kategoriye ayrıldı. Çalışma grubunda bant oluşturulan dokuz hastanın altısında (%66.7) ve kontrol grubunda yine bant oluşturulan dokuz hastanın dördünde (% 44.5) *Lactobasillus* dominansı saptandı ve aralarında anlamlı bir fark izlenmedi ($p= 0.64$). Açıklanamayan infertilite grubunda infertilite süresi ve *Lactobasillus* dominansı arasında korelasyon saptanmadı ($p=0.272$).

Endometriyal *laktobasillus* yüzdelerinin median değerleri çalışma grubu için 100 ± 29.9 ve kontrol grubu için 94.0 ± 47.5 olarak hesaplandı ve aralarında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p= 0.9$).

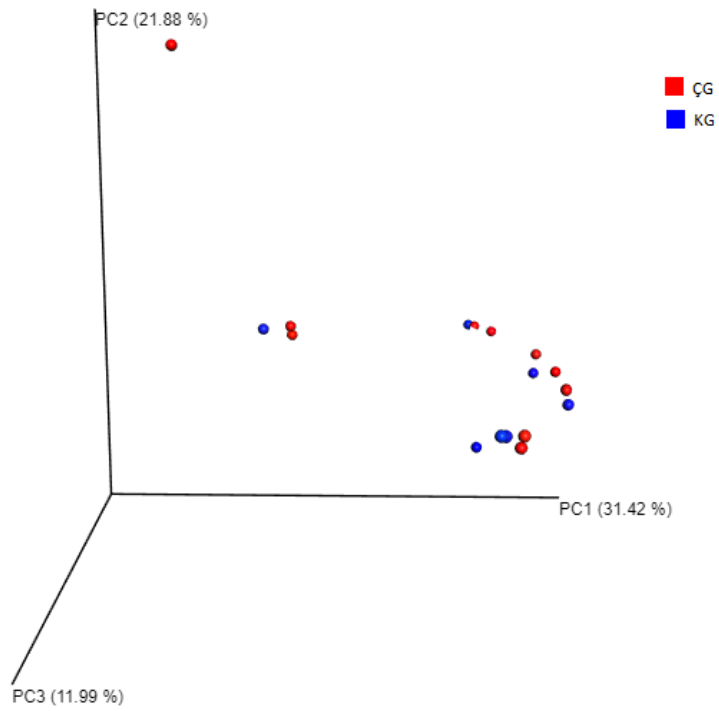
Bakteri türlerinin dağılımı değerlendirildiğinde, çalışma grubunda bulunan dokuz hastadan sekizinin ve kontrol grubunda bulunan dokuz hastadan altısının endometriyal mikrobiyota dağılımında *Lactobasillus iners* türünün büyük çoğunluğu oluşturduğu görüldü. Non *Lactobasillus* dominant örneklerde çalışma grubu için *Olsenella umbonata* (n=1) ve kontrol grubu için *Olsenella umbonata* (n=1) ve *Caulobacteraceae* familyasına ait (n=2) bakteriler izlendi (Şekil 4.3).

Çalışma grubuna ait örneklerde *Lactobasillus spp.* dışında saptanan bakteri cinsleri *Olsenella*, *Atopobium* ve *Streptococcus* idi. Kontrol grubunda saptanan diğer bakteri cinsleri *Brevibacterium*, *Olsenella*, *Veillonella*, *Streptococcus* idi. Çalışma grubundaki dokuz hastadan altısında sadece *Lactobasillus* cinsi bakteriler mevcut olup kontrol grubunda ise dört hastada sadece *Lactobasillus* cinsi saptanmıştır.

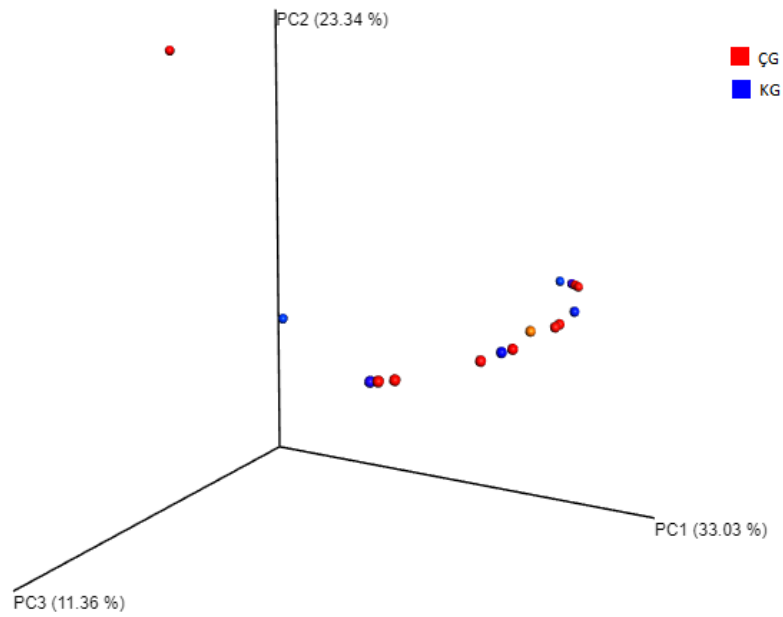


Şekil 4.3. NLD grubunda olan hastaların endometriyal örneklerinin bakteriyel dağılımı

Beta çeşitlilik iki topluluk arasındaki bakteriyel tür değişikliklerini karşılaştırma amacı ile kullanılır. Bu amaçla Bray-Curtis indeksi kullanılmış ve koordinatlar analizi yapılmıştır. Bakteri cinslerine ve türlerine göre Bray-Curtis beta çeşitlilik koordinatlar analizi Şekil 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

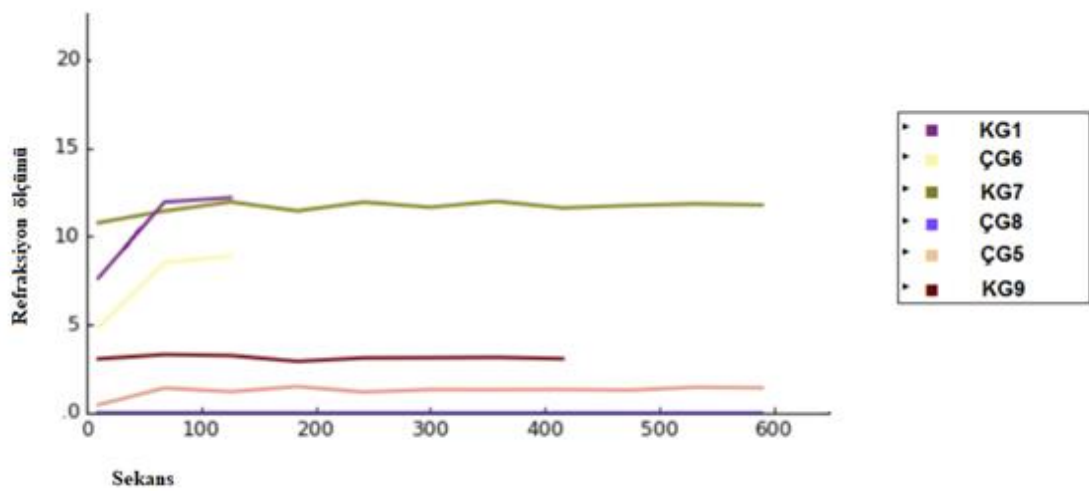


Şekil 4.4. Bakteri *cinslerine* göre Bray- Curtis beta çeşitlilik koordinatlar analizi (ÇG: Açıklanamayan infertilite hastalarını içeren çalışma grubu, KG: Kontrol grubu).

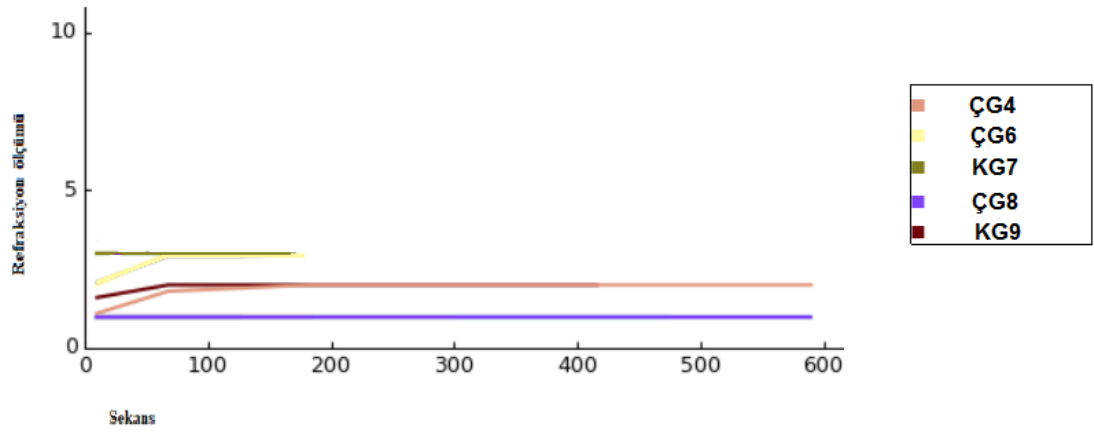


Şekil 4.5. Bakteri türlerine göre Bray- Curtis beta çeşitlilik koordinatlar analizi (ÇG: Açıklanamayan infertilite hastalarını içeren çalışma grubu, KG: Kontrol grubu).

Örneklerin içerdiği bakteriyel çeşitlilik ve tür sayısını değerlendirmek için iki alfa çeşitlilik yöntemi kullanıldı. Bu kapsamda Shannon çeşitlilik analizi ve Chao-1 indeksleri Şekil 4.6 ve 4.7 de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Bakteri cinslerine göre Shannon Çeşitlilik Analizi.



Şekil 4.7. Bakteri *cinslerine* göre Chao1 indeksi.

5. TARTIŞMA

Bakterilerin immüneyi etkilediği, disbiyozis sonucu çeşitli vücut bölgelerinin mikrobiyota profillerinde değişiklikler olduğu ve bu nedenle de mikrobiyotanın çeşitli hastalıklara yol açabildiği son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (3, 107). Nitekim klinik pratikte vajen ve serviksin aksine uterus steril kabul edilirken geliştirilen yeni moleküler yöntemler sonucunda uterin kavitenin bir mikrobiyal profile sahip olduğunun gösterilmesi, mikrobiyota ve fekundabilite arasındaki ilişkiyi tartışılır kılmıştır. Bu kapsamda infertil çiftlerde bozulmuş endometriyal mikrobiyom ortamı potansiyel olarak hastaların bir kısmında açıklayıcı bir sebep olarak düşünülebilir. Biz bu çalışmamızda literatürde ilk kez açıklanamayan infertilite hastaları ile fertil hastaların endometriyal mikrobiyotasında farklılıklar olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sistematik bir değerlendirme sonrası açıklanamayan infertilite tanısı alan hastaların mikrobiyota dağılımı son iki yılda gebelik yaşamış fertil kontrol grubuna göre benzer saptanmıştır.

Endometriyal mikrobiyom ve genel olarak infertilite ilişkisine dair literatürde yedi adet çalışma vardır. İlk çalışmada Frasnjak ve arkadaşları tek, öploid embriyo transferi yapılan yaşları 22 ile 43 arasında değerşen farklı etnik kökenlere sahip 33 hastanın endometriyal mikrobiyotalarını transfer kataterlerinin en distal 5 mm lik parçalarını 16s rRNA sekanslama yöntemi ile değerlendirilerek bakteriyel cins ve tür sınıflaması yapmıştır (108). Bu hastalar gebelik sonuçlarına göre iki gruba ayrılmıştır. Gebelik elde edilen (n= 18) ve edilmeyen (n= 15) gruplarda endometriyal mikrobiyota dağılımı arasında anlamlı bir farklılık bulunmamış olsa da örneklerdeki bakterilerin büyük çoğunluğunu *Flavobacterium* ve *Lactobasillerin* oluşturduğu bulunmuştur. İki grup arasında örnekler transfer katateri ile alındığı için elde edilen spesmenin miktarının az oluşu ve hastalar arasındaki demografik özelliklerin belirtilmemesi çalışmanın kısıtlılıklarından biridir. Bizim çalışmamızda da Frasnjak ve arkadaşlarının bulgularını destekler şekilde fertil ve infertil gruplar arası anlamlı bir farklılık elde edilememiştir.

Moreno ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bir diğer çalışmada endometriyal mikrobiyotanın reproduktif etkilerini değerlendirmek için yaşları 25 - 40 arasında değerşen 35 IVF hastasının ERA testi öncesinde endometriyal sıvı örnekleri toplanarak 16s rRNA sekanslama yöntemi ile değerlendirilmiştir (6). Otuz beş

örnekten üç tanesi yetersiz DNA saptanması nedeni ile çalışma dışı bırakılmıştır. Transfer yapılan hastaların hepsinin reseptif endometriuma sahip olduğu ERA ile doğrulanmıştır. Bu hastaların endometriyal mikrobiyotası *Lactobasillus* dominant (LD, >% 90) ve non *Lactobasillus* dominant (NLD) olarak iki gruba ayrılmıştır. Değerlendirmeye alınan 32 hastanın 17'si LD, 15'i NLD olarak bulunmuştur. İki grup arasında transfer başına canlı doğum oranı, transfer başına gebelik oranı ve transfer başına implantasyon oranları arasında LD grup lehine anlamlı fark bulunmuştur. NLD grupta *Gardrenella* ve *Streptococcus* cinslerinin öne çıktığı hastalarda implantasyon başarısızlığı ve negatif gebelik sonuçları açısından daha belirgin farklılıklar saptanmış ancak örneklem sayısının az olması nedeni ile istatistiksel fark değerlendirilmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları endometriyal mikrobiyotanın implantasyon ve konsepsiyon üzerine etkilerine yönelik düşüncelerin tekrar alevlenmesine yol açmıştır.

Wee ve arkadaşlarının çalışmasında çeşitli nedenlerle histeroskopi yapılan 16 infertil ve 15 fertil kadın hastanın üç farklı reproduktif bölgelerinden (vajina, serviks, endometrium) alınan örneklerin mikrobiyotaları 16s rRNA sekanslama yöntemi ile karşılaştırılmıştır (109). Endometriyal örneklerdeki bakteri yükünün diğer bölgeler ile karşılaştırıldığında belirgin miktarda düşük olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeninin dokuya özel olarak DNA ekstraksiyonunda yaşanan zorluklar olabileceğine de değinilmiştir. Yine örnek toplama işlemi diğer çalışmalarla uyumlu olarak endometriyal küret ile transservikal olarak gerçekleştirildiği için kontaminasyon ihtimalinin elimine edilemeyeceği belirtilmiştir. Örneklenen tüm bölgelerde *Lactobasillus* türlerinin dominansı göze çarpmış olsa da çalışmanın yapıldığı dönemde hastaların infertilite sürecinde olmamaları, gruplar arasında yaş farkının istatistiksel olarak anlamlı oluşu, VKİ, etnik köken, işlem öncesi kullanılan hormon preparatları gibi parametrelerin değerlendirilmemesi çalışmanın en önemli kısıtlılığını oluşturmaktadır. Çalışmada endometriyal mikrobiyotanın açıklanamayan infertilite ve tekrarlayan IVF başarısızlığında önemli bir role sahip olabileceği speküle edilmiştir (109).

Tao ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı tanımlayıcı çalışmada 22-40 yaş aralığındaki farklı etnik kökenleri sahip 70 IVF hastasının embriyo transfer kataterleri değerlendirilmiştir. Çalışmada endometriyal bakteri yükünün düşük olması nedeni ile mikrobiyota profili oluşturulmasının zorluğundan bahsedilmiştir. 70 hastanın 33'ünde

Lactobasillus cinsi %90 üzerinde saptanırken, 50 hastada %70 ve üzerinde saptanmıştır. Örneklerde vajinal mikrobiyom üyelerinden olduğu bilinen *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* bakteri cinslerinin türleri farklı oranlarda saptanmıştır (110). Bizim çalışmamızda da bu çalışma ile uyumlu olarak *Lactobasillus* dışında görülen bakteri cinsleri vajinal mikrobiyota elemanlarıyla uyumluluk göstermiş olup görülen cinsler *Olsenella*, *Atopobium*, *Streptococcus*, *Brevibacterium* ve *Veillonella* olarak tespit edilmiştir.

Kyono ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada ise 109 hastanın (79 tane IVF, 23 tan IVF dışı infertil hasta ve 7 tane sağlıklı gönüllü) endometriyal ve vajinal mikrobiyotaları karşılaştırılmıştır. Örnek toplama zamanları foliküler dönem, ovulasyon dönemi ve luteal dönem olarak belirtilmiştir. Hastalar LD (> %90) ve NLD olarak değerlendirilmiştir. IVF hastalarındaki LD endometriyumun sağlıklı gönüllülere göre anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmüştür (%38.0'e karşı %85.7). Bununla beraber sağlıklı gönüllüler, IVF hastaları ve IVF dışı tedavi alan hastalar olarak kategorize edilen 3 grubun median *Lactobasillus* yüzdeleri arasında anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Çalışmada IVF hastalarının endometriyal mikrobiyotasındaki *Lactobasillus* dışı bakterilerin yoğunluğu ile ilgili uzun infertilite periyodu, IVF prosedürleri (oosit toplama, embriyo transferi, aralıklı transvajinal ultrasonografi), ovaryan stimülasyon nedeni ile hormonal fluktuasyon, aralıklı antibiyoterapi ihtiyacı gibi etkenler speküle edilmiştir (111). Bizim çalışmamızda da açıklanamayan infertilite hastaları ve fertil hastaların endometriyal mikrobiyotalarında median *Lactobasillus* yüzdeleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark elde edilememiştir ve bu çalışma ile uyumlu sonuçlar mevcuttur.

Kiyata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 28 tekrarlayan implantasyon başarısızlığı hastası ile 18 ilk IVF denemesi başlanan hastanın endometriyal sıvı ve vajinal sekresyonlarının mikrobiyotaları karşılaştırılmıştır. Örnekler 3 mm'lik endometriyal küretler ile proliferatif fazda toplanmıştır. Endometriyal mikrobiyota örneklerinin büyük çoğunluğunu *Lactobasillus* cinsi bakterilerin oluşturduğu belirtilmiştir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı grubundaki hastaların %64.3'ünde, ilk IVF denemesi olan hastaların ise % 38.9'unda LD örnekler saptanmış ancak aralarında istatistiksel farklılık bulunmamıştır (112). Bu çalışmada hem

endometriyal sıvı hem de vajinal sekresyonların tür dağılımlarının benzer olduğu saptanmıştır.

Yukarıda özetlenen çalışmalardan fark edileceği üzere endometriyal örneklemelerin bir kısmı endometriyal sıvı aspirasyonu bir kısmı da bizzat endometriyal doku tedarik edilmesi şeklinde yapılmıştır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan 25 hastanın hem endometriyal sıvı hem de endometriyal doku örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada çeşitlilik ve OTU başına okuma sekansı endometriyal doku örneklerinde endometriyal sıvı örneklerine göre daha yoğun olarak saptanmıştır (91). Bu sonuçlar ideal örnekleme yönteminin endometriyal yüzeysel sıvı yerine bizzat endometriyal doku olması gerekebileceğine işaret etmekte ve bu konuda en uygun yöntemin tayini için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Biz de çalışmamızda bu bulguları göz önünde bulundurarak endometriyal doku örneğinin pipelle kanül ile alınmasını tercih ettik.

Endometriyal mikrobiyota çalışmalarında endometriyum gibi düşük biyokütleyle sahip olan bir dokudan örnek alınırken serviko-vajinal kontaminasyon ihtimalinin dışlanamayacağı speküle edilebilir (7, 110). Örneğin transservikal örnekleme yapılan çalışmaların çoğunluğunda *Lactobasillus* türleri dominant bulunmuştur. Verstraelen ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise yaşları 25 - 39 arasında değişen tekrarlayan gebelik kaybı ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan 19 hastadan histeroskopi öncesinde servikovajinal kontaminasyonu engelleme amacı ile koruyucu kılıfı olan endometriyal bir fırça yardımıyla örnekleme yapılmış ve endometriyal mikrobiyotaları 16s rRNA sekanslama ile değerlendirilmiştir (104). Diğer çalışmalardan farklı olarak hastaların büyük çoğunluğunda *Bacteroides* türleri baskın olarak izlenmiştir. Bununla beraber dört hastada sadece *Lactobasillus* türüne ait bakteriler saptanmıştır. Her ne kadar bu çalışmada transservikal yöntemlerde yapılan çalışmalardan farklı olarak baskın bir tür saptansa da örnek sayısının azlığı, kontrol grubunun olmayışı ve hasta popülasyonunun spesifik bir grubu içermesi çalışmadaki kısıtlılıklardır (104).

Kontaminasyonun endometriyal mikrobiyotanın değerlendirilmesindeki gölgeleyici etkisini aydınlatma adına Miles ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada on hastaya ait histerektomi materyalleri kullanılmıştır. Vajino-servikal kontaminasyonun teorik olarak en aza indirildiği bu yöntemde endometriyal

örneklerde yine de *Lactobasillus*, *Acinetobacter* ve *Cornebacterium* türleri saptanmıştır (113). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer histerektomi çalışmasında vajen, serviks ve endometrium örneklerinin bakteriyel yükü de çalışmaya eklenmiş ve reproduktif yolun yukarılarına doğru çıkıldıkça mikroorganizma sayısının belirgin olarak azaldığı ama halen saptanabilir olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada yine *Lactobasillus* baskın cins olarak değerlendirilmiş (%30.6) ancak *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinin de endometriyal mikrobiyotanın içeriğinde bulunduğu saptanmıştır (101).

Kontaminasyon kaynaklı olmadığı gösterilen endometriyal mikrobiyotanın varlığı aslında endoserviksin bariyer fonksiyonunun anatomik ve hücresel seviyede steriliteyi sağlayacak kadar başarılı olmadığını düşündürebilir (114, 115). Nitekim bir başka çalışmada gebelik döneminde önemli bir bariyer görevi gördüğü düşünülen endoservikal mukusun vajenden asendan yol ile bakteri geçişine izin verebildiği gösterilmiştir (116). Romero ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir çalışmada alt genital kanalda bulunan mikroorganizmalara uzun süre maruziyetin ve sperm tarafından sıklıkla istila edilen bir mukozanın bakteri ve endotoksinleri içermeyeceğini düşünmenin güç olduğu belirtilmiştir (117).

Endometriyal mikrobiyota çalışmalarında farklı bakteri türlerinin baskınlığının saptanması tüm sağlıklı kadınlarda tek tip bir mikrobiyota profilinin olmadığını düşündürmektedir. Her ne kadar intestinal mikrobiyotadaki farklılıkların yaş, VKİ ve etnik köken ile değişiklik gösterdiği çalışmalarda ifade edilmiş olsa da endometriyal mikrobiyotanın hangi faktörlerden etkilendiği net olarak bilinmemektedir ve bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (118, 119). Çalışma grubu ve kontrol grubu arasında demografik nedenler ile ilişkilendirilebilecek potansiyel endometriyal mikrobiyota farklılıklarını minimize etme amacı ile bizim çalışmamızda benzer demografik özellikler içeren bireyler dahil edilmeye özen gösterilmiştir. Çalışmamızın en güçlü taraflarından olan standardizasyonu sağlamak adına tüm hastalardan örnekler menstrüel siklusun sekretuar fazında alınmış ve son bir ay içerisinde antibiyotik kullanımı, oral kontraseptif kullanımı ve yardımcı üreme tekniklerini içeren hormonal tedavi açısından sorgulanmışlardır.

Açıklanamayan infertil hasta grubundaki endometriyal mikrobiyotanın fertil grupla karşılaştırıldığı literatürdeki bu ilk çalışmanın en önemli kısıtlayıcı basamağı

hasta sayısının sınırlı olmasıdır. İkinci kısıtlayıcı basamak ise endometriyal örneklerdeki bakteri miktarının kütüphane hazırlığı aşamasında yapılan bakteriyel yük ölçümlerinde düşük olarak bulunmasıdır. Bununla beraber endometriyal mikrobiyom çalışmalarında baskın bakteri türlerinin yanı sıra bakteriyel profilin de birbirlerine göre farklılık göstermesi temel bir uterin mikrobiyotanın varlığını sorgulamaktadır.

6. SONUÇ

Çalışmamız açıklanmayan infertilite hastalarının endometriyal mikrobiyotasını kontrol grubu ile karşılaştıran ilk klinik çalışmadır. Çalışma sonuçlarına göre infertil ve fertil hastaların endometriyal mikrobiyotaları arasında anlamlı fark görülmemiştir. Endometriyal doku örneklerinde diğer çalışmalarla uyumlu olarak düşük bakteri yükü olduğu saptanmıştır. Endometriyal disbiyozisin reproduktif etkilerinin araştırılması için yüksek örneklem grubu içeren daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak yine de, önceki çalışmalardan farklı olarak 16s rRNA sekanslama yöntemi ile daha kısıtlı bir bakteri çeşitliliği saptanmış olsa da mevcut bulgular steril endometriyum paradigmasının terkedilmesi gerektiğini bir kez daha desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Guzick DS, Grefenstette I, Baffone K, Berga SL, Krasnow JS, Stovall DW, et al. Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1994;9(12):2306-10.
2. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome research*. 2009;19(12):2317-23.
3. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336(6086):1268-73.
4. Buggio L, Somigliana E, Borghi A, Vercellini P. Probiotics and vaginal microecology: fact or fancy? *BMC women's health*. 2019;19(1):25.
5. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertility and sterility*. 2017;108(1):32-9.
6. Moreno I, Codoner FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazan J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(6):684-703.
7. Benner M, Ferwerda G, Joosten I, van der Molen RG. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human reproduction update*. 2018;24(4):393-415.
8. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 2012;9(12):e1001356.
9. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):63.
10. Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Human reproduction update*. 2012;18(1):29-43.

11. Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Human reproduction*. 2002;17(5):1399-403.
12. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*. 2007;22(6):1506-12.
13. Steiner AZ, Jukic AM. Impact of female age and nulligravidity on fecundity in an older reproductive age cohort. *Fertility and sterility*. 2016;105(6):1584-8.e1.
14. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2007;18(2):58-65.
15. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ (Clinical research ed)*. 1991;302(6789):1361-5.
16. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Human reproduction*. 2003;18(9):1959-66.
17. Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. *Journal of the American Medical Association*. 1956;161(9):855-60.
18. Fritz MA. The modern infertility evaluation. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2012;55(3):692-705.
19. McLaren JF. Infertility evaluation. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2012;39(4):453-63.
20. Marc A. Fritz LS. Fritz, M. A. (2011). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility: Marc A. Fritz, Leon Speroff (8th ed.)*. . 8th edition ed: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.; 2011.
21. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2015;103(6):e44-50.

22. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*. 2010;16(3):231-45.
23. Wathen NC, Perry L, Lilford RJ, Chard T. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1984;288(6410):7-9.
24. Roos J, Johnson S, Weddell S, Godehardt E, Schiffner J, Freundl G, et al. Monitoring the menstrual cycle: Comparison of urinary and serum reproductive hormones referenced to true ovulation. *The European journal of contraception & reproductive health care : the official journal of the European Society of Contraception*. 2015;20(6):438-50.
25. Kerin J. Ovulation detection in the human. *Clinical reproduction and fertility*. 1982;1(1):27-54.
26. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertility and sterility*. 2014;101(3):633-4.
27. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*. 1996;17(2):121-55.
28. Garcia D, Brazal S, Rodriguez A, Prat A, Vassena R. Knowledge of age-related fertility decline in women: A systematic review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2018;230:109-18.
29. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2017;217(2):129-40.
30. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human reproduction update*. 2006;12(6):685-718.
31. Esposito MA, Coutifaris C, Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2002;17(1):118-23.

32. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertility and sterility*. 2009;91(3):705-14.
33. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Human reproduction update*. 2013;19(1):26-36.
34. Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder--a plea for universal definitions. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(12):1709-12.
35. Swart P, Mol BW, van der Veen F, van Beurden M, Redekop WK, Bossuyt PM. The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 1995;64(3):486-91.
36. Mol BW, Swart P, Bossuyt PM, van der Veen F. Is hysterosalpingography an important tool in predicting fertility outcome? *Fertility and sterility*. 1997;67(4):663-9.
37. Hauge K, Flo K, Riedhart M, Granberg S. Can ultrasound-based investigations replace laparoscopy and hysteroscopy in infertility? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2000;92(1):167-70.
38. Luciano DE, Exacoustos C, Luciano AA. Contrast ultrasonography for tubal patency. *Journal of minimally invasive gynecology*. 2014;21(6):994-8.
39. Soares SR, Barbosa dos Reis MM, Camargos AF. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertility and sterility*. 2000;73(2):406-11.
40. Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2015;103(4):e27-32.
41. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1333-43.

42. Kamath MS, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012;26(6):729-38.
43. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human reproduction*. 2008;23(3):538-42.
44. Fisch P, Casper RF, Brown SE, Wrixon W, Collins JA, Reid RL, et al. Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin. *Fertility and sterility*. 1989;51(5):828-33.
45. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG, Habbema JD, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, et al. Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9531):216-21.
46. Donderwinkel PF, van der Vaart H, Wolters VM, Simons AH, Kroon G, Heineman MJ. Treatment of patients with long-standing unexplained subfertility with in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2000;73(2):334-7.
47. Evers JL, de Haas HW, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Treatment-independent pregnancy rate in patients with severe reproductive disorders. *Human reproduction*. 1998;13(5):1206-9.
48. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Human reproduction*. 2006;21(8):1951-5.
49. Blacker CM, Ginsburg KA, Leach RE, Randolph J, Moghissi KS. Unexplained infertility: evaluation of the luteal phase; results of the National Center for Infertility Research at Michigan. *Fertility and sterility*. 1997;67(3):437-42.
50. Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *The New England journal of medicine*. 1999;340(3):177-83.

51. Pandian Z, Bhattacharya S, Vale L, Templeton A. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. The Cochrane database of systematic reviews. 2005(2):Cd003357.
52. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and sterility*. 2011;96(3):522-9.
53. Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *The American journal of anatomy*. 1956;98(3):435-93.
54. Park SJ, Goldsmith LT, Skurnick JH, Wojtczuk A, Weiss G. Characteristics of the urinary luteinizing hormone surge in young ovulatory women. *Fertility and sterility*. 2007;88(3):684-90.
55. Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martinez-Conejero JA, Alama P, et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertility and sterility*. 2013;99(2):508-17.
56. Edwards RG. Human uterine endocrinology and the implantation window. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;541:445-54.
57. Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and sterility*. 2011;95(1):50-60, e1-15.
58. Custers IM, van Rumste MM, van der Steeg JW, van Wely M, Hompes PG, Bossuyt P, et al. Long-term outcome in couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis initially randomized between expectant management and immediate treatment. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(2):444-50.
59. Barbieri RL. The initial fertility consultation: recommendations concerning cigarette smoking, body mass index, and alcohol and caffeine consumption. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;185(5):1168-73.

60. Bhattacharya S, Harrild K, Mollison J, Wordsworth S, Tay C, Harrold A, et al. Clomifene citrate or unstimulated intrauterine insemination compared with expectant management for unexplained infertility: pragmatic randomised controlled trial. *BMJ (Clinical research ed)*. 2008;337:a716.
61. Hughes E, Brown J, Collins JJ, Vanderkerchove P. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010(1):Cd000057.
62. Liu A, Zheng C, Lang J, Chen W. Letrozole versus clomiphene citrate for unexplained infertility: a systematic review and meta-analysis. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2014;40(5):1205-16.
63. Farquhar CM, Liu E, Armstrong S, Arroll N, Lensen S, Brown J. Intrauterine insemination with ovarian stimulation versus expectant management for unexplained infertility (TUI): a pragmatic, open-label, randomised, controlled, two-centre trial. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10119):441-50.
64. Tjon-Kon-Fat RI, Bendsorp AJ, Bossuyt PM, Koks C, Oosterhuis GJ, Hoek A, et al. Is IVF-served two different ways-more cost-effective than IUI with controlled ovarian hyperstimulation? *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(10):2331-9.
65. Diamond MP, Legro RS, Coutifaris C, Alvero R, Robinson RD, Casson P, et al. Letrozole, Gonadotropin, or Clomiphene for Unexplained Infertility. *The New England journal of medicine*. 2015;373(13):1230-40.
66. Gürsoy NC, Otlu BJJ, Research SH. Molecular Diagnostic Tests in Microbiota Investigations. 2017;1:56-67.
67. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31.
68. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
69. Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and Its Discontents. *mBio*. 2017;8(5).

70. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
71. Harmsen HJ, de Goffau MC. The Human Gut Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;902:95-108.
72. Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European journal of clinical nutrition*. 2012;66(1):53-60.
73. Cammarota G, Ianiro G, Cianci R, Bibbo S, Gasbarrini A, Curro D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;149:191-212.
74. Serban DE. Microbiota in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis and Therapy: Is It All About Diet? *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2015;30(6):760-79.
75. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(43):16079-94.
76. Ipci K, Altintoprak N, Muluk NB, Senturk M, Cingi C. The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2017;274(2):617-26.
77. Pope JL, Tomkovich S, Yang Y, Jobin C. Microbiota as a mediator of cancer progression and therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2017;179:139-54.
78. Munoz-Garach A, Diaz-Perdigones C, Tinahones FJ. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*. 2016;63(10):560-8.

79. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(3):537-42.
80. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(22):7952-7.
81. Schloss PD. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS computational biology*. 2010;6(7):e1000844.
82. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*. 2003;55(3):541-55.
83. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(4):840-62, table of contents.
84. Borsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic science international Genetics*. 2015;18:78-89.
85. Tsilimigras MC, Fodor AA. Compositional data analysis of the microbiome: fundamentals, tools, and challenges. *Annals of epidemiology*. 2016;26(5):330-5.
86. Sirota I, Zarek SM, Segars JH. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Seminars in reproductive medicine*. 2014;32(1):35-42.
87. Geva-Zatorsky N, Sefik E, Kua L, Pasmán L, Tan TG, Ortiz-Lopez A, et al. Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell*. 2017;168(5):928-43.e11.
88. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;902:83-93.
89. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial

- microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):11971-5.
90. Sirichoat A, Buppasiri P, Engchanil C, Namwat W, Faksri K, Sankuntaw N, et al. Characterization of vaginal microbiota in Thai women. *PeerJ*. 2018;6:e5977.
 91. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *The Journal of physiology*. 2017;595(2):451-63.
 92. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. 2011;108(Supplement 1):4680-7.
 93. Garcia-Velasco JA, Menabrito M, Catalan IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reproductive biomedicine online*. 2017;35(1):103-12.
 94. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertility and sterility*. 2018;110(3):327-36.
 95. Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, et al. The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2018;125(3):309-15.
 96. Bracewell-Milnes T, Saso S, Nikolaou D, Norman-Taylor J, Johnson M, Thum MY. Investigating the effect of an abnormal cervico-vaginal and endometrial microbiome on assisted reproductive technologies: A systematic review. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2018;80(5):e13037.
 97. Kwasniewski W, Wolun-Cholewa M, Kotarski J, Warchol W, Kuzma D, Kwasniewska A, et al. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncology letters*. 2018;16(6):7035-47.
 98. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014;2(1):4.

99. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol.* 2013;11(8):e1001631.
100. Perez-Munoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017;5(1):48.
101. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature communications.* 2017;8(1):875.
102. Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertility and sterility.* 2015;104(6):1351-7.
103. Viniker DA. Hypothesis on the role of sub-clinical bacteria of the endometrium (bacteria endometrialis) in gynaecological and obstetric enigmas. *Human reproduction update.* 1999;5(4):373-85.
104. Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ.* 2016;4:e1602.
105. Franasiak JM, Scott RT. Endometrial microbiome. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2017;29(3):146-52.
106. Power ML, Quaglieri C, Schulkin J. Reproductive Microbiomes: A New Thread in the Microbial Network. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif). 2017;24(11):1482-92.
107. Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ (Clinical research ed).* 2017;356:j831.
108. Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, Tao X, Landis J, Zhan Y, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2016;33(1):129-36.

109. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 2018;58(3):341-8.
110. Tao X, Franasiak JM, Zhan Y, Scott III RT, Rajchel J, Bedard J, et al. Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene. 2017;3:15-21.
111. Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reproductive medicine and biology*. 2018;17(3):297-306.
112. Kitaya K, Nagai Y, Arai W, Sakuraba Y, Ishikawa T. Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure. *Mediators of inflammation*. 2019;2019:4893437.
113. Miles SM, Hardy BL, Merrell DS. Investigation of the microbiota of the reproductive tract in women undergoing a total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. *Fertility and sterility*. 2017;107(3):813-20.e1.
114. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of reproductive immunology*. 2002;57(1-2):61-79.
115. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*. 2008;1(3):183-97.
116. Hansen LK, Becher N, Bastholm S, Glavind J, Ramsing M, Kim CJ, et al. The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2014;93(1):102-8.

117. Romero R, Espinoza J, Mazor M. Can endometrial infection/inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization? *Fertility and sterility*. 2004;82(4):799-804.
118. Clark LH, Keku TO, Mccoy NA, Hawkins G, Bae-Jump VL, Brewster WR. Alterations in the uterine microbiome in patients with early endometrial cancer: Variations by ethnicity and obesity. *American Society of Clinical Oncology*; 2017.
119. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Frontiers in immunology*. 2018;9:208.