

# **Orijinal Başlık: A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies**

**Yazarlar: N.Gleicher, A. Kim, T. Michaeli, H-J. Lee, A. Shohat-Tal, E. Lazzaroni, and D.H.Barad**

**Dergi :** Human Reproduction 2013 January Vol 28(1): pg 172-177.

**Kısa Özet:** Bu çalışmada standart tedavilere yanıtız ince endometrium granülosit koloni stimulan (G-CSF) faktörün intrauterin perfüzyonuyla geliştirilebilir mi surusunun yanıt aranmıştır. GCSF perfüzyonu ve embriyo transferi sonrasında ortalama 5.2±1.9 gün içerisinde, endometrial kalınlık 6.4±1.4'ten 9.3±2.1mm yükselmiştir (p<0.001). Δ değişim 2.9±2.0 mm'di ve konsepsiyon ile konsepsiyon olmayan sikluslar arasında fark saptanmamıştır. Bir ektopik gebelik olgusu dışlandığında, klinik gebelik oranı %19.1 olarak saptanmıştır. Bu pilot çalışma, kronik ince endometriumda G-CSF uygulamasını desteklemektedir ve bu tedavi ile klinik gebelik oranlarının, ters etkilenmiş hastalarda az da olsa artış gösterdiği ileri sürülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELER:** İVF/ince endometrium/ granülosit koloni stimulan faktör/klinik gebelik oranı/ azalmış over rezervi

## **Giriş**

IVF sikluslarında, standart tedavilere dirençli kronik ince endometrium az sayıda hastayı etkilemektedir. Ancak, bu problem önemli bir durumdur; çünkü endometrial kalınlık 7mm'in altında olduğunda, transfer sub-optimal olarak kabul edilir ve gebelik şansı azalır (Casper,2011;Singh et al. 2011:Revel 2012).

Zaman izin verdiği sürece uzatılmış östrojen uygulaması (Chen et al.2006), düşük doz aspirin tedavisi ( Weckstein et al, 1997) ve pentoksifilin ve tokoferol tedavisi ( Ledee-Bataille et al 2002), vajinal sildenafil ( Sher and Fisch, 2002) uygulamasını içeren çeşitli iyileştirmeler teklif edilmiştir. Buna rağmen, bu iyileştirmelerle, küçük bir grup kadın yanıtız kalmaya devam etmiştir.

Standart tedavilere yanıtız kalan hasta prevelansı bilinmemektedir, fakat bizim deneyimize göre, IVF hastalarının <1%'nden azdır. Ne var ki, kronik ince endometrium, bu gibi hastalara ve bu hastaları tedavi eden klinisyenlere siklus iptali, planlanmamış embriyo krioprezervasyon ve en uç vakalarda gestasyonel taşıyıcı kullanımı gibi önemli ve zorlu tedavi seçenekleri sunar.

Biz, daha önce standart tedaviyle endometrial kalınlığın 7mm'in üzerine ulaşmadığı dört IVF siklusumuzda , başarılı granülosit koloni stimülan faktör (G-CSF) kullanımını bildirmiştik ( Gleicher et al.,2011). Bu başlangıç deneyimi, merkezimizde iki prospektif randomize kontrollü çalışmayı başlatmamızı sağlamıştır.

G-CSF tedavisi uygulanan bildirdiğimiz ilk dört hastada, tüm kadınlar gebe kalmıştır ( bir tanesi intramural ektopik gebelik). Bu nedenle, ilk denemede (NCT 1202656), G-CSF'nin endometrial perfüzyonunun, endometrial kalınlıktan bağımsız olarak, rutin IVF sikluslarında gebelik oranlarına etkisini araştırmaya karar verdik. Bu çalışma halen devam etmekte ve hedeflenenin siklusların yaklaşık dörtte üçü tamamlanmıştır.

İkinci klinik çalışmada (NCT 01202643), standart tedavilere dirençli ince endometriumda, endometrial G-CSF perfüzyonunun ne derecede endometrial kalınlaşma sağladığını prospektif randomize olarak incelemek planlanmıştır. Bu çalışma da halen devam etmektedir; fakat devam etmesinden dolayı sonuçlar yakın gelecekte tamamlanamayacaktır.

Bu nedenle, geçici basamak olarak, burada 21 IVF siklusunda yukarıda bildirilen vakalar dışında (katılmayı reddettikleri için veya çalışmanın kriterlerini karşılamadıkları için), G-CSF ile tedavi edilmiş kronik ince endometriuma sahip hastalar bildirilmiştir.

## **Materyal-Metod**

Bu çalışmada; merkezimizdeki 21 IVF siklusu hastasını bildiriyoruz. Bütün kadınlar, hCG ile ovülasyon indüksiyonu gününde ultrason ile değerlendirildi ve endometrial kalınlık oral ve vajinal etinil östradiol (E2;2mg, günde iki kez ve 1 mg vajinal/günde 3 kez) ve sildenafil sitrata ( Viagra 25mg vajinal/günde 4kez, Pfizer Inc, New York, NY, USA) rağmen 7mm'nin altındaydı.

Çalışma zamanında; daha önce de belirttiğimiz gibi iki prospektif randomize kontrollü çalışma merkezimizde devam etmekteydi. (Clinical Trials.gov ID NCT01202643 ve Clinical Trials. Gov ID NCT01202656). Bu çalışmalardaki hastalar, çalışmaya katılmayı kabul etmedikleri için veya ikinci çalışmaya uygun kriterleri karşılamadıkları için dahil edilmemişlerdir. Bu nedenle, bu hastalara aşağıdaki seçenekler sunulmuştur: (i) klinik çalışmaya katılma ( detaylar için materyal metoda bakın); (ii) IVF siklus iptali (iii) yetersiz düzeyde olan ince endometriuma embriyo transferi (iv) önceden belirtilmiş olduğu gibi G-CSF'nin intrauterin infüzyonu. Bütün hastalar (iv)'ü seçmişlerdir.

Hastaların özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir: Merkezimizin hasta popülasyonu ile orantılı olarak;

ortalama yaş  $\pm$  SD 40.5 $\pm$ 6.6yıl; vücut kitle indeksi 23.6 $\pm$ 4.0 idi. Ortalama gravida 1.8 $\pm$ 2.1 (aralık 0-7) ve ortalama parite 0.4 $\pm$ 1.1 (aralık 0-4). Burada raporlanan sikluslar, merkezimizdeki ilk IVF sikluslarıydı; fakat vurgulanması gereken nokta bu hastaların başka merkezlerde daha önceden ortalama 2.0 $\pm$ 2.1 IVF siklusu geçirmiş olmalarıdır. En sık primer infertilite nedeni azalmış over rezerviydi, 16 kadında (%76.2) mevcuttu.

Tedaviye yanıtız ince endometrium tanısı, 10.000 IU hCG uygulama gününde konuldu. Hastaların kötü endometrial kalınlaşma durumu göz önünde bulundurulduğunda, ovulasyon indüksiyonu sadece tek bir folikül 19mm'ye ulaştığında bile gerçekleştirildi. Sabah yapılan ultrasondan sonra IVF siklusunda hCG uygulama kararı verildiğinde, endometriumu <7mm altında olan hastalarda daha önce belirtilen seçenekler sunuldu. G-CSF tedavisini seçen hastalarda, hCG'den 6-12 saat önce G-CSF (Neupogen, Filgastrim, Amgen Inc, Thousand Oaks, CA, USA) 30mU ( 300mcg/l ml) endometrial infüzyon tomcat katater ile uygulandı.

İnfüzyon daha önce anlatıldığı şekilde uygulandı (Gleicher et al., 2011). Özetle, ampülün içeriği 1ml insulin enjektörüne aspire edildi. Tomcat kateteri ile endometrial kaviteye girildi ve kateterden intrauterin inseminasyonda uygulandığı gibi enjektör içeriği kateter öne arkaya hareket ettirilerek yavaşça enjekte edildi. Enjeksiyonun tamamlanmasından sonra, enjektör kateterden ayrıldı, az miktarda hava aspire edildi, enjektör katetere tekrar bağlandı ve hava baloncuğu enjekte edildi ve böylece tomcat kateterdeki tüm G-CSF endometrial kaviteye ulaştırıldı.

İki gün sonra, oosit toplama sırasında, endometrial kalınlık ultrason ile tekrar değerlendirildi. Eğer bu noktada endometrial kalınlık hala 7mm'nin altında ise, ikinci doz aynı uygulama ile G-CSF oosit toplama işleminden sonra tekrar uygulandı. Bu 21 hastadan sadece 3'ünde (%14.3) gerekli oldu.

Son endometrial değerlendirme, embriyo transfer gününde gerçekleştirildi. ( genel olarak 3.gün) Endometrial kalınlık her zaman en kalın noktasından ölçüldü.

İstatistiksel analiz Statistical Package Social Sciences (SPSS) versiyon 18.0 (SPSS Inc., Chicago,IL, USA) kullanılarak yapıldı. Devamlı değişkenler ortalama ve SD olarak belirtildi ve t-test kullanıldı. P değeri <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

Daha önce de bahsedildiği gibi, bu çalışmadaki hastalar G-CSF ile etik kuru onayı alınmış olan çalışmalara dahil edilmemiştir. G-CSF infüzyonu kayıt dışı olarak hastalardan deneysel olarak tanımlanarak onay alınmıştır. Tüm hastalar, bilgilendirildi ve medikal kayıtların araştırma amaçlı kullanımı için hastalardan yazılı imzalı onam alındı. Tüm durumlar burada karşılandı.

## **Bulgular**

Bizim merkezimizde, embriyo transfer gününde endometrial kalınlık en az 7mm değil ise, embriyo transferi iptal edilmektedir ve tüm embriyolar krioprezervasyon ile korunmaktadır. Tüm hastalara transfer uygulanmıştır. Klinik gebelik oranı tedavi sikluslarında %19.1'di.

Konsepsiyon olan (n=4) ve konsepsiyon olmayan (n=17) gruplarda, tablo 1'de gösterilen hasta özelliklerinden hiçbirisi arasında farklılık görülmemiştir. Bu diğer gebelik başarısını etkileyen tanınmayan faktörlere katkıda bulunurken, küçük çalışma grubu tip 2 hataları engellemez.

Tablo 2 G-CSF perfüzyonu öncesi ve sonrasındaki endometrial bulguları özetlemektedir. Tablonun gösterdiği gibi, tüm hastalar için G-CSF uygulaması ve embriyo transferi arasındaki ortalama zaman  $5.2 \pm 1.9$  gündü. Gebe kalanlar ve gebelik oluşmayan grup arasında farklılık yoktu.

İlk infüzyon sırasında, endometrium kalınlığı  $6.4 \pm 1.4$ mm'di. Embriyo transferinde, endometrial kalınlık  $9.3 \pm 2.1$ mm'e ulaştı ( $p < 0.001$ ). Aynı zamanda, gebeliğe giden sikluslarda, ilk infüzyon zamanı ölçümle embriyo transfer zamanındaki ölçümler arasında anlamlı farklılık vardı. Gebelik oluşan grupta  $p = 0.034$  ve gebelik oluşmayan grupta  $p < 0.001$ . Tüm grup için endometrial kalınlıkta değişim  $2.9 \pm 2.0$ mm'di.

## **TARTIŞMA**

Küçük kohort boyutu ve kontrol grubunun eksikliğine rağmen şu anki veriler, G-CSF ile endometrial perfüzyonun E2 desteği ve viagra gibi geleneksel tedavilere kronik cevapsız ince endometriumun genişlemesinde etkili olabileceğini savunduğumuz başlangıç raporumuzu desteklemektedir.

Merkezimizdeki 21 kadındaki 21 tane IVF siklusunu sunarak, biz (ilk kez olarak) G-CSF tedavisi sonrasında endometrial kalınlıkta anlamlı bir gelişme olduğunu gösteren istatistiksel olarak sağlam bir veri sağlayabiliyoruz. Çalışma bir kontrol grubu içermediğinden, endometrium kalınlığının G-CSF perfüzyonu olmadan kalınlaştığı tartışılabilirdi. Fakat bu durum, Hcg'nin yapıldığı gün endometrium kalınlığı hala  $< 7$  mm ve endometrium kalınlığını arttırmak için yapılan E2 ve viagra gibi daha önce yapılan müdahaleler başarısız olduğu göz önünde bulundurulduğunda oldukça düşük bir olasılık olduğu düşünülür. Dahası elverişsiz ince endometrium nedeniyle önceki siklusların  $0.1 \pm 0.4$ 'ü (aralık 0-1) iptal edilmiştir.(tablo 1)

Bizim sonuçlarımızı değerlendirirken, sonuçların elde edildiği popülasyonu değerlendirmek çok önemlidir. Bu kadınlar ileri yaşadılar ( $40,5 \pm 6,6$  yıl), diğer merkezlerde önceki IVF'leri başarısız olmuştur ve vakaların %76,2'sinin fonksiyonel over rezervleri azalmıştır. Bu kadınlar

Hcg ile ovulasyon induksiyon seviyesine ulaşmakla beraber bu noktada tedaviye dirençli ince endometrium tanısı alırlar. Bu noktada seçenekler, hastanın merkezin kayıtlı muhtemel klinik çalışmaya katılmayı kabul etmesi, siklusun iptali, embrionun elverişsiz endometriuma(<7mm) transferi ya da (iv) merkezin önceki 4 hastaya dayanan tecrübesine dayanarak G-CSF kullanılmasıdır.(Gleicher et al. ,2011).

Çalışmaya katılan hastaların hiçbiri burada tasvir edilmemiştir ve seçilen 21 kişinin hepsi bilgilendirilerek rızaları alınmıştır.

Ortaya çıkan sonuçlar G-CSF 'nin nasıl bu kadar kısa zamanda endometrium kalınlığını arttırdığı sorusunu ortaya çıkarıyor. Başlangıçtaki çalışmamızda G-CSF uygulamasının 48. saatinde endometrium kalınlığında büyük bir artış tespit ettik.(Gleicher et al.,2011). Bu durum, 48. Saatte 7 mm 'lik endometrium kalınlığı minimal artan 3 hasta dışında bütün hastalarda doğrulandı. Bu 3 hasta minimal endometrium kalınlığına embriyo transfer gününde 2. infuzyondan sonra ulaştılar (3. gün). G-CSF 'nin bunu nasıl başardığı bilinmiyor. İlginç olarak G-CSF'nin endometrium üzerine olan etkileri çok az biliniyor. G-CSF büyüme hormonu ve sitokin fonksiyonları taşıyan bir glikoproteindir ve endotel, makrofaj ve diğer immunositlerden oluşan çeşitli doku ve hücrelerden salgılanır. SSS'de G-CSF sadece nörogenezi indüklemekle kalmaz aynı zamanda anti-apoptotik etkisi de vardır. (Schneider et al., 2005). Bu nedenle G-CSF nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabilecek terapötik bir ajan olarak da önerilmiştir.(Pitzer et al., 2008)

G-CSF'nin insan endometrial stromal hücrelerinin proliferasyonu ve diferansiasyonu üzerine etkilerini araştırırken (Tanaka et al.,2000) G-CSF'nin otokrin ve parakrin etkiyle insan endometrium hücrelerinin cAMP bağımlı desidualizasyonunu arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Bunu takip eden çalışmada, aynı araştırmacılar (Tanaka ve Umesaki, 2003)makrofaj koloni stimulan faktörün (M-CSF) 8-br-camp ile stimule olan değil ama stimule olmayan insan endometrial stromal hücrelerinden G-CSF salınımını arttırdığını gösterdiler. Fahey ve arkadaşları (2005) diğer kemokinler ve sitokinler ile birlikte G-CSF ve GM-CSF'lerin polarize epitel hücrelerin apikal bölgelerinden salındığını tespit ettiler.

Klinik üremede G-CSF implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşüklere bir tedavi seçeneği olarak önerilmiştir. (Scarpellini ve Sbracia, 2009;Würfel et al. 2010, Toth et al. 2011). Bu birbirinden oldukça farklı yararların nasıl kazanıldığı hala bilinmiyor. Varsayılan immunolojik süreçler burada gözlenen proliferatif etkiyi açıklamamaktadır. G-CSF ve GM-CSF reproduktif fonksiyonların geniş bir kısmına dahil gibi görünmektedir. Yanagi ve arkadaşları (2002) menstrüel siklus boyunca folliküler sıvı içinde G-CSF mRNA'sının siklik değişiklikler gösterdiğini tespit etmiştir. Salmassive arkadaşları (2004) insan luteinize granülosa hücreleri

içinde G-CSF ve onun reseptörünü göstermiştir. Foliküler sıvı içindeki G-CSF oosit kompedansını göstermede yararlı bir biomarkerdir.(Leede et al. 2011)

Temel araştırmadan, GM-CSF 'nin endometrium üzerine etkisi hakkında hafif daha fazla veri elde edilmiştir.(Zhao ve Chegini, 1999) Menstrüel siklus boyunca GM-CSF ve reseptörünün ekspresyonunun olmasının GM-CSF 'nin endometrium üzerine olan otokrin ve parakrin fonksiyonunu gösterdiğini söylemişlerdir. Chegini ve arkadaşları (1999) GM-CSF'nin endometrium üzerine mitojenik olmadığını, ama TGF-b1 ile birlikte, hem kendisinin hem de TGF -b nin ekspresyonunu arttırdığını tespit etmiştir. Farelerde GM-CSF'nin, erken gebelik boyunca uterin dentritik hücrelerde T-hücre regülasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. (Moldenhauer et al. 2010)

Embryo growth media ile GM-CSF ilavesinin embroyu blastokist aşamasına ilerlettiği iddia edilmiştir.(şjöblom et al. 1999). Bu uygulama Avrupa'da 2011'de ticari olarak uygun hale gelmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde de onay alması 2012'nin sonlarında beklenmektedir. Takasaki et al. (2008) düşük cevaplı olanlarda M-CSF 'nin insan menopozal gonadotropin ile kullanımının folikül gelişimini arttırdığını tespit etmiştir.

G-CSF, GM-CSF, M-CSF birbirinden farklıdır. G-CSF temelde kök hücreleri uyarır ve nötrofilik granülositlerde progenitor proliferasyonu uyarır. GM-CSF ise granülosit, eosinofil ve makrofajların proliferasyonu ve diferansiasyonunu uyarır. Fibroblastlara proliferatif etkisinden dolayı GM-CSF'nin, G-CSF 'den daha fazla endometrial kalınlığı arttırdığı söylenebilir. G-CSF'nin endometrial yapının hızlı proliferasyonunu nasıl sağladığı bilinmediği için GM-CSF ve M-CSF'nin potansiyel etkileri sadece tahmini olabilir.

Konu, kimsenin G-CSF ve sildenafil arasındaki muhtemel sinerjistik etkiyi ekarte edememesinden dolayı daha da karmaşık hale gelmektedir. G-CSF'nin endometrium üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması, bu endikasyonda kullanımı için güvenilirliğini büyük ölçüde arttıracaktır.

Burada bahsedilen hasta grubu, G-CSF ile endometrium perfüzyonunun geleneksel tedavilere dirençli ince endometriumun tedavisinde son çare olarak kullanılmasına daha fazla kanıt sağlamaktadır. Bu gözlem, daha büyük ve kapsamlı çalışmalarla doğrulanmalıdır. Tercihen prospektif randomize kontrollü çalışmalar gerekmektedir.

Çalışma, ek olarak bazı sorular ortaya çıkarmaktadır.G-CSF nasıl bu kadar kısa zamanda endometrium kalınlığını arttırmaktadır? Çalışmalarda dozajdan hiç bahsetmiyoruz, peki tedavi protokolu maksimal dozda mıdır? İlerlemenin mümkün olduğu varsayılmalıdır.

Önceden bilinen implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan düşük tedavilerinde G-CSF intrauterin yerine subkutan yoldan uygulanıyordu.(Scarpellini ve Sbracia, 2009;Würfel et al.

2010, Toth et al. 2011). Dahası bu çalışmalarda G-CSF daha uzun periyotlarda uygulandı. Daha sık uygulamanın daha iyi etkileri olacağı söylendi. Sonunda, çoktan bilindiği üzere, M-CSF ya da GM-CSF'nin daha etkin olabileceğini öne sürmek son derece cazip.gözükmektedir.

Hasta popülasyonumuzun yaş ortalamasını 40.5 olarak değerlendirir, kadınların %76,2'inde azalmış over rezervi tespit eder ve bunların endometrial karakteristiklerini de hesaba katarsak % 19,1 devam eden klinik gebelik oranı oldukça dikkate değer olarak düşünülmelidir. Bizim 2011 çalışmamızda çok benzer hasta popülasyonu içinde hepsi 41 yaşında olan kadınların devam eden gebelik oranı %25'di. Bizim verilerimiz açıkça başlangıçken, biz tedaviye dirençli kadınlarda G-CSF uygulanmasının potansiyel kadın fertilitelerini anlamlı derece artırdığını savunuyoruz. Genel infertil popülasyondaki spontan konsepsiyon oranı her ay için % 1 olarak değerlendirilirken, hasta popülasyonundaki gebelik şansının, burada da belirtildiği gibi, bu tahminin onda birinden fazla olmadığı varsayılabilir. 18 aylık periyot içinde, hastalar bu çalışma için yeniden toplandığında iyimser olarak spontan gebelik oranı en fazla % 3,6 olarak beklenebilir.

Bu gözlem bir kez daha G-CSF 'in endometrium gelişmesinin ötesinde IVF'e giden kadınların implantasyon ve gebelik oranlarını iyi yönde etkileyip etkilemeyeceği sorusunu öne sürüyor. Biz devam eden klinik çalışmamız tamamlanınca bu son soruya da yanıt verebilmeyi umuyoruz.

## **YAZARLARIN ROLÜ**

N.G. ve D.H.B. çalışmanın dizaynının her aşamasında, veri analizlerinde ve metnin yazılmasında, esere eşit oranda katkıda bulundu. N.G. metnin yazımında, D.H.B ise veri analizinde primer sorumluydu. Veri çıkartma ve primer analiz A.K. tarafından yapıldı. Kalan diğer yazarlar, laboratuvar ve klinik durum verilerine katkıda bulundu. Tüm yazarlar, metnin son halini onayladı.

## **FİNANSMAN**

Bu çalışma Foundation for Reproductive Medicine, New York, New York, USA tarafından desteklenmektedir.

## **TARTIŞMANIN İLGİ ALANI**

N.G. ve D.H.B. Foundation for Reproductive Medicine'nin üyeleridir. N.G., çalışmanın yapıldığı CHR-New York'un sahibidir.