

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

PROF. DR. MEHMET ÇOLAKOĞLU
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**TEKRARLAYAN İVF BAŞARISIZLIKLARINDA METİLEN
TETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ, FAKTÖR 5 LEİDEN VE
FAKTÖR 2 PROTROMBİN MUTASYONLARI
İNCELENEREK, TROMBOFİLİNİN İMPLANTASYON
BAŞARISI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
DR.AYNUR SİMUR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MEHMET ÇOLAKOĞLU

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	ii
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığında Etyoloji.....	2
1. Anne Yaşı, Over Rezervi	2
2. ART’de Oosit Faktörü ve IVF Başarısı	4
3. Uygulanan Ovaryan Stimulasyon Protokolleri	6
4. Luteal Faz Desteğinin Yapılması ve IVF Başarısı	7
5. Doğru Spermin Seçilmesi, Sperm Matüritesi DNA Fragmantasyonu	8
6. Azalmış Endometrial Reseptivite.....	10
7. Uterine Kavite Anormallikleri	13
8. Embryo Transfer Tekniği.....	15
9. Trombofili Nedenleri ve Homosistein Metabolizması ve İmplantasyon	16
MATERYAL VE METOD	21
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA.....	27
SONUÇ	31
ÖZET	32
SUMMARY.....	33
KAYNAKLAR	34
TEŞEKKÜR	39

KISALTMALAR

IVF	:	In vitro fertilizasyon
FSH	:	Folikül stimulan hormon
LH	:	Luteinizan hormon
E2	:	Östradiol
hCG	:	Human koryonik gonadotropin
ART	:	Asiste reproduktif teknik
ICSI	:	Intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF-ET	:	In vitro fertilizasyon ve embryo transferi
GIFT	:	Gamet intra fallopian transfer
ZIFT	:	Zigot intra fallopian transfer
TET	:	Tubal embryo transferi
OHSS	:	Ovaryan hiperstimulasyon sendromu
PCOS	:	Polikistik over sendromu
GnRH	:	Gonadotropin releasing hormon
MTHFR	:	Metilen tetrahidrofolat redüktaz
F5	:	Faktör 5
PTH 2	:	Protrombin 2
LIF	:	Lökosit inhibitör faktör
GM-CSF	:	Granülosit makrofaj koloni stimulan hormon
IL	:	Interlökin
CSF-1	:	Koloni stimulan hormon
EGF	:	Epidermal growth faktör
TGF-a	:	Transforming growth faktör alfa
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
HCY	:	Homosistein
TAE	:	Tris, Asetik asit, EDTA

GİRİŞ

İnfertilite, bir yıl süresince herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanmadan, düzenli cinsel ilişkiye rağmen, gebe kalamama olarak tanımlanmaktadır. Genç sağlıklı çiftlerin % 85–90 'ı, birinci yılın sonunda gebe kalabilmektedir. Yani infertilite toplumun % 10–15 'ini ilgilendiren bir problemdir.

Batı toplumlarında; cinsel yolla bulaşan hastalıklarda artma, evlilik zamanının geciktirilmesi, doğum kontrol yöntemlerinin yaygınlaşması ve sosyoekonomik şartlardaki değişiklikler, gebe kalma yaşının geciktirilmesine neden olmaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak infertilite insidansı giderek artmaktadır.

Günümüzde infertiliteye yönelik tedavilerde önemli gelişmeler olmuştur. Yardımcı üreme tekniklerinin gelişip yaygınlaşmasıyla, çocuk sahibi olması olanaksız görülen birçok çiftte başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

ART (Assiste Reprodüktif Teknik), özellikle açıklanamayan infertilite tedavisinde çığır açan ve her geçen gün daha da ilerleyen bir tekniktir. En sık kullanılan ART teknikleri IVF, ICSI, GIFT, ZİFT, TET dir. GIFT, ZİFT, TET daha invazif olmalarının yanısıra diğer tekniklerle karşılaştırıldığında çok da avantajlı değildir.

IVF, ART teknikleri arasında en sık uygulanandır. Ciddi tubal hastalık, ciddi endometriozis, ciddi erkek faktörü, multifaktöryel infertilite, ovaryan yetmezlik, yaşa bağlı ya da açıklanamayan infertilite olgularında gebelik şansını arttırır. IVF'te sperm sayısı <3 milyon, normal morfoloji <%4 ise prognoz kötüdür. Oligoastenospermi ve teratospermi de tercih edilen yöntem ICSI dir.

Embryonun implantasyonunu arttırmak üzerine, pek çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların çoğunluğu, kaliteli embryoların seçilmesi ve induksiyonu ile uterin reseptivitenin geliştirilmesine yöneliktir. Yakın dönem çalışmalarda implantasyon başarısını etkileyen faktörler arasında trombofilinin etkinliği de araştırılmıştır.

Biz çalışmamızda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda trombofilinin yerini ve önemini belirlemek amacıyla metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimi, protrombin 2 geni ve faktör 5 leiden mutasyonu sıklığını araştırdık.

GENEL BİLGİLER

TANIM:

Tekrarlayan in vitro fertilizasyon başarısızlığı, morfolojik olarak iyi olarak sınıflandırılan toplam 10 üzeri embryonun normal anatomik yapıya sahip bir uterusu transferini takiben 3 veya daha fazla sayıda implantasyon veya gebelik sağlayamama durumudur (1).

Çiftlerin 3 veya daha fazla başarısız deneme sonrası immünolojik, genetik ve diğer faktörler açısından detaylı olarak tekrar değerlendirilmeleri şarttır.

IVF başarısını etkileyebilecek faktörler ve çalışmamızda implantasyon başarısını etkileyen faktörler arasında araştırılan trombofili aşağıda anlatılmaya çalışılmıştır.

1. ANNE YAŞI, OVER REZERVİ

Bir kadının kronolojik yaşı her zaman ovaryan yaşı ile ilişki göstermeyebilir. Bu nedenle tedavi, kadının kronolojik yaşına göre değil, over yaşına göre planlanmalıdır. Fetal yaşamın 16–20 haftaları içerisinde primordial follikül havuzunda başlangıçta yaklaşık 6–7 milyon oosit olduğuna inanılmaktadır. Doğumda overler sadece 2 milyon oosit içerirlerken, menarşta bu sayı 300.000 düzeyine düşer. Kadının 30 yıllık reproduktif yaşamı boyunca sadece ortalama 450 monofolliküler ovulasyon gerekeceği için, bu sayı gerekli olandan daha fazladır.

Ovariyan Yaşlanma

Kötü yanıtı hastanın tedavisinde klinikte görülen ana problem, oositlerin hem kantite hem de kalitelerinde görülen azalmadır. Bu durum " ovarian yaşlanma" nedenidir ve kadının kronolojik yaşına bağlı olabildiği gibi, yaşla hiçbir ilişkide göstermeyebilir. .

Stimüle edilmemiş overlerdeki oositlerin mayoz yeteneği yaşla birlikte azalır. Benzer olarak yaşlı IVF gebelikleri, insan oositlerindeki gelişimsel yeteneklerin, yaşla birlikte azaldığını göstermiştir. Mayotik ve gelişimsel yetenekler, oosit gelişiminin geç aşamasında kazanıldığı için, yaşa bağımlı follikülogenezisde azalmanın oosit kalitesindeki bozulmayla sonuçlandığı ve yaşa bağımlı mayotik non-disjunction' daki artışın, oosit gelişimindeki kötü etkilenmenin bir belirtisi olduğu söylenebilir. Bir insan oositindeki mtDNA T414G transversiyon nokta mutasyonunun birikimi, yaş artışı ile birlikte artmaktadır. Bu nokta mutasyonunun potansiyel önemi oositin reproduktif yaşlanmasıyla ilişkili olabilir (2).

Düşük Yanıtlı Olguların Önceden Saptanması

Yaşa bağlı ovaryan rezervde azalma; oksidatif stres, follikül çevresindeki mikro dolaşımdaki azalma ve granüloza hücre fonksiyonundaki defekt artışından kaynaklanan hasar ile ilişkili olabilir. Mayotik non-disjunction yaşa bağlı anöploidinin ana mekanizmasıdır ve bu durum reproduktif yaşlanma veya ovaryan rezervdeki azalma ile sonuçlanır. "Kötü cevap veren hasta" terimi en azından, eksojen gonadotropin tedavisinde beklenenden daha az follikül ve oosit geliştirilebilen bir durum ile karakterizedir. Bu tip hastalarda oosit kalitesi de etkilenmiştir ve bu durum aynı yaş grubundaki kontrol hastalarla karşılaştırıldığında; azalan klinik gebelik, artan spontan abort ve düşük implantasyon oranları ile sonuçlanmaktadır. Ovaryan yetmezliğin öngörülmesinde kullanılan biyokimyasal belirteçlerin bozulmasından önce, gonadotropinlere yanıtızsızlık başlar.

En fazla kabul gören kötü cevap parametreleri:

Ultrasonografide görülen matür follikül sayısında azalma (ort: 2–5) , artmış bazal FSH değeri (ort 6.5–15 mIU/mL) , hCG öncesi pik estradiol değerinde azalmadır (300-660 pg/mL).

Ovaryan Rezerv Ölçüm Metodları;

- Yaş
- Klinik Semptomlar
- Biyokimyasal

Bazal FSH, bazal E2, bazal FSH/LH oranı, bazal inhibin B, AMH

- Ultrasonografi (transvajinal 2 ve 3-boyutlu)

Antral follikül sayısı, ovaryan volüm, stromal kan akımı

- Histolojik

Ovaryan biyopsi

- Dinamik testler

Klomifen Sitrat Challenge Testi, GnRH Agonist Stimulasyon Testi ve Ekzojen FSH Ovaryan Rezerv Testi

Azalmış Rezerv

FSH > 25 IU/mL, E2 > 45 – 80 pg/mL (15), FSH / LH > 3, İnhibin B < 45 ng/L

Antral Follikül Sayısı

Ovaryan rezerv ölçümündeki küçük antral folliküllerin ultrasonografik olarak ölçülmesidir.

Antral Follikül Sayısı:

<4: Çok kötü prognoz IVF yapılamaz

4–7: Kötü cevap, yüksek doz FSH gereği, yüksek iptal oranı, düşük gebelik oranı.

Yaş> 35 kötü cevap

8–10: Azalmış rezerv. Gebelik oranları hafif azalmış.

11–14: Normal, orta rezerv.

15–26: Normal, iyi rezerv. Hafif artmış OHSS riski.

>26: PCOS.

Ovaryan Volüm

Ovaryan cevabın öngörülmesinde ovaryan volümün FSH' ya daha üstün olduğu söylenebilir. Ovaryan volüm ölçümlerinin, ovaryan biyopside daha az kortikal follikül saptanımı ile de ilişkisi bulunmuştur (3).

2. ART'DE OOSİT FAKTÖRÜ VE IVF BAŞARISI

Oosit maturitesi geleneksel olarak değerlendirilmesi oositin etrafında bulunan kumulus korona hücre kitlesinin genişlemesine ve ışınsal çıkıntılar yapmasına bakılarak yapılabilir (4).

Matür oositler: Genişlemiş ve luteinize kumulus matriksi ve ışınsal çıkıntıları olan korona tabakası ile tanınabilir. Bu morfolojideki oositlerin metafaz II maturasyonunda olduğu kabul edilir.

Intermediate oositler: Korona-kumulus kompleksinin daha hafif çıkıntılı olduğu oositlerdir. Bu morfolojideki oositlerin metafaz I maturasyonunda olduğu kabul edilir.

Immatür oositler: Profaz I aşamasındaki oositlerde korona-kumulus kompleksinde herhangi bir genişleme bulgusu yoktur. Oositin etrafında bazen birkaç katlı sıkı bir tabaka

halinde folliküler bulunurlar.

Oositlerin sınıflanmasında kullanılan bu yöntem oositin nükleer maturasyonu hakkında genel bir fikir sağlasa da, kesin bir sonuç vermekten uzaktır. Bu nedenle laboratuarda gametler üzerinde yapılacak işlemlerde hatalı davranılmasına yol açabilir.

Oositin nükleer maturitesi ile kumulus kompleksinin hücresel maturitesi arasındaki farklılık nedeniyle, immatür oositler yanlışlıkla prematüre olarak insemine edilebilir. Oosit ve spermin suboptimal zamanda bir araya getirilmesinin yaratabileceği sorunlar;

- Fertilizasyon başarısızlığı,

- Uygulanmış olan ovulasyon stimülasyon protokolünün başarısının yanlış değerlendirilmesi,

- Erkek faktörünün yanlış değerlendirilebilmesidir. Yukarıda bahsedilen sorunları çözümlmek ve oositin mayotik durumunu daha net biçimde ortaya koymak amacıyla oositin etrafındaki korona-kumulus kompleksi enzimler yardımıyla dağıtıldıktan sonra maturasyon skorlaması yapılmaktadır (4).

Metafaz II oosit: Matüre, olgunlaşmış veya preovulatar oosit olarak isimlendirilmektedir. Germinal vezikül yok, ancak I. polar cisimcik mevcuttur; toplanmadan 3–5 saat sonra inseminasyon veya injeksiyon yapılabilir.

Metafaz I oosit: Kısmen matüre veya intermediate düzeyde matüre oosit olarak ta adlandırılır. Germinal vezikül ve I.polar cisimcik yoktur. Follikül aspirasyonu sonrasında kültür ortamına alınan metafaz I oosit 1 -24 saat içinde I. mayoz bölünme aşamalarını tamamlar. I. polar cisimcik atıldıktan 3–5 saat sonra inseminasyon veya injeksiyon yapılır.

Profaz I oosit: İmmatür veya olgunlaşmamış oosit olarak adlandırılmaktadır. Gonadotropin artışı ve oosit maturasyon inhibe edici faktördeki azalmaya bağlı olarak mature olmaya başlar. Oosit büyüdükçe başlangıçta gözlenen germinal vezikül kaybolmaya başlar. Germinal vezikülün kaybolduğunun gözlenmesi mayozun tekrar başladığının göstergesidir. Profaz I aşamasındaki bir oosit sperm tarafından penetre edilse bile, mayotik olarak matüre olmayan oosit aktivasyonu başlatamaz ve sperm kromozomları prematüre yoğunlaşmaya uğrayarak afonksiyonel hale gelir. Profaz I aşamasındaki immatür oositlerin izole edilip, uygun kültür ortamlarında 24 saat süreyle inkübe edildikleri takdirde, % 80 oranında metafaz I, metafaz II aşamalarını tamamlayabildikleri bildirilmiştir (4)

İn vivo maturasyonun ileri aşamalarında toplanan oositlerin inseminasyon veya injeksiyondan sonra iki pronükleus geliştirme kabiliyetlerinin en fazla olduğu görülmüştür(5). İnseminasyon veya injeksiyon uygulaması öncesinde 0–20 saat geçmesine rağmen gebelik oluşma potansiyelleri yönünden metafaz I oositler ile metafaz II oositler arasında belirgin bir farklılık saptanamamıştır. Bununla birlikte profaz I oositlerden elde edilen preembriyoların implantasyon ve canlı doğum oranlarının metafaz I oositlerinkine göre belirgin derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Fertilizasyon oranlarındaki azalmanın nedenlerinden biride, oositler matüre oluncaya kadar beklenen süre içinde sperm fonksiyonlarında olumsuz yönde etkilenmenin ortaya çıkması olabilir.

Ovulasyon stimülasyonu sonucunda oluşan çok sayıda küçük folliküller aspire edildiği takdirde, bu folliküllerden elde edilen oositlerin % 20-30'unun mayotik açıdan immatür olacağı bildirilmektedir. Mayoz bölünme aşamalarını tamamlanmadan önce sperm penetrasyonu uygulandığında genellikle ooplazma içinde sperm dekondeksasyonu gerçekleşmemekte, fertilizasyon oranları düşmektedir. Tersine sperm penetrasyonunun geciktirildiği durumlarda ise invitro yaşlanmaya bağlı olarak fertilizasyon oranları azalmaktadır (5).

3.UYGULANAN OVARYAN STİMULASYON PROTOKOLLERİ

Normal çiftlerde siklus fekondebilitesi %20–25 oranındadır. İnfertil çiftlerde (açıklanamayan infertilite) ise bu oran daha düşüktür. Tedavi siklus fekondebilitesini arttırmaya yöneliktir.

IVF, eksojen gonadotropinler ile kontrollü overyan hiperstimülasyonu, transvajinal USG altında overlerden oosit toplanmasını, laboratuvar koşullarında fertilizasyonu, embriyoların transservikal olarak uterusu transferini içerir. IVF'in prognozu maternal yaş, overyan rezerv ve geçmiş reproduktif performansla direkt ilişkilidir. Endometriozisi olan hastalarda IVF başarısı, tubal faktör infertilitesine oranla daha kötüdür. Üçüncü gün FSH değeri yüksekliği ve CC testinin anormal olması, yaştan bağımsız olarak IVF prognozunu kötü yönde etkiler. IVF tedavisinde uygulanan tedavi protokolleri şunlardır:

Kısa dönem GnRH-a protokolü: Bu protokolde GnRH-a erken foliküler fazda vermeye başlanır. GnRH-a'nın flare up etkisinden foliküler gelişim için yararlanır, daha sonra da günlük kullanımla pitüiter desensitizasyon etkisinden yararlanır. Bu protokolde kısa dönem GnRH-a'nın endojen LH yükselmesini engellediği varsayılarak 3 günlük (ultra-kısa protokol) ve 7 günlük kullanımı ile oosit toplama zamanını belirlemek gibi ayarlamalar

da yapılmıştır.

Uzun dönem GnRH-a protokolü: Önceki siklusun luteal fazında ve erken foliküler fazda GnRH a verilmesi ile hem pituitar hem de over desensitizasyonu elde edilir. GnRH a enjeksiyonuna hCG verilene dek devam edilir. Kısa ve uzun dönem protokolleri karşılaştırıldığında değişken sonuçlar elde edilmekle beraber metaanaliz çalışmalarında anlamlı fark olmadığı bildirilmektedir (6). Pituitar desensitizasyon parametreleri (hız, şiddet, devam süresi) kullanılan analoge, siklusta ilk kullanım gününe, kullanım süresi ve kullanılan formülasyona göre değişir. GnRH agonistlerinin kronik uygulama gerekliliği olması, flare-up (over kistleri) veya desensitizasyon (over tükenmişlik sendromu) dan dolayı olan yan etkileri dezavantajlarıdır.

Multiple doz GnRH antagonisti kullanımı: Orta foliküler fazdan (siklusun 5 ya da 6. günü) başlayarak hCG gününe kadar düşük dozda günlük GnRH antagonisti enjeksiyonları yapılır. Antagonist verilmesinden sonra genirelix için 4, cetorelix için 6 saat içinde pituitar supresyon tamamen etkin olup, LH seviyesi %74 oranında düşerek <1–2 IU/l seviyesine iner.

Tek doz GnRH antagonisti kullanımı: Antagonist 8. günde ya da over cevabı hızlı ise daha önce kullanılır. Baskılama etkisini üç günden daha fazla uzatmak gerektiğinde ikinci büyük doz ya da günlük 0,25 mg lık dozlar verilebilir.

4. LUTEAL FAZ DESTEĞİNİN YAPILMASI VE IVF BAŞARISI

Luteal faz desteği stimülasyon siklusunun 2. fazında hormon uygulanımını ifade etmektedir. İn vitro fertilizasyon sikluslarında rutin olarak uygulanmaktadır. Desteğin amacı korpus luteal yetmezliğine karşı profilaksidir. Luteal faz, embriyo transfer gününden human korionik gonadotropinin ölçümüne kadar geçen 2 haftalık periyodu tanımlamaktadır

İmplantasyon, uterusun hazırlanması, gebelik ve endometriumun stabilizasyonu için normal luteal fonksiyon temeldir. Normal luteal faz, corpus luteumdan yeterli seviyede progesteron salınımı ve endometriumun sekretuar değişimi ile karakterizedir. Corpus luteum, normoovulator siklusta pituitar gonadotropinlerin desteğine bağlıdır. Luteinize hormon sinyali olmadan corpus luteum disfonksiyone olacak, progesteron veya östrojen sekresyonu anormal şekilde oluşacaktır. İmplantasyon penceresi uterusun reseptif olduğu, ovulasyondan sonraki 8–10 günlük periyodu tanımlamaktadır. Uygun progesteron veya östrojen stimülasyonu olmadan endometrial reseptivite bozulacaktır. Progesteronun primer etkisi stroma üzerine olmaktadır. Bu hormonal etki ile endometrium implantasyon

zamanında, glandlarda maksimum sekretuar aktivite, perivasküler stromal hücrelerde genişleme ve embriyo tutulmasını fasilite eden fibronektin, laminin ve tip-4 kollojen içeren ekstrasellüler matriks sekresyonu oluşmaktadır. Fertilizasyon ve implantasyonu takiben gelişen blastokistin salgıladığı hCG, corpus luteumun devamını salgılamaktadır. Steroid üretiminin overden plasentaya kayışı haftalar almakta, plasental progesteron tespiti gestasyonun 50. gününde olmaktadır. Gonadotropin-releasing hormon agonistler ile yapılan uzun ovarian stimülasyon protokolleri ve down regulasyon, luteal fonksiyonları etkilemektedir. Uzun protokol, luteal fazda progesteron seviyelerinin azalması ile sonuçlanmaktadır. GnRHa kullanımı luteinizan hormon salınımının azalmasına ve dolayısı ile corpus luteumun fonksiyonlarının devamını sağlamada eksikliğe yol açmaktadır. Luteal faz desteği, eksojen hCG nin kaybolduğu ve erken implantasyonda endojen hCG'nin yükselmesi arasında oluşan boşluğu doldurmada faydalıdır (7).

Luteal faz desteği için kullanılan ilaçlar progesteronlar, östrojenler ve hCG dir. Progesteron ve östrojen uygulanımı etkili hormon desteğidir, hCG bu hormonların corpus luteumda stimülasyonu için kullanılmaktadır.

5. DOĞRU SPERMİN SEÇİLMESİ, SPERM MATÜRİTESİ, DNA FRAGMENTASYONU

Vücudun en büyük hücresi olan oosit, rekombinant bir fabrikadır Gerek kendisindeki, gerekse spermlerdeki DNA fragmentasyonlarını belirli bir orana kadar onarma yeteneğine sahiptir.

Lyon hipotezine göre, (Lyon Fenomeni -Mary Frances Lyon), genetik olarak aktif dişi hücrelerinde, iki adet X kromozomundan sadece bir tanesi aktiftir. X kromozomu inaktivasyonu, embriyonik gelişimin geç evrelerinde gerçekleşir. Fertilizasyon ve erken partenogenezde seks kromozomlarının aktif rolleri yoktur. Bu görevi, 3. otozomal kromozom üzerindeki gen grubu replikaları (homolog) üstlenmiştir.

Seks kromozomlarının henüz devreye girmediği ilk 3 gün embriyoları, seks kromozomlarının iyi veya kötü kaliteli olmalarından etkilenmezler. Bu nedenle, invitro fertilizasyonda üçüncü gün embriyoları incelendiğinde, bunların günümüzde kullandığımız embryo gradelendirilmesi kriterleriyle "iyi kalite" embriyolar olduğunu görebiliriz. Transfer edilen embriyoların siblinglerini, 5. güne kadar kültüre ederek blastokiste kadar gidiş olup olmadığını izleme imkanı bulduğumuzda, bir kısım olgularda > % 30 blastokiste gitme oranı olduğunu veya bunun altında kaldığını görmekteyiz. Seks kromozomları

üçüncü gün sonrasında devreye gireceğinden, blastokiste gidiş oranı, doğrudan seks kromozomlarının kalitesi ve DNA bütünlüğü ile ilgilidir.

Blastokiste ulaşma oranının $> \% 30$ olduğu olgularda, hastanın gebelik elde edilebileceği hakkında iyi bir prediksyon yapılabilir. Blastokiste gitme oranının $< \% 30$ olduğu olgularda, üçüncü günde transfer edilen embryoların kalitesi ne olursa olsun, gebelik oranının düşük kalacağı predikte edilebilir.

Fertilizasyon kalitesi ve blastokiste gitme oranını belirleyen en önemli faktörlerden birisi sperm DNA integritesidir.

Sperm DNA integritesinin tam veya tama yakın olmadığı durumlarda, fertilizasyon gerçekleşecek, hatta üçüncü gün embryo gelişimine kadar ışık mikroskopunda algılanabilecek bir sorun izlenmeyecek, ancak daha sonra bu embryoların üçüncü gün sonrasında arrest olduğu, blastokiste gitme oranlarının düşük olduğu ve gebelik oranlarının düşük kaldığı görülecektir.

Bu amaçla sperm DNA fragmantasyon indeksi çok iyi değerlendirilmelidir.

Sperm DNA fragmantasyon indeksi $\% 30$ 'a kadar olan fertilizasyonlarda, oositin rekombinant fabrika özellikleri, sperm DNA fragmantasyonlarını kompanse edecektir. Ancak, sperm DNA fragmantasyonu $> \% 30$ olan olgularda, her ne kadar ilk üç günlük embryo gelişimi pek de olumsuz etkilenmeyecekse de, daha sonra bunu sağlıklı blastokiste gidiş ve gebelik oranları takip etmeyecektir.

Bu konuda Evenson ve ark. ile Bungum ve ark. nın yayınladığı meta-analiz çalışmalarda birbiriyle uyumlu bulguların elde edilmiş olup bu çalışmalardan çıkan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir (8,9).

DFI $< \%30$ DNA fragmantasyonu olan olgularda,

- 1.7.3 kat daha fazla natürel konsepsiyon ve IUI başarıları
2. IUI + IVF uygulanması halinde 3 kat başarı artışı
3. Yalnızca IVF uygulanması halinde 2.2 kat başarı artışı
4. IVF + ICSI uygulanması halinde 1,7 kat başarı artışı söz konusudur.

6. AZALMIŞ ENDOMETRİAL RESEPTİVİTE

Yardımcı üreme teknikleri değişik nedenlere bağlı infertilite olgularında etkin bir tedavi seçeneğidir. Başarısız olunan olguların çoğunda neden, embriyo transferi yapılmasına rağmen implantasyon için hazır bir endometrium ve sağlıklı bir blastokist vaz geçilmez iki öğedir. Ancak, bugünkü bilgilerimizle, implantasyon müdahale edilemeyen tek aşamadır. Desiduaya adezyon ve trofoblastik invazyon için hem maternal hem de embriyonik faktörlerin gerekliliği açıktır

İMLANTASYON

Blastokist uterin endometrium kıvrımlarından birine yerleşip zona pellusidadan tamamen çıkınca implantasyon başlar. Bundan sonraki olaylar üç basamaktadır:

Karşı karşıya gelme (Apposition):

Blastokist ile alıcı endometriumun karşı karşıya gelmesidir. Schlafke ve Enders tarafından tanımlanmıştır (10). Blastokist ve bir miktar sıvı endometrial kıvrımlardan birine yerleşir. Sıvının absorbe edilmesiyle endometrium epitelyal hücreleri ve blastokist yakın temasa gelir, endometrium blastokisti çevreleyerek bir implantasyon odası oluşur. Yine bu aşamada, trofoblast hücreleri dev hücreler haline gelir ve adeziv bir özellik kazanırlar.

Yapışma (Attachment):

İmplantasyonda ikinci aşamanın adezyon kuvvet olduğu daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştu. Ancak bu iki değişik hücre arasındaki ilişkinin doğası tam olarak açıklanamamıştı (10). Hem endometrial epitelyal hücreler hem de trofoblastlarda mikrovilluslar vardır ve bu villuslar birbirlerine uyacak şekilde değinime gelirler. Bunlara eklem oluşumları (junctional complex)denir. Bu oluşumların formasyonundan sonra endometrial yıkama yapılsa bile blastokist yerinden ayrılamaz. Fertilize olmamış oositlerin ve embriyoların onkofetal gösterilmiştir. Fibronektin hücreler ile ekstrasellüler matriks arasındaki yapışmada rol oynar; hücreler üzerindeki reseptörlere kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin yapışmasına yardım eder. Ayrıca, fibronektin hücre migrasyonunu düzenler, hücre diferansiyasyonunu sağlar.

İnvazyon:

Schlafke ve Enders canlılardaki trofoblast invazyonunu üçe ayırmışlardır: 1) Yayılmacı, insanlar bu gruptadır 2) yer değiştiren 3) birleşen. Her üç tipde de trofoblastlar

epiteli geçtikten sonra desidualize olmuş endometriumun bazal laminasına yapışır ve alttaki bağ dokusuna penetre olur. Bu mekanizma kanser metastazlarına benzer; metastaz dokuları üzerinde deneysel çalışma yapmak implantasyondan daha kolay olduğu için implantasyona ait bilgilerimizin çoğu kanser araştırmalarından kaynaklanmaktadır.

Desiduannın immünolojik ve hematolojik özellikleri:

Seruloplazmin, a-1 antitripsin, sekretuar komponent, T-parçası, kompleman 3 ve 4, lösemi inhibitör faktör (LİF), granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), interlökin 6 (IL-6) endometrial glandlarda saptanmıştır (11).

Desidua bazalis ve parietalis'in %40'ını oluşturan makrofajlar immünosupresif, fagositik, antiinflamatuvar özelliklerle implantasyonda önemli rol oynarlar, sıtokinler, peptidler ve interlökinlerin sentez ve regülasyonunda etkilidirler. Monositler, T lenfositler de stroma ve glandlarda yerleşmişlerdir. B lenfositler, plazma hücreleri, PMN lökositler ve 'natural killer' hücreler erken desiduada nadir görülürler. Endometrial granule lenfositler birinci trimester sonunda en yüksek sayıya ulaşırlar ve diğer fonksiyonlarının yanında relaksin salgırlar.

Endometriumdaki lökosit subpopulasyonlarının oranı implantasyonun başarısını etkileyebilir. Öte yandan, trofoblastlar da klasik HLA antijenleri değil HLA-G antijenleri salgılayarak lizisten kaçabilir. Kofaktör proteinler sitotrofoblast ve dev hücrelerde yüksek oranda bulunur ve lizisten korunmak için yardım eder.

İmplantasyon penceresi:

Uterin reseptivite implantasyona uygun uterusu tanımlar ve bu dönem implantasyon penceresi denen kısa aralığa sınırlıdır; embriyolar uterusu bu dönemin dışında ulaşırlarsa gebelik oluşmayacaktır. İmplantasyon penceresinin tam olarak hangi zaman aralığını gösterdiğinin bilinmemesi ART sikluslarında majör sınırlayıcı faktörlerden biridir (11). İmplantasyon penceresinin hücrel ve moleküler özellikleri vardır. Hücrel düzeyde, fibroblastik stromal hücrelerin glikojen ve lipid içeren büyük poligonal hücrelere transformasyonu ile karakterizedir. Desidual reaksiyon denen bu değişiklikler önce stromal kan damarlarının çevresinde başlar, daha sonra giderek endometriumda yayılır ve desidua oluşur.

Postovulatuvar dördüncü günde endometrial hücrelerde subnuklear vakuoller hücrelerin apikaline doğru kayarken nukleus bazale kayar. Postovulatuvar beşinci, altıncı günlerde, yani periimplantasyon döneminde, luminal uterin epitelin apikal yüzeyinde

'pinopodlar' belirir. Post ovulatuvar sekizinci günde pinopodlar geriler ve bunların yerini mikrovilluslar alır. Nikas ve ark. eksojen hormon olarak adet gören kadınlarda yaptıkları çalışmada, pinopodların sadece bir gün izlendiğini ve ömürlerinin 48 saati geçmediğini gösterdiler(12). Bu bulgular implantasyon penceresinin ne kadar dar bir zaman aralığını gösterdiğini kanıtladı. Aynı tedavi rejimindeki değişik kadınların implantasyon pencereleri de değişik zamanlarda izlenmiştir. Diğer bir önemli bulgu da, serum hormon değerleri ile pinopodlar arasında bir korelasyon olmamasıdır. Bu durumda, ART sikluslarında transfer penceresi hem embriyonun gelişimine hem de kadının maruz kaldığı hormonal uyarılarla pinopod gelişimine bağlıdır

Uterin reseptivitenin belirteçleri:

Muc-1 glikoproteini endometrial hücre yüzeylerinde bulunur ve miktarı implantasyon fazında maksimuma çıkar. Bu madde, adeziviteyi artırır. Fare çalışmalarda, endometriumda heparin sülfat proteoglikanlar, laminin ve tenasinin uterin reseptivite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (12).

Reseptif fazda apikal plazma membranında önceleri sadece yanlara daha sonra bazal membrana ulaşan 'gap junctions' ve bol desmoplakin I ve II içeren 'hemidesmosome like junctions' görülür (12).

Cadherin denen başka bir molekülün endometrium ve blastokistte bol miktarda bulunduğu saptanmıştır. Bu molekül endometrial epitelyum trofektoderm aralığında da bulunur. E-cadherin embriyo kompaktlaşmasında gereklidir. Blastokist aşamasında E-cadherin bulunmayan embriyolarda trofektoderm epitelinin oluşmadığı ve blastokist kavitesinin görülmediği gösterilmiştir (12).

Fibronektin, laminin, entaktin, kollajen tip 4, hyaluronik asit gibi birçok ekstraseküler matriks komponentleri in vitro olarak blastokist gelişimini destekler. Bu adezyon moleküllerinde ortak yapının tripeptid arginin-gilisin aspartik asit dizisi olduğu gösterilmiştir. Bu dizi integrin denen reseptörlerce tanınır ve bağlanır (12) .

İmplantasyonda etkin olan steroidler sistemik etkiler yaparken, sitokinler otokrin, parakrin etkilerle rol oynarlar. Aşağıda bahsedilen sitokinlerin etkileri hayvan deneylerinde gen hedefleme yöntemiyle oluşturulan gen delesyonları ile incelenmiştir.

Leukemia inhibitory factor (LIF):

Bu sitokin için olan genin delesyonu homozigot mutant farelerde implantasyon

başarısızlığına yol açar. Farelerde gebeliğin 4'üncü gününden itibaren endometrial glandlarda bu sitokin görülmeye başlar (13).

Interleukin - 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), transforming growth factor-J5 (TGF-J5) ve diğerleri:

Bu sitokinler IVF sırasında embriyo kültür sıvılarında bulunmuştur. IL-6 yapısal olarak LIF'e benzer ancak IL-6 eksikliği olan fareler fertildir. IL-1 hem fare endometriumu hem de embriyosunda bulunur

TNF- a preimplantasyon embriyoların kültür ortamlarından izole edilebilir. Pre-implantasyon döneminde TNF- a günlük enjeksiyonu ile uygunsuz çiftleşmeden kaynaklanan fetal anomaliler ve fetal kayıplar düzeltilebilmiştir.

TGF-J5 in vitro olarak trofoblastlardan salgılanan onkofetal fibronektinin üretimini modüle eder.

Colony stimulating factor -1 (CSF-1):

İnsan trofoblast kültürlerine eklendiğinde onların bir sinsityum olacak şekilde değişimine ve plasental laktojen salınımına yol açar.

Epidermal growth factor (EGF)/ transforming growth factor- a (TGF- a):

EGF, Zona pellusidadan 'hatching' ve trofoblastların büyümesini artırır.

Granulocyte-macrophagecolony-stimulating factor (GM-CSF):

Fare blastokistinin tek kat endometrial hücrelere yapışmasını artırır. Öte yandan bu sitokinin preimplantasyon fare. Embriyo gelişimi inhibe ettiği görülmüştür.

Blastokistin anneye gönderdiği sinyaller

Embriyo ile uterusun değinime geldiği sıralarda laminin, fibronektin ve integrin. 6-1 salgılar. Yine embriyodan salınan matriks metaloproteinazla ise kollajen ve jelatini denature ederek implantasyona katkıda bulunur. Embryo blastokist aşamasına geldiğinde early pregnancy faktör, embriyo-derived pregnancy-associated factor ve hCG ile anneye sinyaller göndermeye başlar.

7. UTERİNE KAVİTE ANORMALLİKLERİ

UTERUSUN DEĞERLENDİRİLMESİ:

İç genital sistemin en sık anomalisi uterus, serviks ve vajinayı oluşturan yapısal

çiftlerin füzyon defektleridir. Defektin oluşma derecesi parsiyel ile komplet arası değişir. Eğer füzyonda total bir eksiklik varsa uterus didelfis oluşur. Bu hastalarda iki vajina, iki serviks ve iki uterus bulunur. Mülleryen kanalın parsiyel füzyonu sonucu ise uterus bikornis bikollisten uterus bikornis unikollis'e veya arkuat uterusu kadar değişir. Bu füzyon anomalilerinin tümünde iki uterus arasında bir duvar mevcuttur. Uterus içindeki sagittal septumun inkomplet rezorpsiyonu sonucunda septumun boyutuna bağlı olarak komplet veya inkomplet uterin septum oluşur. Üç boyutlu ultrasonografi, HSG, laparoskopi veya MRI konjenital anomalilerin tanısında kullanılabilir. Submüköz fibroidlerin varlığının implantasyona zarar verdiği bilinmektedir. Bu lezyonların TVS ile tanımlanması histeroskopi kadar etkili ve kesindir. Ayrıca salin kontrast sonografi ile bu lezyonların sınırları basit ve etkili olarak gösterilebilir.

IVF/ICSI öncesi hazırlık aşamasında bazı hastalara cerrahi işlem yapmak gerekebilir. Özetle bunlar,

1. Yararlılığı kanıtlanmış işlemler: Hidrosalpenksli hastalarda salpenjektomi veya proksimal tubal ligasyon yapılması, submüköz myomların çıkarılması.

Endometrial kavitede yer tutan herhangi bir lezyonun implantasyonu bozduğu bilinmektedir. Submüköz myomlar gebelik oranlarını ciddi oranda düşürmekte ve abortus oranlarını artırmaktadır (14).

2.Yararı tartışmalı olan işlemler: İntramural myomların çıkarılması, stenotik endoservikal kanalın traşlanması, endometrial poliplerin çıkarılması, uterin subseptusun çıkarılması.

IVF-ET sonuçları için myomların etkisi oldukça tartışmalıdır. Her ne kadar bazı çalışmalarda intramural veya subseröz myomların düşük IVF gebelik hızlarına yol açtığı rapor edilse de birçok çalışma bunun tersini göstermiştir (15,16). Anania ve ark. nın immünohistokimyasal yöntemlerle bazı IVF hastalarında ovaryen stimülasyona bağlı myomların büyüdüğünü ve bazı sitokinleri salındığını göstermişlerdir (17). Myomların sitokinler açısından aktif olması, bazı hastalarda implantasyonu bozabilir.

Bu yüzden IVF tedavisi sırasında myomlu hastalar yakından takip edilmeli, eğer myomlar büyüme eğiliminde ise ve IVF başarısız olursa, bu myomlar bir sonraki IVF öncesinde çıkarılmalıdır.

Zor embryo transferlerinde gebelik oranları düşmektedir. Embryo transferi zorluğu endoservikal kanalın stenozu ve dolambaçlı olmasından kaynaklanabilir. Ancak servikal

stenozu olan hastalarda ise histeroskopik stenoz açma, genişletme veya kanalı traşlama yöntemi ile kanalın genişletilmesi sağlanabilir (18).

Polipler submüköz myomlar gibi endometrial kavitede yer tutan lezyonlardır. İmplantasyonu bozabilecek faktörler salabilirler. Histeroskopi artık kolaylıkla uygulanan bir işlem olduğu için bir polip görüldüğünde onu çıkarmak en akılcı işlem olacaktır. Ancak bazen polipler kontrollü ovaryen hiperstimulasyon sırasında görülmektedir. Bu poliplerin varlığının gebeliği etkileyip etkilemediği şüphelidir. Mastrominas 2 cm altındaki poliplerin IVF başarısını etkilemediğini, Lass ise 2 cm altındaki poliplerin gebelik oranlarını azaltmadığı ancak abortuslarda bir artışa meyil olduğunu rapor etmişler (19,20).

Bikornuslu ve subseptuslu hastalarda kontrol hastalarına göre benzer oranlarda gebelik elde edilebilmektedir (21). Fakat bazı serilerde de implantasyon oranları daha düşük bulunmuştur (22). Bu yüzden özellikle supseptuslu hastaların IVF öncesinde septum rezeksiyonu geçirmeleri önerilir. Bikornuslu hastalarda ise ancak abortus ve kötü obstetrik öyküsü oldukları zaman metroplasti önerilir.

8. EMBRİYO TRANSFER TEKNİĞİ VE IVF BAŞARISI

Embriyo transferi:

ART sikluslarında gebeliğe ulaflmadaki en son basamak embriyo transferidir. İlk IVF bebeğinin doğumundan beri embriyo transferi (ET) tekniklerinde çok büyük değişiklikler olmamıştır. Transfer sırasında uterusun pozisyonu, tenakulum ile portionun tutulması, kateterde kan/mukus olması gibi parametreler bu konuda değişik görüfler olduğunu ortaya koymufltur. ET günü, transfer edilen embriyo sayısı ve grade'leri gebelik oranları üzerine etkili olabilmektedir. Konu ile ilgili Ebner ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmanın sonuçları Tablo 1'de görülmektedir (23).

Tablo 1. Gebelik ve implantasyon oranlarını etkileyen transfer parametreleri

Transfere bağlı	Sayı			
	Gebe	Gebe	İmplantasyon	Gebelik (%)
Guide kullanımı				
Evet	10	19	14.8	34.4
Hayır	95	180	16.8	34.5
Histerometri				
Evet	25	34	21.4	42.3
Hayır	80	165	16.6	32.7
Kateterde kan				
Evet	18	38	16.2	32.1
Hayır	87	161	16.9	35.1
Kateterde mukus				
Evet	11	22	19.3	33.3
Hayır	94	176	16.4	34.7
Transfer volumü				
< 10ul	46	131	14.1	26
10-20ul	59	68	19.1	46.5

Embriyo transferinin etkileri konusunda yapılan bir başka çalışmada da ultrasonografi eşliğinde transfer yapmanın implantasyon oranlarını anlamlı derecede etkilediği gözlenmiştir (24). Buna karşın transferi yaptıktan sonra kateterin hemen geriye çekilmesi veya 30sn beklemeden sonra çekilmesi arasında gebelik oranları açısından fark bulunamamıştır (25).

9. TROMBOFİLİ NEDENLERİ VE HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI VE İMPLANTASYON

Maternal trombofili, üçüncü trimesterde preeklampsi, dekolman plasenter, intrauterin gelişme geriliği ve intrauterin fetal ölüme, ilk trimesterde ise erken gebelik kayıplarına neden olabilir. Plasental perfüzyon bozukluğuyla, trombofilinin kötü obstetrik sonuçları açıklanmaktadır(26). Maternal trombofili nedenleri ve genel populasyondaki insidansı tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Trombofili Nedenleri ve Populasyondaki İnsidansı

Trombofili Nedenleri	insidansı
Aktive olmuş protein C rezistansı	%3-7
Faktör V Leiden mutasyonu	%3-5
Hiperhomosisteinemi	%2-3
Antikardiolipin antikör varlığı	%2
Lupus antikoagulanı	%2
Protein S eksikliği	%0.2-2
Protein C eksikliği	%0.1-0.3
Antitrombin III eksikliği	%0.1

Trombofili, artmış arteriyel ve venöz trombozisle ilişkilidir. Trombozisin obstetrik komplikasyonlar için önemli bir risk faktörüdür. İntervillöz ve spiral arterlerde oluşan trombozis, plasental perfüzyon bozukluğuna neden olur. Bu açıdan bakıldığında gebelikte trombofilinin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Obstetrik komplikasyonları olan kadınlarda, trombofili %68 oranında gözlenirken, gebeliği normal olarak seyreden kadınlarda bu oran %18 olarak bulunmuştur(27).

Protein C, trombinin endotel hücre yüzey faktörü olan trombomodüline bağlandığı zaman aktive olur ve böylece aktive olmuş protein C faktör Va ve faktörVIIa' yi inaktive edip fibrinolitik sistemi aktive ederek daha fazla trombin formasyonunun oluşmasını engeller. Protein C eksikliği trombozisle ilişkilidir ve kötü obstetrik sonuçları olan kadınlarda %6 oranında saptanmıştır (28).

Aktive olmuş protein C rezistansı, ailesel trombofilinin önemli nedenlerinden biri olduğu ve bu rezistansın faktörV geninde nokta mutasyondan kaynaklandığı (506. nükleotidinde guanin yerine adenin geçmesi) gösterilmiştir. Böylece aktive olan protein C'nin faktörV'e bağlanmasını engelleyerek fibrinolitik sistemin aktivasyonunu engellemektedir (29). Aktive olmuş protein C'ye rezistansın, kötü obstetrik sonuçlara neden olan grupta insidansı %9 olarak saptanmıştır.

Protein S, aktive olmuş protein C nin kofaktörüdür. Protein S in majör üretim yeri karaciğerdir. Ancak protein S önemli oranda vasküler endotel hücrelerinde, megakaryositlerden, osteoblastlardan ve sinir dokularından üretilmektedir. Protein S

normal olarak plazmada iki form halinde bulunmaktadır. Birincisi fonksiyonel olarak aktif olan serbest şekil ve fonksiyonel olarak inaktif olan C4b ye bağlı karmaşık şeklidir. Protein S eksikliğinin klinik görünümü aynı protein C ve antitrombin III eksikliğindeki gibidir ve protein S eksikliği olanlarda derin ven trombozu riski %1–8 oranındadır (30).

Antifosfolipid antikorlar özellikle iki antikor tanımlanmıştır ki bunlar, lupus antikoagulanı ve antikardiolipin antikorlardır. Bu antikorların kötü obstetrik sonuçlara, arteriyel ve venöz trombotik sonuçlara neden olduğu bilinmektedir. Birçok araştırmacı grup, antifosfolipid antikorların fosfolipidlerle etkileşime girerek aktive olmuş protein C nin protein S bağımlı anti koagulan aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (31).

Son zamanlarda protrombin gen mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonun 20210 nükleotidinde adenin yerine guanin geçerek oluştuğu saptanmıştır ve bunu takiben plazma protrombin konsantrasyonunda artışa ve böylece bu artış tromboembolizm, myokard infarktüsü ve serebral ven trombozuna neden olmaktadır. Genel popülasyonda bu gen mutasyonu %3, obstetrik komplikasyonu olan grupta ise %10 olarak saptanmıştır (32).

Hiperhomosisteinemi

Homosistein: Metiyonin metabolizması ara ürünü bir aminoasittir. Proteinlerin yapısında yer almaz. Metiyonin, esansiyel bir aminoasit olup homosisteinin tek kaynağıdır. Metiyoninden Metiyonil adenozil transferaz (MAT) enzimi varlığında transmetilasyon reaksiyonu ile homosistein oluşur. Homosistein metabolizmasında 3 enzim ve 3 vitamin rol oynar. B6 vitamini varlığında sistationin B sentaz (CBS) enzimi ile transsülfürasyon reaksiyonu sonucunda sisteine, B12 ve folik asit varlığında remetilasyon reaksiyonu ile metionin sentaz (MS) enzimi yoluyla metionine dönüştürülür. Remetilasyon için gerekli metil kaynağı ise folikasittr. Yani metil tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi B6 vitamini varlığında metilen tetrahidrofolattan sağlanır.

Homosistein kanda %3'ü serbest, %75'i albümine bağlı, %22'si ise disülfid formundadır. Plazma düzeyi yüksek performanslı likid kromatografi yöntemi veya immunoassay yöntemi ile ölçülür. Normal plazma düzeyleri 5–15 umol/L arasında değişmektedir.

Latent ya da maskelenmiş HCY metabolizma bozukluklarını ortaya çıkarmak için metionin yükleme testi yapılır. Metionin 0.1g/kg verildikten 6 saat sonra plazma homosistein düzeyi ölçülür. Bu test hiperhomosisteinemiye ortaya koymada daha duyarlı olarak görülmekte ancak gebelikte kullanımı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Hiperhomosisteinemi diyebilmek için açlık düzeyi 15 umol/L den fazla veya metiyonin yüklenme testi sonrası 51 umol/L den fazla olmalıdır.

Homosisteinin Fizyolojik Özellikleri

Çocuklarda erişkinlere göre %30 daha düşüktür. Erkeklerde kadınlara göre belirgin olarak daha yüksektir. Postmenapozal kadınlarda premenapozal olanlara göre daha yüksektir ve postmenapozal hormon replasman tedavisi homosistein düzeyini %10-15 oranında düşürür. Aynı şekilde oral kontraseptif kullanımı ve gebelikte homosistein düzeyini düşüren faktörlerdendir (33).

Hiperhomosisteinemiden Sorumlu Anormallikler

HCY metabolizmasında daha öncede belirttiğimiz gibi iki yol mevcuttur: transsülfürasyon ve transmetilasyon; bu yollardaki enzimatik anormallikler konjenital veya kazanılmış olabilir ve hiperhomosisteinemiye sebep olur.

1) Genetik faktörler:

Bazı genetik hastalıkların varlığında ve vitaminlerin eksikliği durumunda HCY plazma ve dokularda artar. Klasik homosisteinüri otozomal resesif geçişli bir hastalık olup systationin B sentaz enzim eksikliğinden kaynaklanır, karakteristik olarak; çok yüksek HCY düzeyleri, ateroskleroz, tromboembolik komplikasyonlar, iskelet anormallikleri, ektopia lentis ve mental retardasyon tablosuna yol açar.

Son yıllarda spesifik ısıya duyarlı folik asit bağımlı MTHFR enziminde parsiyel eksiklik tanımlanmıştır. Bu eksiklik MTHFR enzimini kodlayan gende nokta mutasyon sonucu yani 667. nükleotidde Timidinin yerine Sitozinin geçmesidir.(667C-T) Bu mutasyona bağlı gelişen termolabil varyant Kanada popülasyonunda %5–15, beyazlarda %12 oranında saptanmıştır. Bu mutasyon ile MTHFR enziminde aktivite azalması ile HCY metiyonine dönüştürülemediği için hiperhomosisteinemi gelişir. Ancak termolabil varyant MTHFR orta derecede Hiperhomosisteinemiye sebep olur ve kardiyovasküler anormallikler ile ilişkisi gösterilmiştir (34) .Termolabil varyant MTHFR'ı taşıyan ve serum folik asit seviyesi düşük gebelerde saptanan orta derecede hiperhomosisteinemi, diyetle folik asit yerine konulduğunda normal homosistein seviyelerine getirilebilir.

2) Çevresel Faktörler:

a) Diyetle yeterli miktarda B6 vitamini, B12 vitamini ve folik asitin alınamaması.

b) İatrojenik ilaçlara bağlı:

Folik asit metabolizması üzerine etkili ilaçlar; Methotreksat, antikonvülzanlar, fenotiazin, karbamazepin v.s. B6 vitamini metabolizması üzerine etkili ilaçlar; Teofilin, Azarabin, oral kontraseptifler, sigara içimi v.s. B12 vitamini metabolizması üzerine etkili ilaçlar; Nitrik oksit

c) Böbrek yetmezliğinde görülen hiperhomosisteinemi: HCY nin üriner atılımındaki yetersizlikten değil, homosisteinin metabolizmasındaki yetersizlikten de kaynaklandığı ve bu hastalarda sık görülen diffüz anjiopatinin de rolü olduğu düşünülmektedir.

d) Değişik hastalıklar: Karaciğer yetmezliği, Çinkoeksikliği, akut lenfoblastik lösemi, hipotroidizm, pernisiyöz anemi, ciddi psöriasis, kronik alkolizm v.s

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Yardımcı Üreme Teknikleri ve Tüp Bebek Ünitesinde Aralık 2006 - Şubat 2007 arasında yürütüldü.

Çalışmamızda A Grubu (Çalışma Grubu) ve B Grubu (Kontrol Grubu) olmak üzere 2 grup oluşturduk. Çalışma grubuna alınacak hastaların infertilitelere yönelik detaylı anamnezleri alındı. Yaşları, infertilite süreleri, gravida – pariteleri, infertilite nedenleri, daha önce denenmiş IVF-ICSI siklus sayısı belirlendi.

A grubunda yaşları 26–42 arasında olan, en az 3 kez IVF-ET ve/veya ICSI-ET denenmiş 52 infertil kadın belirlendi. Önceki sikluslarında aynı embryolog tarafından Grade 1–2 olarak değerlendirilmiş embryoların transfer edildiği ancak başarı elde edilememiş hastalar tekrarlayan implantasyon başarısızlığını araştırmak üzere seçildi. Çalışma grubundaki hastalara önceki sikluslarında standart uzun dönem GnRH analog protokolü uygulanmış olup, hiçbirinde BhCG pozitifliği tespit edilmemişti.

B Grubu ise en az 1 yaşayan çocuğu olan, yaşları 25–38 arasındaki 50 sağlıklı gebeden oluşturuldu.

Histerosalpingografide veya ultrasonografide hidrosalpinks, submüköz myom, endometrial polip, uterin sineşi gibi anormal uterin kavite görüntüleri olan, yapılan probe küretajlarda endometrit ve endometrial hiperplazi izlenen hastalar, anamnezlerinde geçirilmiş tromboemboli öyküsü olan, diabetes mellitus, tiroid fonksiyon bozukluğu, cushing sendromu gibi sistemik hastalıkları olan kadınlar çalışma grubuna alınmamıştır.

Çalışma grubundaki hastalardan luteal fazda olmak üzere ve kontrol grubundaki gebelerden rutin gebelik kontrolleri sırasında kan örnekleri NaEDTA'lı vakumlu tüplere alındı. DNA izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) çalışmaları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi araştırma laboratuvarında yapıldı.

DNA İzolasyonu

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 2 ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüplere steril olarak alındı. Yoğun tuz konsantrasyonu metodu kullanılarak total DNA izole edildi. Bu işlemde;

- Falcon tüplerinin içerisine 10 ml soğuk steril distile su konuldu.
- Bunun üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki periferik kandan 1 ml eklendi ve pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı.

- 4500 RPM’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant kısmı dökülerek pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.
- Pellet’in üzerine 850 µl nuclei lysis buffer eklendi ve pipetaj yapılarak pelletin homojen hale gelmesi sağlandı.
- 37°C’de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- 13000 RPM’de 3 dakika santrifüj edildi ve sonucunda faz oluşumu sağlandı.
- Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml %96’lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görüldü.
- 12000 RPM’de 4 dakika santrifüj edilip alkol döküldü ve DNA ependorfun dibine çöktürüldü.
- Üzerine 200–500 µl %70’lik alkol (etil alkol) eklenip 12000 RPM’de 3 dakika santrifüj edildi.
- %70’lik alkol dökülüp dip kısımdaki DNA’nın kuruması için ependorf ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.
- Havada kurutulan DNA steril distile su (150–300 µl) ile homojen hale getirildi.
- DNA, PCR analizinde kullanana kadar -20°C’de depolandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

MTHFR(C677T), Faktör 5 Leiden(G1691A) ve Faktör 2 protrombin (G 20210 A) mutasyonlarının taranması için primer dizilerinden yararlanarak (PCR-ARMS) metodu ile pozitif, negatif kontroller kullanılarak genotipler ortaya kondu.

Bunun için PCR reaksiyonu 20 µl’de gerçekleştirildi.

Reaksiyon;

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2 µl 10xPCR tamponu
- 1 µl MgCl₂
- 1,2 µl 10 pmol primer mix.
- 11,8 µl dH₂O
- 0,2 µl DNA Taq polimeraz enzimi
- 2 µl genomik DNA

İçeren karışım ile gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cyclers'da;

- 94°C'de 3 dakika bir döngü
 - 94°C'de 0,15 dakika,
 - 60° de 0,15 dakika,
 - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 10 döngü
- 94°C'de 0,15 dakika,
 - 57°C'de 0,15 dakika,
 - 72°C'de 0,15 dakika,
- } 25 döngü
- 72°C'de 3 dakika ve
 - 4°C'de bir döngü

MTHFR (C677T) için yapılan PCR reaksiyonunda $T_m = 57-60$ °C Faktör 5 Leiden (G1691A) ve Faktör 2 protrombin (G 20210 A) bölgeleri için $T_m = 54-56$ °C olarak kullanıldı.

Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürününü değerlendirmek için %2'lik agaroz (A 5093, Sigma) TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) kullanıldı. Agaroz TAE içinde eritildikten sonra EtBr (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edilerek boyandı. Her gen bölgesi için bir mutant birde normal bölgeyi tanıyan primer çiftleriyle yapılan PCR sonucu elde edilen PCR ürünleri yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bp'lik ladder kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Sadece normal primerlerin kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ürünün yüklendiği kuyucukta beklenen büyüklükte bant elde edildiğinde homozigot normal, hem normal hemde mutant primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünlerinin yüklendiği kuyucukların her ikisinde de bant elde edildiğinde heterozigot ve sadece mutant band elde edildiğinde homozigot mutant olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda istatistikî analizde ki-kare testi kullanıldı. Gerekli olduğu durumlarda Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı. $p < 0,05$ olduğu durumlarda gruplar arasındaki farkın önemli olduğuna karar verildi.

BULGULAR

A grubundaki hastaların yaş ortalamaları 33,3 +/- 7,6; B grubundaki hastaların yaş ortalamaları 29,2 +/- 3,7 olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p= 1,03).

A grubundaki hastaların ortalama infertilite süreleri 10,9 +/- 4,3 idi. Bu gruptaki hastalara yapılan IVF-ET ve/veya ICSI-ET siklus sayısı ortalama olarak 4,2 +/- 1,2 olup hastaların hiçbirinin gebeliği olmamıştı. B grubundaki hastaların ortalama pariteleri 2,6 +/- 1,3 idi.

Her iki grupta tüm mutasyonların varlığı, MTHFR homozigot ve heterozigot varlığı, F5 homozigot ve heterozigot varlığı, PTH2 homozigot ve heterozigot varlığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 3. Üç mutasyondan herhangi birinin varlığı

	A grubu (çalışma grubu)	B grubu (kontrol grubu)	Toplam
Üç mutasyondan herhangi birinin varlığı	32 %61,5	23 % 46	55 %53,9
Üç mutasyondan herhangi birinin yokluğu	20 %38,5	27 % 54	47 %46,1
Toplam	52 %100	50 % 100	102 %100

Üç mutasyondan herhangi biri A grubundan 32 (%61,5) ve B grubunda 23 (%46) kadında izlendi. Üç mutasyondan herhangi biri A grubundan 20 (%38,5) ve B grubundan 27 (%54) kadının hiçbirinde izlenmedi.

Gruplar arasında üç mutasyondan herhangi birinin varlığı istatistiksel olarak anlamlı değildi (p = 2.477).

Tablo 4. Her iki grupta MTHFR Heterozigot varlığı

	A grubu (çalışma grubu)	B grubu (kontrol grubu)	Toplam
MTHFR Heterozigot varlığı	22 % 42,3	17 %34	39 %38,2
MTHFR Heterozigot yokluğu	30 % 57,7	33 %66	63 % 61,8
Toplam	52 %100	50 %100	102 %100

MTHFR Heterozigot gen mutasyonu varlığı A grubunda 22 (%42,3) ve B grubunda 17 (%34)kadında izlendi. Bu mutasyon A grubunda 30 (%57,7) ve B grubunda 33 (%66) kadında izlenmedi.

Her iki grupta MTHFR Heterozigot gen mutasyonu varlığı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.745$).

Tablo 5. Her iki grupta MTHFR Homozigot mutasyon varlığı

	A grubu (çalışma grubu)	B grubu (kontrol grubu)	Toplam
MTHFR Homozigot varlığı	4 %7,7	6 %12	10 %9,8
MTHFR Homozigot yokluğu	48 %92,3	44 %88	92 %90,2
Toplam	52 %100	50 %100	102 %100

MTHFR Homozigot gen mutasyonu A grubunda 4 (%7,7) ve B grubunda 6 (%12) kadında izlendi. Bu mutasyon A grubunda 48 (%92,3) ve B grubunda 44 (%88) kadında izlenmedi.

Her iki grupta MTHFR Homozigot gen mutasyonu varlığı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.535$).

Tablo 6. Her iki grupta F5 Leiden Heterozigot mutasyonu varlığı

	A grubu (çalışma grubu)	B grubu (kontrol grubu)	Toplam
F5 Heterozigot varlığı	10 %19,2	6 %12	16 %15,7
F5 Heterozigot yokluğu	42 %80,8	44 %88	86 %84,3
Toplam	52 %100	50 %100	102 %100

F5 Leiden Heterozigot mutasyonu A grubunda 10 (%19,2) ve B grubunda 6 (%12) kadında izlendi. Bu mutasyon A grubunda 42 (%80,8) ve B grubunda 44 (%88) kadında izlenmedi.

Gruplar arasında F5 Leiden Heterozigot mutasyon varlığı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1.008$).

Tablo 7. Her iki grupta F5 Leiden Homozigot mutasyon varlığı

	A grubu (çalışma grubu)	B grubu (kontrol grubu)	Toplam
F5 Homozigot varlığı	1 %1,9	0 %0	1 %1
F5 Homozigot yokluğu	51 %98,1	50 %100	101 %99
Toplam	52 %100	50 %100	102 %100

F5 Leiden Homozigot mutasyonu A grubunda 1 (%1,9) kadında izlendi. Bu mutasyon A grubunda 51 (%98,1) ve B grubunda 50 (%100) kadında izlenmedi

Fisher'in kesin Ki-kare testine göre her iki grupta F5 Leiden Homozigot varlığı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p= 0.244$).

Kontrol Grubu ve çalışma grubunda hiçbir hastada protrombin homozigot veya heterozigot mutasyon varlığı izlenmedi

TARTIŞMA

Infertil çiftlerde tedaviye yaklaşım ve başarı yakın dönemlerde gittikçe ilerlemektedir. Avrupada 2001 yılı boyunca 235000 IVF-ET siklusu yapılmış ve yaklaşık olarak %29 gebelik elde edilmiştir. Başarısızlık birçok faktöre bağlanabilir. Bu faktörler arasında uygun olmayan ovaryan stimülasyon protokolleri, suboptimal laboratuvar kültürleri ve embryo transfer tekniğindeki hatalar ilk akla gelenlerdir. Çok başarılı merkezlerde dahi tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları görülmektedir (35). Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Yardımcı Üreme Teknikleri ve Tüp Bebek Ünitemizde gebelik başarıları yaklaşık olarak %35 ler civarındadır.

Birçok klinisyen tarafından 4–10 tane yüksek kalitedeki embryoların transfer edildiği 2–6 kez denenmiş IVF siklusuna rağmen gebelik elde edilmemesi tekrarlayan IVF başarısızlığı olarak tanımlanmıştır. Ancak günümüzde 1 veya 2 embryonun transfer eğilimi yüksek olduğundan tanım netleşmemiştir. Bu nedenle iyi kalitedeki embryoların transfer edildiği 3 siklustan sonra hala gebelik elde edilmediyse mutlaka daha ileri etyolojik nedenler araştırılmalıdır. Yardımcı üreme teknikleri sırasında gözlenen embryonik kayıpları; azalmış endometrial reseptivite, embryonik defektler ve ilişkili faktörler olarak 3 kategoride gruplandırılır (36).

Implantasyon başarısızlığı etyolojisinde, rekürren düşüklerdeki benzer mekanizmalarla suçlanan diğer bir konuda immünolojik sebepler ve trombofilidir. Yakın dönemde bu konu üzerinde sıkça durulmaktadır. Embryo implantasyonu ve normal plasental gelişim aşamasında altta yatan karmaşık mekanizmalarında henüz tam olarak açıklanmadığı da belirtilmelidir. Literatürde bu konuda da ortak varılmış görüşler çok fazla değildir. Trombofiliye bağlı hiperkoagülabilitate, gebelikte düşükler, fetal ölümler, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği gibi gebelik komplikasyonlarına neden olur. Altta yatan olası mekanizma plasental trombozdur. Kalıtsal trombofilide en sık sebep olan iki nokta mutasyonu Faktör 5 Leiden ve Protrombin 2 gen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar geçirilmiş venöz tromboz öyküsü olanların % 20 sinde ve genel populasyonun %6 sında izlenmektedir (37).

Bazı bilgiler göstermektedir ki, trombofilik gen mutasyonları tekrarlayan IVF başarısızlığı ile ilişkili olabilir. Endometrial seviyedeki bazı moleküler anormallikler ve anormal embryo-endometrium ilişkisi tekrarlayan implantasyon başarısızlığından sorumlu olabilir. İmplantasyonun erken dönemlerinde trofoblastik invazyon için koagülasyon ve fibrinoliz dengesi hassas olup fibrin polimerizasyonu ve plasental bazal tabakanın

stabilizasyonu ile villöz aralıkların ve plasental damarların şekillenmesi sağlanmış olur. Koagülasyon ve fibrinoliz için anahtar kelimeler serin proteaz ve trombindir. Trombin proenzim olan protrombinden protrombinaz kompleksi etkisinde şekillenir ki, bu kompleks bünyesinde faktör 5'i içerir. Bu aktiviteye karşı feedback inhibisyon yapan antikogulan sistem protein C dir ki, aktive protein C faktör 5'i inhibe ederek trombin oluşumunu azaltır. Trombin bikere oluştuğunda hemen fibrin formasyonunu başlatır ve fibrin de sırasıyla plazminojenin plazmine dönüşünü stimüle eder ve bu da fibrinolizi stimüle eder. İmplantasyon seviyesindeki bu hassas ilişki kalıtsal trombofilik gen mutasyonlarından zarar görebilir (38).

Bu bilgilerin ışığında maternal hiperkoagülabiliteye bağlı etkilenmiş uteroplasental dolaşımın embryo implantasyonunda rolü olabileceği düşünülerek yapılan birçok çalışma vardır. Çalışmamızda tekrarlayan IVF başarısızlığı ve implantasyon yetersizliği arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere yardımcı üreme tekniklerinden fayda görmemiş infertil kadınlar seçilmiştir.

Kalıtsal trombofili ile tekrarlayan implantasyon başarısızlığı arasında artmış ilişkiyi gösteren Grandone ve ark ile Azem ve ark 'nın yaptığı 2 önemli vaka-kontrol çalışması vardır (39,40). Ancak Martinelli ve ark, yaptıkları araştırmada trombofili ile tekrarlayan implantasyon başarısızlığı arasında bir ilişki olmadığını belirtmiştir (37).Coulam ve ark.'nın yaptığı çalışmada PAI-1(plazminojen aktivasyon inhibitör) mutasyon prevalansı ve multiple trombofilik gen mutasyonları prevalansının implantasyon başarısızlığı olan hastalarda fertil grupla kıyaslandığında belirgin olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (36). Biz çalışmamızda tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile trombofili belirteçleri olan MTHFR enzim, Faktör 5 Leiden ve protrombin 2 gen mutasyonları arasında artmış bir ilişki görmedik. Çalışmamızda PAI-1 mutasyonunu araştırmadık.

Martinelli'nin yaptığı çalışmada kalıtsal trombofili ile IVF/ICSI-ET'de implantasyon başarısızlığı arasında artmış bir ilişki olmadığı gösterilmiştir. Uygulanan yardımcı üreme teknikleri, hasta yaşı, uygulanan tedavi protokolü, infertilite sebebi göz önüne alınarak hastalar gruplandırıldığı takdirde de bir ilişki bulunmamıştır (37)

Faktör 5 Leiden ve protrombin mutasyonuna bağlı kazanılmış trombofili ve antifosfolipid otoantikolarına bağlı edinilmiş trombofiliden başka Martinelli çalışmasında homozigot MTHFR mutasyonu ile hafif hiperhomosisteinemi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır (37). Literatürde bu mutasyonun tromboz patogenezindeki rolü hakkındaki bilgilerde çatışmaktadır. Bu mutasyon erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiş olup

homozigot mutasyon formunda kandaki folat seviyesi düşmekte ve plasma homosistein seviyeleri yükselmektedir. Bu da sperm sayısını ve motilitesini etkilemektedir. Çalışmasındaki diğer sonuçlarla benzer olarak Martinelli MTHFR mutasyonu prevelansını kontrol ve çalışma grubunda benzer bulmuştur. Biz çalışmamızda MTHFR homozigot mutasyonunu; 52 infertil kadın arasından 4'ünde ve 50 multipar gebe arasından 6'sında izledik.

Martinelli'nin yaptığı çalışmada embryo implantasyon başarısızlığı olan kadınlarda faktör 5 leiden mutasyonu açısından istatistiksel anlamlı sonuç alınamamıştır (37). İstatistiksel anlamlılığını güçlendirmek için daha geniş sayıda hastada çalışılması gerektiği eleştirilmiştir. Ayrıca çalışmada erkek partner ve embryo trombofili açısından test edilmediği için embryonun kendinden de kaynaklanabilecek hiperkoagülabilité unutulmamalıdır. Yapılan çalışma sadece kadınlar üzerindeki araştırmayla sınırlandırılmıştır. Üçüncül olarak kontrol grubu çalışma grubuna yakın tutulabilirdi yani gebeliği spontan değil de yardımcı üreme teknikleri sonrasında elde edilen kadınlardan seçilebilirdi. Bizim çalışmamızda çalışma grubunda 52 infertil kadın, kontrol grubunda 50 gebe vardır ve bu gebelerde ve gebeliklerini spontan elde etmişlerdir. Mutasyon belirteçleri erkeklerde çalışılmamıştır.

Trombofilik genler damar bütünlüğünü koruma, inflamasyon ve dokunun şekillendirilmesinde gerekli olan proteinleri sağlar. Bu genlerin mutasyonu ile plasental damar bütünlüğü de bozulup rekürren kayıplara neden olabilir. Implantasyon sırasındaki trofoblastik invazyon, matriks metalloproteinazlar tarafından şekillendirilen ekstrasellüler matriksin degradasyonuna bağlıdır. Implantasyon seviyesinde metalloproteinazların ekspresyonu serin proteazlar ve plazmin ile stimüle edilmektedir. Böylece trofoblastik implantasyon plazminojenden plazminin kontrollü üretimine bağlı olup plazminojen aktivatörleri (PA) ve inhibitörleri(PAI) ile regüle edilmektedir. PAI-1 temel inhibitörü olup fibrinolizi düzenler.

Artmış fibrinolizin ise implantasyon oranlarını arttıracakı umulmaktadır ki, bu da trombinin artmış protrombinaz aktivitesi ile olmaktadır. Bu aktivite protein C aktivitesinin azalması ile korelidir. Aktive protein C faktör 5'i aktive ederken aktive protein C rezistansı trombin üretiminde artışa kalıcı protrombin aktivitesine neden olur. Aktive protein C rezistansı ile ilişkili en sık kalıtsal trombofili faktör 5 Leiden mutasyonudur. Bu mutasyon heterozigot formda Kafkas halkının %5-10'unda gözlenir. Artmış tromboz riski ve ardı sıra gebelik kaybı ile ilişkilidir. Bu hasta grubunda Gopel ve ark.'nın IVF-ET başarısı üzerine yaptıkları çalışmada ilginç olarak faktör 5 leiden mutasyonu taşıyan

kadınların %90'ında ilk embryo transferi başarılı olmuşken bu mutasyonu taşımayanlarda %49 gibi düşük bir başarı izlenmiştir. Bu araştırmalar faktör 5 leiden mutasyonu olanlarda implantasyon oranlarının yüksek olmasının bu mutasyon için genetik bir avantaj olduğunu düşündürmektedir (42).

Diğer trombojenik gen mutasyonu MTHFR olup bir enzimdir ve homosisteinin metionine remetilasyonunu katalize eder. B12 vitamini ve folik asid metabolizmasında rol alır. Bu gende C677T homozigot mutasyonu olanların mutasyonu olmayanlarınkine kıyasla 2,3 kat daha az ikiz gebelik şansları vardır (43). Bu etki folik asidin embryonik ve maternal hücrelerin hızlı bölünmeleri ve proliferasyonları üzerine olan etkisinden kaynaklanabilir ki, folik asidin suplementasyonu ile artmış dizigotik ikizlik oranı ilişkilendirilmiştir (38).

Kalıtımsal trombofili ile gebeliğin artan komplikasyonları ki sıklıkla görülenler, ciddi preeklampsi, fetal gelişme geriliği, dekolman plasenta olup aradaki ilişkiyi gösteren çok çalışma vardır. Maternal damarlarda tromboz ve intervillöz aralığa giden kan akımının azalması bu komplikasyonlara neden olabilir. Maternal damarların sinsityotrofoblastlarca invazyonu lokal mikrotrombozlardan etkilenebilir ve implantasyon başarısızlığına neden olabilir. Ancak şu belirtilmelidir ki, intervillöz aralığın gelişmesi 11.-12. gebelik haftasında başlayacağından embryo henüz implantasyon aşamasındayken trombozun implantasyon başarısızlığındaki rolünü açıklamak zordur (44).

Trombofililerin kalıtımsal özelliği nedeniyle fetal trombofilinde IVF-ET sonuçlarını etkileyebileceği düşünülebilir. Fetal trombofilinin plasental infarktlara neden olduğu bilinmekte ancak implantasyon üzerindeki etkisi ile ilgili net bilgi yoktur (45).

SONUÇ

Yaptığımız çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlar ile gebeliklerini spontan elde etmiş gebelerden oluşturulan kontrol grubu arasında MTHFR enzimi, protrombin 2 geni ve faktör 5 Leiden mutasyonları açısından anlamlı bir istatistiksel sonuç bulunmamıştır. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile trombofili arasında artmış bir ilişki görülmemiştir. Fakat bu konuyla ilgili daha geniş hasta grubuyla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

GİRİŞ

Tekrarlayan in vitro fertilizasyon- embryo transfer başarısızlığında (IVF-ET) embryo kalitesi ve endometrial reseptivite önemli rol oynar. Kalıtsal trombofili tromboembolizm, rekürren gebelik kayıpları ve dekolman plasenta preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği gibi gebelik komplikasyonlara neden olmaktadır. Altta yatan olası mekanizmanın plasental tromboz olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız bu çalışmada tekrarlayan IVF-ET başarısızlığı olan kadınlarda trombofilinin implantasyon ile olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 2 grup oluşturuldu. A grubu yaşları 26-42 arasında en az 3 kez IVF/ICSI-ET siklusu denenmiş, en az 3 tane grade 1-2 kalitede embryonun transfer edildiği 52 infertil kadından oluşturuldu. Histerosalpingografide veya ultrasonografide hidrosalpinks, submüköz myom, endometrial polip, uterin sineşi gibi anormal uterin kavite görüntüleri olan, yapılan probe küretajlarda endometrit ve endometrial hiperplazi izlenen hastalar, anamnezlerinde geçirilmiş tromboemboli öyküsü olan, diabetes mellitus, tiroid fonksiyon bozukluğu, cushing sendromu gibi sistemik hastalıkları olan kadınlar çalışma grubuna alınmamıştır. B Grubu ise en az 1 yaşayan çocuğu olan, yaşları 25-38 arasındaki 50 sağlıklı gebeden oluşturuldu. Tıbbi genetik laboratuvarında trombofili mutasyon belirteçleri olan F5 Leiden mutasyonu G1691A, Protrombin2 gen mutasyonu (PTH2) G20210A ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzim mutasyonu (MTHFR) C677T açısından araştırıldı. Çalışmamızda istatistikî analizde ki-kare testi ve fisher'in kesin ki kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Her iki grupta tüm mutasyonların varlığı, MTHFR homozigot ve heterozigot varlığı, FV homozigot ve heterozigot varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Her iki grupta PTH2 mutasyonu görülmedi. A grubundaki hastaların yaş ortalamaları 33,3 +/- 7,6. B grubundaki hastaların yaş ortalamaları 29,2 +/- 3,7 (p= 1,03).

SONUÇ

Yaptığımız çalışmada tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ile trombofili arasında artan bir ilişki gösterilmedi.

SUMMARY

INTRODUCTION

Repeated IVF-ET failures have been attributed to either embryo quality and endometrial receptivity. Inherited thrombophilia has been associated with thromboembolism, recurrent pregnancy loss, and pregnancy complications such as abruptio placentae, preeclampsia, and intrauterine growth retardation, through placental thrombosis as a possible underlying mechanism. The current case-control study was conducted to investigate whether thrombophilia is more prevalent in women with repeated IVF-ET failures

MATERIALS AND METHODS

Group A was comprised of 52 consecutive women treated in IVF unit, aged 20–42. All the women in group A had a history of 3 or more failed IVF cycles in which at least three good quality (grades 1–2) embryos were transferred. The indications for IVF-ET were male factor, tubal factor and unexplained infertility. Group B was comprised of 50 consecutive apparently healthy women with at least one uneventful pregnancy naturally. Blood samples were analysed for inherited causes of thrombophilia. The thrombophilic markers were defined as Factor 5 leiden (G1691 A), Factor 2 Prothrombin (G20210A), Methylen –tetrahydrofolat Reductase (C677T).

RESULTS

The prevalence of factor 5, prothrombin and methylene-tetrahydrofolat reductase mutations was similar in 52 women who failed to achieve pregnancy after IVF and in control women. The thrombophilia rate (at least in presence of one mutation) in group A was 61,5% and in group B was 46,0% . there was no statistically significant difference between two groups for each parameters (p:0,116).

CONCLUSION

Our study shows that thrombophilia does not predispose to failure of embryo implantation.

KAYNAKLAR

1. Centers for Disease Control and Prevention(CDC): 1999 assisted reproductive success rates, National Summary and Fertility Clinic Reports, 2001.
2. Leach RE. Intensive hormone monitoring in women with unexplained infertility: evidence for subtle abnormalities suggestive of diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 1997;68:413–20.
3. Lass A. , Abrams DC, Krausz T, Lawrie H, Margara R. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women. *Hum Reprod*, 1997; 12:1028–31.
4. Veeck LL. The morphological estimation of mature oocytes and their preparation for insemination. In Jones HW Jr, Jones GS, Hodgen GD, Rosenvaks Z, (eds), *In Vitro Fertilization-Norfolk*. Baltimore: Williams&Wilkins 1986;81–86.
5. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO 2002; 102–125.
6. Schatcher M, Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Bern O, Ron-el R, Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase, a function of improved embryo quality, *J Assist Reprod Genet* 2001; 197:18-21.
7. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanağaoğlu K, Smitz J, Van Steirteghem A, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin-releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025–9.
8. Bungum L, Bungum M, Humaidon P, Anderson CY. The predictive value of sperm chromatin structure assay parameters for the outcome of IUI, IVF, ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401-8.
9. Schlafke S, Enders AC: Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *BiolReprod* 1975;12:41-65.
10. Chavez DJ: Cellular aspects of implantation. in van Blerkam, Motta PJ *Ultrastructure of Reproduction*. The Hague, martinus Nijhoff 1984;247–259.

11. Nikas G, Develioğlu OH, Toner JP, Jones Hw Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod*, 1999; 14 Suuple 2: 99-106. Review.
12. Turpeenniemi Hujanen T, Freinbirg R, Kauppile A. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995;64:132-136
13. Bhatt H, Brunet LJ, Stemart L. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coindes with onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11408–11412.
14. Seoud MA, Patterson R, Muasher SJ, Coddington CC, 3rd. Effects of myomas or prior myomectomy on in vitro fertilization (IVF) performance. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:217–21.
15. Stovall DW, Parrish SB, Van Voorhis BJ, Hahn SJ, Sparks AE, Syrop CH. Uterine leiomyomas reduce the efficacy of assisted reproduction cycles: results of a matched follow-up study. *Hum Reprod* 1998;13:192–7
16. Yaralı H, Bükülmez O. The effect of intramural and subserous uterine fibroids on implantation and clinical pregnancy rates in patients having intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266,30–3.
17. Anania CA, Stewart EA, Quade BJ, Hill JA, Nowak RA. Expression of the fibroblast growth factor receptor in women with leiomyomas and abnormal uterine bleeding. *Mol Hum Reprod* 1997;3:685–91.
18. Pabuccu R, Ceyhan ST, Onalan G, Goktolga U, Ercan CM, Selam B. Successful treatment of cervical stenosis with hysteroscopic canalization before embryo transfer in patients undergoing IVF: a case series. *J. Minim Invasive Gynecol* 2005; 12:436–8.
19. Mastrominas M, Pistofidis GA, Dimitropoulos K. Fertility Out come after Outpatient Hysteroscopic Removal of Endometrial Polyps and Submucous Fibroids. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3:S29.
20. Lass A, VWilliams G, Abusheikha N, Brinsden P. The effect of endometrial polyps on butcomes of in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:410–5.

21. Heinonen PK, Kuismanen K, Ashorn R. Assisted reproduction in women with uterine anomalies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;89:181–4.
22. Garcia-Velasco JA, Arici A. Surgery for the removal of endometriomas before in vitro fertilization does not increase implantation and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2004;81:1206-9.
23. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. The ineffective loading process of the embryo transfer catheter alters implantation and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2001 Sep;76(3):630–2.
24. Barri PN. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 2000 Mar;15(3):616–20.
25. Martinez F, Coroleu B, Parriego M, Carreras O, Belil I, Parera N, HereterL, Buxaderas R, Barri PN. Ultrasound-guided embryo transfer: immediate withdrawal of the catheter versus a 30 second wait. *Hum Reprod* 2001 ;16(5):871–4.
26. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels JMF, Eskes TKAB: Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1990;324:199–200
27. Nelen WLDM, Bulten J, Steegers EAP, Blom HJ, Hanselaar AGJM, Eskes TKAB. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000; 15:954–60
28. Meegdes BHLM, Ingenhoes R, Peeters LLH, Exalto N. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil steril* 1988;49:216–20
29. James SJ, Pogribna M, Melnyc S, Hine RJ, Gibson JB. Abnormal folat metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501
30. Booto LD and Yang Q. 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: *Am JEpidemiol* 2000; 151:862–77
31. Wong WY, Eskes TK, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hiperhomocysteinemia. *Teratology* 1999;60:253–7

32. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Stabellini G. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 2001;98:357-60
33. Carol J, Shirly A, A. Beresford, Gilbert S, Arno G, Motulsky. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049- 1057
34. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keeley EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;24; 7336
35. Andersen AN, Gianorolli L, Felberhaum R. , de Mouzon J and Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe. Results generated from European registers by Eshre. *Hum Reprod* 2005; 20:1158–1176.
36. E.J. Margolith, A. Ben-Chetrit, M. Gal, T. Elder Geva Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET Review *Hum Reprod* 2006 vol.21, No.12 pp.3036–3043
37. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, Lodigianni C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia *Haematologica* 2003; 88 : 789–93
38. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Rousev RG. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology. Reproductive BioMedicine Online*; Vol 12. No 3, 2006; 322–327.
39. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checchia MG, Gittadini E and Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertil Steril* 2001; 76: 201–5
40. Azem F, Many A, Yovel I, Amit A, Lessing JB and Kupferminc MJ increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* ,2004; 19: 368–370.
41. Glueck CJ, Awadalla SG, Phillips H et al. Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos and miscarriage. *Fertility and Sterility* 2000; 74: 394–397.
42. Gopel W, Ludqig M, Junge AK et al. Selection pressure for the factor V Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 358 2001; 1238–1239.

43. Nelen WL, Bloom HJ, Thomas CM et al. Methylene-tetra-hydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *Journal of Nutrition*, 1998; 128: 1336–1341.
44. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman, N, Many A, Barr-Am A, Jaffa A, Fait G and Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*, 1990; 340: 1584–1589.
45. Dizon-Townson DS, Meline L, Nelson LM, Varner M and Ward K. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol*, 1997; 177, 402–425.

TEŞEKKÜR

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalındaki, Kadın Hastalıkları ve Doğum ihtisasım boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerinden yararlandığım, anabilim dalı başkanı ve tez hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Çolakoğlu'na, asistanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve tecrübelerinden yararlandığım değerli öğretim üyelerim; Prof.Dr. M. Nedim Çiçek, Prof. Dr. Metin Çapar, Doç.Dr. Ali Acar Doç.Dr. Çetin Çelik, , Doç.Dr. Hüseyin Görkemli, Yrd. Doç. Dr. Kazım Gezginç, Yrd. Doç. Dr.Osman Balcı ve Yrd. Doç.Dr. Suna Özdemir'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İhtisasım süresince birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, kadın doğum anabilim dalı hemşirelerine ve personellerine teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen annem ve kardeşlerime teşekkür ederim.