

İMLANTASYON ZAMANINDA BAKILAN PINOPODE SKORU HORMON REPLASMAN TEDAVİSİ İLE YAPILAN DONDURULMUŞ EMBRİYO TRANSFERİNDE BAŞARILI İMLANTASYONU ÖNGÖRÜR

Çalışma sorusu: pinopode ölçümü prognostik değer taşıyor mu?

Cevap: pinopode ölçümü dondurulmuş embriyo transferinden sonra gebelik oluşması ile önemli ölçüde anlamlı bulunmuştur.

GİRİŞ

Pinopodlar endometrium yüzey epitelindeki sitoplazmik çıkıntılardır. Pinopodlar üzerlerinde reseptörleri bulunan progesteron bağımlı yapılardır. Bu sebeple reseptör markırı olarak düşünülmektedir. Pinopodların asıl fonksiyonu hala net bilinmemektedir, buna rağmen implantasyonun ilk aşaması olan embriyonun tutunmasını desteklemede rol oynadığı düşünülmektedir çünkü pinopodlar hem silyaların bilastokisti süpürmesini hem de uterin sıvının geri çekilmesi ve uterin kavitenin kapanmasını önlemektedir. Bazı araştırmacılar pinopodların başarılı implantasyonu öngörmede kullanılabileceğini düşünmektedirler.

İlk yapılan araştırmalarda pinopod çalışmalarının sınırlı ve tartışmalı olduğu vurgulanmıştır. birbirinden farklı birkaç önemli nokta bulunmaktadır. İlk olarak, pinopodların nasıl ölçüleceği le ilgili konsensus bulunmamaktadır. Birkaç önemli metod önerilmektedir. Bazı araştırmacılar pinopodlarla kaplı endometrium yüzey epitelini ölçmektedir, az sayıda araştırmacılar morfolojiye odaklansa da total pinopod sayısını ölçme girişiminde bulunmadılar, diğer araştırmacılar ise immünohistokimiyadaki H-skoruna benzeyen hem pinopod sayısı hem de morfolojisini değerlendiren bir skorlama sistemi geliştirdiler. Ayrıca, çoğu araştırmacı pinopodların ortaya çıkma ve yok olma zamanı üzerine odaklandılar. ikinci olarak, pinopod çalışmaları hakkındaki ilk raporlar hep subjektif ölçümleri baz alıyolardı. Gözlemcinin ölçtüğü pinopod sayılarının değişkenliği ile ilgili ve pinopod sayısı, subtipi ve gebelik sonuçları arasındaki ilişki ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Üçüncü olarak, pinopod oluşumunun progesteron bağımlı olduğu bilinmektedir ancak az sayıda çalışmada sadece endometriumun maruz kaldığı total progesteron miktarına değil aynı zamanda süresine de bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda LH piki veya ovulasyona göre endometrial örnek için uygun zamanı belirlemek ve endometrial örneğin elde edildiği gün progesteron düzeylerine bakmak oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, mevcut görüş insanlarda pinopod ölçümünün sınırlı olduğunu ortaya koyuyor. çok az merkez pinopod ölçümünü endometrial reseptiviteyi değerlendirmek için öneriyor. Bu nedenle son beş yılda bu konu hakkında yalnızca beş yayın olması sürpriz değildir.

Klinik olarak pinopod değerlendirilmesi gerekli olsun ya da olmasın pinopod ölçümü için geliştirilmiş metodların gerekli olduğunu düşünüyoruz. Bu çalışmada, morfometrik(kantitatif hitolojik) teknikler kullandık ve şunları rapor ettik: pinopodların total miktarının ve subtiplerinin ölçülmesi için kullanılan geliştirilmiş teknikler, (I)implantasyonu desteklediği kanıtlanmış olan hormon replasman tedavisi siklusu ile oluşturulan implantasyon penceresi ve (II) pinopod salınımı ile gebelik sonuçları arasındaki ilişkiye göre değişim göstermektedir.

MATERYAL VE METODLAR

Katılımcılar

Bu çalışmada iki ayrı grup bulunmaktadır. 46 katılımcıdan oluşan ilk grupta, hormon replasman tedavisinde 3-7 gün süreyle progesteron uygulanmasından sonra pinopodların farklı subgruplarındaki günlük değişimler değerlendirildi. 126 katılımcıdan oluşan ikinci grupta ise pinopod sayımının prognostik önemine bakıldı. 172 katılımcının hepsi bu çalışmaya dahil edildi. Bu katılımcıların hepsi mart 2014-ocak 2016 tarihleri arasında Sir Run Run Shaw Hastanesi Üreme Merkezinde IVF tedavisi alanlardı. Katılımcılarda bakılan kriterler ise : (I) IVF tedavisini takiben dondurulmuş embriyo transferi yaptırmak; (II) 25-36 yaş arasında olmak; (III) düzenli menstürel siklusuna sahip olmak(25-35 gün). Pcos , endometriozis, hidrosalpenks ve uterin patolojisi olması ve 3 ay içinde steroid tedavisi almış olması ise dışlanma kriterleri olarak alındı.

Hormon replasman protokolü ve endometrial biyopsi

İlk grupta 46 katılımcı bulunmaktadır. bu katılımcılara önceden belirlenmiş bir protokole göre siklik olarak HRT tedavisi verildi. Estradiol valerate şeklindeki oral östrojen tabletleri 6 mg/gün dozunda mensturasyon siklusunun 2. veya 3. gününden itibaren yedi gün boyunca GnRH analogu olmaksızın verildi, sonrasında doz 7-10 gün arası için 8 mg/güne çıkarıldı. Endometrium kalınlığı 8 mm geçtiğinde, 80 mg/gün progesteron enjeksiyonu 3-7 gün arasında uygulandı. Pinopod ölçüm için alınan endometrial biyopsiler son progesteron enjeksiyonunun yapıldığı günün sabahında pipelle kateteriyle yapıldı.

ikinci grupta 126 hasta bulunmaktadır.hepsine aynı hormon replasman tedavisi ve 6 gün 80 mg/gün progesteron verildi. Endometrial biyopsiler pipelle kateter kullanılarak yapıldı. Sonra, HRT sikluslarını takiben 126 hastaya 3 gün progesteron desteğinden sonra 3. günde dondurulup çözülmüş(6-8 hücre aşamasında) embriyo transferi yapıldı. Östrojen-progesteron tedavisi gebelik oluşmazsa 2 hafta, oluşursa 7 hafta boyunca verildi.

Elektron mikroskopik tarama

Tüm toplanan örnekler 0.1 M foffat tamponu (Ph: 7.4) içinde 1 saat bekletildi. Sonrasında örnekler alkol kullanılarak dehidrate edildi.

Pinopodların görüntülenmesi

Tüm örnekler Olympus mikroskop ile değerlendirildi. Her biyopsi için 60 dan fazla sahada x2000 büyütme ile Nikon dijital kamera ile görüntü alındı. Randomize seçilen yüzey epiteli içeren sahalarda J software kullanılarak pinopod ölçümü yapıldı. yapılan hücre sayımında 3 farklı tip pinopod bulundu, gelişmiş pinopodlar (DP), tam gelişmiş pinopodlar (FDP) ve regrese olan pinopodlar (RP). Tüm ölçümler tek gözlemci tarafından yapıldı ve gözlemci gruplar ve gebelik sonuçları hakkında bilgilendirilmedi.

Sayılacak pinopod alanlarının minimum sayısının belirlenmesi

Gözlemciye bağlı değişkenliği tam olarak ölçmek için ilk önce uygun alanların belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmanın ilk kısmında pinopodlar ardışık 60 sahada sayıldı. ilk sahadaki tam gelişmiş pinopodların tüm pinopodlara oranı tek ölçüm olarak kaydedildi. Sonra, 1 ve ikinci sahalardaki ortalama pinopod sayıları kaydedildi. Benzer şekilde her ardışık sahadaki FDP/TP oranı bir ortalama elde etmek için kaydedildi. Güvenilir sonuç elde etmek için gereken nihai alan sayısı toplam alanların %5 olarak kabul edildi.

Gözlemci içindeki değişkenlik

Çalışmanın ilk kısmında, gözlemciler arasındaki değişkenlik, gözlemci tarafından bilinmeyen randomize seçilmiş 10 örneğin tekrar tekrar aynı gözlemciye ölçtürülmesi ile belirlendi.

Geliştirilmiş teknikleri kullanarak pinopode ölçümü yapmanın prognostik değeri

Çalışmanın ikinci kısmında, dondurulmuş embriyo transferi(FET) yapılan 126 hasta toplandı. Tüm hastalara HRT replasmanı verildi ve 6 gün progesteron enjeksiyonundan sonra pinopod ölçümü için endometrial alındı. Sonradan HRT replasmanından sonra FET yapıldı. FET sonuçları kaydedildi.

SONUÇLAR

Pinopod ölçümündeki üç subtipteki değişken parametreler

Demografik faktörler

Çalışmanın ilk kısmında 46 hasta mevcuttu. Demografik özellikler ve üreme öyküsü ;yaş, BMI, önceki gebelikler, parite, infertilite süresi, infertilite nedeni ve bazal hormon düzeyleri Tablo I de gösterilmiştir. Pinopodların 3 subtipinin örnekleri de şekil 2 de gösterilmiştir.

Pinopod sayımı için alanların belirlenmesi

10 endometrial doku örneğinde her mikroskopi sahasındaki FDP sayısının TP sayısına oranı belirlendi. 3 adet örnekteki sonuçlar şekil 3 de gösterildi. Bu 10 vaka arasında, nihai ortalamanın belirlenmesi için incelenmesi gereken minimum alan sayısı 60 olduğu belirlendi. Yetersiz pinopod sayımları nedeniyle örnekleme hatasını azaltmak için tüm örneklerde bu yöntem uygulandı.

Gözlemciye bağlı değişkenler

Gözlemciye bağlı değişkenlikleri belirlemek için randomize seçilmiş 10 örnekte yapılan il ve tekrarlayan pinopod ölçümleri tablo 2 de gösterildi.

P+3 ve P+7 günleri arasındaki pinopodlarda oluşan sayı ve şekil değişiklikleri

Pinopod sayısını ve subtiplerini belirlemek için 46 hastada morfolojik teknikler uygulandı(şekil 4). Total pinopod sayısı P+6 ya kadar yükselip pik yapıyor sonrasında P+7 de hafifçe düşmeye başlıyor. Fakat direkt bir günlük değişiklik bulunmuyor. DP/TP oranı P+5 de düşmeye başlıyor ve P+6 ya kadar düşmeye devam ediyor. FDP/TP oranı P+5 de hızla yükselmeye başlıyor , P+6 da pik yapıyor ve P+7 de hızla düşüşe geçiyor. RP/TP oranı P+6 dan itibaren hızla yükselişe geçiyor ve P+7 de pik yapıyor.

Pinopod sayısının prognostik önemi

Çalışmanın ikinci aşamasında yine morfolojik teknikler J programı kullanılarak pinopod sayısı ve subtiplerini değerlendirmek için kullanıldı. 126 hastadan alınan spesmenlerin herbirinde en az 60 alan değerlendirildi.

Demografik özellikler

Tablo 3 de gebe ve gebe olmayan grup arasındaki demografik özellikler, klinik detaylar ve pinopod sayıları karşılaştırıldı. Yaş, infertilite süresi, bazal hormon düzeyleri, embriyo transfer (ET) günündeki hormon düzeyleri, et günündeki endometrial kalınlık, transfer edilen embriyo sayısı ve embrio kalitesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Gruplar arasındaki pinopod yüzdelerinin karşılaştırılması

Gebe ve gebe olmayan hastalar arasındaki üç pinopod subtipi yüzdeleri Tablo 3 de karşılaştırılmıştır. RP/TP oranı açısından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır, ama gebe kalan hastalarda gebe olmayanlarla karşılaştırıldığında ciddi anlamda FDP/TP oranı yüksek, DP/TP oranı düşük bulunmuştur

Pinopod indeksinin prognostik değeri

Gebe kalmak yüksek FDP/TP oranı ve düşük DP/TP oranı ile ilişkili bulunmuştur, Her FDP yüzdesine +1, her DP yüzdesine -1 puan vererek bir pinopod indeksi oluşturduk. İki gruptaki hesaplanan skorlar Tablo 3 de karşılaştırılmıştır. Şekil 5 de ROC eğrisini kullanarak, en yüksek spesifite ve sensivitedeki pinopod sayısı kesişim değeri -26.48 bulunmuştur. Normal ve ya yüksek pinopod skoru olan kadınlardaki gebelik oranı ve embrio transfer oranı düşük pinopod skoru olanlara göre da yüksek bulunmuştur.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, implantasyon penceresinde HRT siklusundaki pinopodların değişim patternini morfolojik teknikler kullanarak gösterdik. önceki raporlardaki, aynı spesmen içinde farklı sahalarda bile pinopod sayısında anlamlı biyolojik varyantlar olduğunu çalışmalarımızda da gösterdik. Bu yüksek orandaki varyantların sonucu olarak, güvenilir sonuçlar elde etmek için en az 60 mikroskopik sahaya bakılmasının gerekli olduğu görüldü. HRT sikluslarında progesteron tedavisinin altıncı gününde elde edilen spesmenlere dayanılarak, gebe kalanlarda gebe kalamayanlara göre daha yüksek FDP/TP ve daha düşük DP/TP oranları olduğunu gördük. Buna rağmen RP/TP oranı gebe kalan ve kalmayan grupta anlamlı düzeyde farklı bulunmadı.

Bu çalışmadan çıkarılan sonuç, her hastanın aynı HRT tedavisini almasına rağmen düşük implantasyon ve gebelik oranlarının olmasının artmış DP ve azalmış FDP oranlarıyla ilişkili olduğu, altta yatan patolojinin endometrial dokunun progesteron yanıtının azalması olduğu, bu sorunun progesteron dozunun ve süresinin artırılarak veya embriyo transferinin zamanının endometriumun yavaş gelişmesi nedeniyle bir ve ya iki gün geciktirilmesi ile çözülebileceğidir.

Biz bu çalışmada ilk kez endometriumdaki pinopodları morfoloji analiz teknikleri ortaya koyduk. Ayrıca implantasyon penceresinde, pinopodların subtiplerinin günlük değişiminin nasıl olduğunu daha net bir şekilde kantitatif olarak gösterdik. Bu çalışmanın kısıtlamalarından biri tek bir deneyimli gözlemci olmasıydı.

Önceki çalışmalardaki gibi biz de insanlardaki pinopodların farelerdeki benzer olarak 5 veya daha fazla gün bulunduğunu, farelerdeki 24-48 saatten daha fazla varlıklarını sürdürdükleri gözlemledik. Pinopodlar implantasyon penceresinin dışında ve gebelik boyuncada gözlemlendi, ancak klinik olarak endometrium reseptivitesinin markırı olarak kullanılacak kadar anlamlı bulunmadı, ayrıca implantasyon penceresi ve gebelikteki pinopodların sayı ve subtiplerinin diğerlerinden farklı olduğu görüldü.

Pinopod ölçümünün klinik faydaları önceki yayınlarda da gösterilmişti, hatta iki yayın dondurulmuş embriyo transferinde gebelik sonuçlarını artırmak için HRT FET siklusunda progesteron tedavisinin süresini belirlemede pinopod ölçümünün yapılmasını öneriyor. Ancak bu iki yayında da pinopod değerlendirilmesi subjektif yapılmıştır bu yüzden sonuçlar kolaylıkla yanlış değerlendirilebilir. Bizim çalışmamızda, gebe kalan ve kalmayan grup arasındaki pinopod subtiplerinin değerlendirilmesinde farklı bir yaklaşım uyguladık. Bu yöntemle implantasyon ve gebelik oranın yüksek FDP/TP ve düşük DP/TP oranı ile ilişkili olduğunu gösterdik.

Literatürde bulunan üç adet pinopod skorlama sistemi bulunmaktadır. bu üç skorlama sistemi hakkında üç önemli durum bulunmaktadır. ilk olarak bu skorlamalar semi-kantitatifdir. ikinci olarak bu skorlar ya total pinopod sayısı ya da pinopod subtiplerini değerlendirmektedir, ancak her ikisini birlikte değerlendiren skor bulunmaktaydı. Üçüncü olarak bu skorlamalar klinik sonuçlar ile değerlendirilmemektedir.

Bu çalışmada, biz yapay sikluslardaki implantasyon penceresinde pinopodların subtipleri ve sayılarındaki değişimi değerlendirmeyi seçtik. Pinopod gelişimi progesteron bağımlı olduğu için,

naturel veya sitümüle edilmemiş sıkluslardaki pinopod değişimlerinin gözlemlenmesinin çok daha faydalı olacağını düşünöyoruz.

Aynı HRT tedavisini alan kadınlarda, HRT ye endometrial cevabın kişiden kişiye değişmesi sebebiyle pinopod sayısı ve paterninin aynı olmadığı göröldü. Bunun mühtemel sebepleri; progesteron reseptör üretimindeki farklılıklar, immünolojik faktörler, plasma veya natural killer hücrelerinin miktarı, epigenetik değişiklikler, enometrial kan akımı. Bu önemli faktörler gelecek çalışmalar için ilgi çekici olabilir.

Bu çalışmada gözlemciye bağlı değişikleri gösterdik ancak tek bir deneyimli gözlemcimiz olması sebebiyle gözlemciler arası farklılıkları gözlemleyemedik. Şayet birden fazla gözlemcinin olduğu değerlendirmeler yapılıyorsa veya çok merkezli çalışma yapılıyorsa bunu değerlendirmek gerekmektedir. Pinopodların değerlendirilmesi özellikle DP-FDP kategorizasyonu gibi çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek değerlendirmelerin yapılması subjektif ve gözlemciye bağlı değerlendirmelerdir.

Bu çalışmadaki bulgular gösteriyor ki; mevcut görüşün aksine, pinopod sayısı ve morfolojisi klinik açıdan belirteç olarak kullanılamaz. çünkü, pinopod değerlendirmesi zaman alır ve subjektiftir, klinik pratikte kullanılmadan önce bunun için düzenlemeler yapılmalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada pinopodların morfometrik analiz sonuçlarını, implantasyon penceresindeki subtipleri ve günlük değişimlerini gösterdik. Pinopod ölçümünün klinik önemini daha önceki çalışmalarda da gösterilmişti, biz de karma skorlama sistemini kullanarak pinopod ölçümünün HRT sıklusunda FET ile gebe kalma başarısıyla ilişkili olduğunu gösterdik.