**Başlık: Biyokimyasal belirteç çözünür İnsan Lökosit Antijen G (sHLA-G)’ nin yardımcı üreme tekniklerinde gebelik oranları üzerine etkisi-çok merkezli çalışma**

**Yazarlar ve Enstitü:** Kotze D, Kruger TF, Lombard C, Padayachee T, Keskintepe L, Sher G. Fertil Steril. 2013 Nov;100(5):1303-9. Jones Institute, Norfolk, Virginia.

**Orijinal Başlık:** The effect of the biochemical marker soluble human leukocyte antigen G on pregnancy outcome in assisted reproductive technology-a multicenter study.

**ÖZET:** Soluble HLA-G ekspresyonı IVF sonuçlarını arttırmak ve çopul gebelikleri azaltmada kullanılabilecek non-invazif değerli bir embriyo belirtecidir

Günümüzde IVF başarı oranlarını arttırmak ve çoğul gebelik riskini azaltmak için en kaliteli embriyonun tespiti ile ilişkili çalışmalar yapılmaktadır. Embriyonun implantasyonu için maternal immün sistemin başarılı bir şekilde baskılanması gerekmektedir. Emriyonun ekstra villöz sitotrofoblastları tarafından salınan HLA-G, maternal uterin lenfositlerin embriyoya karşı toleransını sağlayarak fetüsü annenin immün yanıtından korur. HLA-G’nin gebeliğin ilerleyen haftalarında plasenta ve amniyon sıvısında olduğu tespit edilmiştir.

sHLA-G kültür ortamında saptanabilen, membran baglantılı HLA-G izoformudur. Bu nonspesifik tip 1 HLA ilk olarak 1996’ da Jurisicova’ nın çalışmalarında embriyo ve blastokistlerin kültür ortamında tespit edilmiştir. Menıcucci 3. gün embriyoların kültürlerinde sHLA- G’ i ilk tespit eden araştırmacı olmuştur. Fuzzi ve arkadaşları 3. gün embriyoların kültürlerinde sHLA- G varlığının embriyoların bölünme hızı ve implantasyon potansiyeli ile korele olduğunu göstermişlerdir. 2004 yılında Hviid ve Saita konseptus materyalinin immün cevaptan korunmasında sHLA-G’ nin rolü olduğunu dile getirmişlerdir.

Bu çok merkezli retrospektif çalışmada, invitro ortamda çözünür HLA-G varlığının implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Altı sertifikalı invitro fertilizasyon (IVF) ünitesinde 2040 hastaya uygulanan ICSI’ lerden elde edilen embriyolar çalışmaya dahil edildi, IVF öncesi tüm hastalara 1-3 haftalık oral kontraseptif kullanımı sonrası Lupron desteği ile uzun protokol uygulandı.

Rekombinant-FSH (225-450 İU/Gün ) ile follikul stimülasyonu yapılıp en az 2 follikül ≥18 mm ve diğer yarısı ≥ 15 mm olduğunda ovulasyon tetiği çekilerek, oositler transvajinal USG ile 34.5’inci saatte toplandı. Tüm metafaz II oositlere 4-6 sonra ICSI işlemi uygulandı ve ardından kültür ortamına alındı. Embriyolar ICSI sonrası 72. saate kadar GES skorlamasına göre incelendi.

Tüm merkezlerde kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, yumurta toplama işlemi ve embriyo transferi aynı klinisyen tarafından yapıldı, çalışmaya alınan hastaların yaşlarına bakılmaksızın embriyo kültürleri HLA-G’ nin pozitif ve negatifliğine göre değerlendirildi. sHLA-G tüm kliniklerde ICSI sonrası 48. saatte embriyo kültüründe bakılarak pozitif bulunanlar 3. gün transfer edildi.

Embriyoyu çevreleyen kültür ortamında eksprese olan HLA-G’ nın optik yoğunluğu 0.190 -0.006 (geometrik ortalama) aralığında ise pozitif ve bu dansite aralığının dışında ise HLA-G negatif kabul edildi. Embriyonun etrafındaki kültür ortamında sHLA-G salınımını tespit etmek için kemiluminesans enzim bağlantılı immunosorbent kullanıldı, transfer için embriyo seçimi; pozitif sHLA-G ve GES skoru > 70 olanlar veya sHLA-G sonucu negatif ise embriyo morfolojisine göre yapıldı. Tüm kliniklerde sHLA-G pozitifliği ile devam eden gebelik oranları arasında ilişki tespit edilirken, embriyo transferi, kliniklerin tercihine göre 3. gün ( ICSI’den 70-72 saat sonra) veya blastokist transferi (84-96 saat sonra) ultrason eşliğinde, Wallace kateteri kullanılarak yapıldı.

Gebelik testi; serum β-HCG seviyeleri yumurta toplama sonrası 11-13. günlerde bakıldı, > 5 ünite çıkıp ikiye katlanan değerler pozitif kabul edildi. Gebelikler, kimyasal (transfer sonrası 10. günde pozitif β-HCG, klinik gebelik (kese+ fetal kalp atımı) ve devam eden gebelik ( 10-12. gebelik haftası) olarak sınıflandırıldı.

Tüm embriyolar birbirinden ayrı olarak 35 ml miktarındaki PI (Irvine scientific) solusyonu içerisinde % 10’ luk serum desteğiyle kültüre edildi. ICSI sonrası 44-46. saatlerde embriyoyu çevreleyen kültür ortamının optik yoğunluğuna bakılarak sHLA-G tespiti yapıldı. Kültür ortamında elde edilen bu solüsyondan 0.5 ml örnekler mikrosantrifüj tüplerine alınıp -20 derecede dondurularak ELİSA yöntemi ile sHLA- G varlığını tespit için Las Vegas taki merkeze gönderildi.

İstatistik; tüm veriler STATA 12 programı ile analiz edildi. Lojistik regresyon modellerinde karışık etkiler: kimyasal gebelik, klinik gebelik, implantasyon oranları ve devam eden gebeliklerde tek tek ortalama yaş ve ortalama embriyo sayısı kontrolü altında veriler incelenip analiz edildi. Poisson regresyon modellerinde karışık etkiler; klinik olarak implante olmuş gestasyonel kese ve 3. günde transfer olup devam eden embriyo keselerinin verileri üzerinden analiz yapıldı. Bagımlı t – testi 3. gün transfer sonuçlarında ortalama yaş ve sHLA-G’ nin arasındaki ilişkiyi saptamak için yapıldı ve P< 0.05 istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar: Çalışmaya katılan 3036 kadının 2040’ ünde sHLA-G tespit edilip bunların 1797’ inde embriyo transferi 3. günde yapıldı. Ortalama olarak hastaların yaşı 35.7 (SD+-1.7 ), embriyo sayısı 2.9 (SD+-0.8 ) idi. Karışık etkili lojistik regresyon modeli, sHLA-G sonucunun implantasyon oranları, kimyasal gebelik, klinik gebelik ve devam eden gebelik oranları ile ilişkili olduğunu gösterdi. Pozitif sHLA- G sonuçları artmış kimyasal gebelik (OR 2.62;% 95 güven aralığı; 2.14-3.22, p <.001), klinik gebelik ( OR 2.72; ;% 95 güven aralığı; 2.22-3.33, p <.001) ve devam eden gebelik oranları (OR 3.56; ;% 95 güven aralığı; 2.88-4.40, p <.001) oranları ile ilişkili idi. Karışık etkili poisson regresyon modeli ortalama yaş –sHLA-G sonuçları ile klinik gebelik, devam eden gebelik oranları arasında ilişki saptadı. sHLA –G + olan grupta klinik gebelik oranları sHLA- G (-) olan gruba göre 2.5 kat fazla tespit edildi. Tüm embriyolar bireysel olarak kültür ortamında izlendi.

Tartışma; Çalışmada sHLA-G’ i pozitif olan ve 3. günde transfer edilen embriyoların gebelik oranlarının sHLA-G negatif olan embriyoların gebelik oranlarına nazaran 2.52 kat fazla olduğu tespit edildi. Bu oran Kotzenin prospektif-randomize-kontrollü çalışmasının verileriyle uyum göstermekte ve sHLA-G pozitif embriyoların gebelik oranlarının daha yüksek oldugunu göstermektedir.

Çalışmanın limitleri; Retrospektif bir calışma, tüm kliniklerde embriyo transferi 3. günde yapıldı ama kliniklerin ikisinde 5 ve 6. günde de embriyo transferi yapıldı. Bu embriyo transferi standardizasyonunu bozdu. Bu sebeple sadece 3. gün transfer edilen embriyoların verileri kullanıldı. Tüm merkezler aynı sHLA-G preparatını kullandı ama aynı laboratuvar koşullarının sağlanmasında zorluklar yaşandı. İşlemler iki laboratuvarda yapıldı. Merkezlerin hepsi gebeliklerin doğumla sonuclanmasını takip etmedikleri için devam eden gebelik seklinde bir parametre oluşturuldu. sHLA-G tespitinde kullanılan optik yoğunluk (OD) daha önce hiç çalışılmamıştı. Bu konu üzerinde bir konsensüs yoktu.

sHLA-G pozitif durumlarda transfer edilecek embriyo sayısına dikkat edilmelidir. Çalışmamızda artmış coğul gebelik oranı çıkmamış olsada teorik düşüncede bu risk mevcuttur, bu durumu engellemek için sHLA-G pozitif embriyoların morfolojik olarak incelenmesi sonrası transfer kararı alınması ve sayısı belirlenmelidir. Cohrane derlemesinde Blake ve arkadaslarının blastokist evresinde yapılan transferler sonrası gebelik oranlarının daha yükek oldugu belirtilmiş. Bu konudaki düşünce sHLA-G taramasıyla kombine edilen blastokist evresindeki transferlerin olumlu sonuçları olabileceği yönündedir.

Çalışmanın önerileri; ileride yapılacak çalışmalarda klinikler arası IVF tedavisinde embriyo secimi sırasında, sHLA-G kültürü standardizayonu sağlanması önerilir. sHLA-G gebelik verilerini incelemede değerli bir noninvaziv embriyo belirtecidir ve istenmeyen çoklu gebeliklerin önlenmesinde yardımcı olabilir. Oluşan gebeliklerde amniyon sıvısındaki sHLA-G oranları incelenebilir. Embriyo transferi günlerine göre ileri değerlendirmeler yapılabilir.