

IVF Ünitelerine Yönelik İmmunolojik Testler

Gebelik kayıplarına, infertiliteye ve tüp bebek uygulamalarında başarısızlığa yol açan bir çok neden bulunmaktadır. Çalışmalar düşüklerin birçoğunun kromozom (genetik) anomalilerine bağlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanında anatomik anomaliler, hormonal nedenler, enfeksiyonlar ve immunolojik faktörler gibi anne ve baba adayına bağlı problemler ve

çevresel faktörler de tekrarlayan düşüklere neden olabilir. Son yıllarda immünoloji alanındaki gelişmelerle birlikte yapılan araştırmalar, nedeni bilinmeyen düşüklerin % 80'inin immunolojik faktörlere bağlı olabileceğini ve bunların birçoğunun yeni tedavi yöntemleri ile önlenebileceğini göstermiştir.

IVF Tarama Paneli

- İnfertilite tedavisinde IVF seçeneğine başvuran ve tek erkek faktörüne bağlı infertilite gelişmemiş olgularda, immunolojik risk faktörlerinin daha yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir. Kadına bağlı bir neden ya da açıklanamayan infertilite olgularında, IVF siklusuna başlamadan önce tedavi edilebilecek özellikle olan muhtemel implantasyon başarısızlığına yol açacak immunolojik faktörleri araştırmada kullanılabilecek testlerdir.
- Endometrioz, pelvik yapışıklıklar, açıklanamayan infertilite, tekrarlayan spontan düşüklere ve ailede otoimmün hastalık bildiren kadınlar önce rutin kısıtlı sayıda tarama testinden geçirilmelidir. Ancak hasta anamnezine bağlı olarak hastaya özgün immunolojik testler yapılması gereklidir.

Panel İçeriği

- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardiolipin IgG ve IgM Antikorları
- Anti-Tiroid antikorlar (ATA)
- NK Aktivasyon Testi

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 1 adet
- 4.5 ml mor kapaklı (EDTA) tüp 1 adet

Gebelik İzleme Paneli

- Gebeliklerin kaybında immunolojik faktörlerin de etkin olduğu düşünüldüğünde, daha sonra oluşan gebeliklerde takibin doğru yapıldığından emin olunması için yapılan analizlerdir.

Panel İçeriği

- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardiolipin IgG ve IgM Antikorları
- Reprodüktif İmmunofenotip (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, CD56)
- APTT
- Trombositler

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 1 adet
- 4.5 ml yeşil kapaklı (Heparin) tüp 1 adet
- 4.5 ml mavi kapaklı (Sitrata) tüp 1 adet
- 4.5 ml mor kapaklı (EDTA) tüp 1 adet

Tekrarlayan Düşükler İçin Panel

• Gebeliğin I. Trimestrinde iki yada daha fazla istenmeyen düşük ya da II. ve III. Trimestirde düşük olması tekrarlayan düşük olarak tanımlanmaktadır. Tekrarlayan düşükler için genellikle uterusda anatomik anomaliler ya da hormonal yetmezlikler neden olsa da ana nedenler arasında kromozom anomalileri ve immunolojik etkenler de bulunmaktadır. Tekrarlayan düşükler için uygulanan bu panel bu duruma neden olabilecek immunolojik faktörün tanımlanmasını sağlamaktadır.

Panel İçeriği

- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardioliipin IgG ve IgM Antikorları
- Antinükleer antikorlar (ANA)
- Antitiroid antikorlar (ATA)
- İmmunoglobulin panel
- Reprodüktif İmmunofenotip (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, CD56)
- NK Aktivasyon Testi (NK Sitotoksosite Testi)
- Lupus Antikoagülan (LAC)
- Lökosit Antikor (LAD)
- APTT
- PT

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 1 adet
- 4.5 ml yeşil kapaklı (Heparin) tüp 2 adet
- 4.5 ml mavi kapaklı (Sitrata) tüp 2 adet
- 4.5 ml mor kapaklı (EDTA) tüp 1 adet

Prematür Over Yetmezliği Paneli

• 40 yaşa yakın dönemde over fonksiyonlarının azalmaya başlamasına prematür over yetmezliği adı verilmektedir. Antifosfolipid Antikorlar (APA) -Antikardioliipin Antikorları IgM ve IgG, antinükleer antikorlar (ANA), antitiroid antikorlar (ATA) ve antiover antikorları (AOA) prematür over yetmezliği ile ilişkili otoantikorlar oldukları bildirilmektedir. Over fonksiyonlarını tam olarak inceleyebilmek için İnhibin B testi de bu panele eklenmiştir.

Panel İçeriği

- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardioliipin IgG ve IgM Antikorları
- Antinükleer antikorlar (ANA)
- Antitiroid antikorlar (ATA)
- Antiover antikorları (AOA)
- İnhibin B

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 1 adet

Over Kapasite Ölçüm Paneli

• Over kapasitesi ölçümü gonadotropin uyarısına yanıt olarak normal embriyolar oluşturabilme yetisi olan yeterli sayıda kaliteli yumurta üretme kapasitesini belirtmek için kullanılmaktadır. İnhibin B serum konsantrasyonunun ölçümü siklusun 3. gününde yapılan FSH (Folikül Stimülan Hormon) ve E2 (Estradiol) ölçümleri ile birlikte over kapasitesinin ölçümü için bilgi sağlamaktadır. İnhibin-B granülosa hücrelerinden sekrete edildiği ve pitüiter glanddan FSH salınımını kontrol ettiği için follikül fonksiyonunu saptamada doğrudan etkili bir ölçütüdür.

• Antiover antikorları (AOA) taşıyan kadınların IVF/ET sonrası gebe kalma oranları taşımayanlara göre daha düşüktür. Pozitif AOA olmasının gebeliğin başarısız olması için prediktif değeri %82 olarak bildirilmektedir.

Panel İçeriği

- Antiover Antikorlar (AOA)
- İnhibin B
- FSH (Folikül Stimülan Hormon)
- LH (Luteinizan Hormon)
- E2 (Estradiol)

NOT: Bu hasta grubundan istenildiği takdirde over aspirasyonlarından granülosa hücreleri için DNA içerik analizi ve apoptosis tayini yapılması mümkündür.

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 3 adet

Endometrioz Paneli

• Endometrioz infertilite ile sık görülen bir jinekolojik hastalıktır ve infertilite nedeni de olabilmektedir. Endometrioz patogenezi ve patofizyolojisinde immunolojik mekanizmaların rolü olduğuna dair giderek artan kanıtlar saptanmaktadır. Endometriozlu hastalarda izlenen immunolojik değişiklikler B lenfosit yanıtında abartılı bir artış olması ile ilişkilendirilmektedir.

Panel İçeriği

- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardiolipin IgG ve IgM Antikorları
- Antinükleer Antikorlar (ANA)
- Ca 125
- Soluble CD23

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 3 adet

Tablo1: Bu testler için aşağıda belirtilen tablodaki duyarlılık, özgünlük, negatif ve pozitif prediktif değerler bildirilmektedir.

	Duyarlılık	Özgünlük	Prediktif Değer	
			Negatif	Pozitif
Sadece Ca125	% 93	% 54	% 65	% 93
Sadece sCD23	% 90	% 45	% 36	% 93
CA125+sCD23	% 90	% 63	% 72	% 86
CA125+sCD23+APA+ANA	% 90	% 67	% 76	% 86

Koagülasyon Paneli

• Tekrarlayan düşükler dolaşımda olan antikoagülanlara bağlı da gelişebilmektedir. Lupus-Like antikoagülanı dolaşımda aktive parsiyel tromboplastin zamanının (APTT) uzamasına yol açmaktadır.

Panel İçeriği

- Lupus Antikoagülan (LAC)
- Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT)
- Protrombin zamanı

Örnek Özellikleri

- 5 ml mavi kapaklı (Sitrata) tüp 3 adet

Tromboz Paneli

• Trombofili de tekrarlayan düşükler için risk faktörlerinden birisidir. Tekrarlayan düşüklerde trombozun; endotel hücrelerin aktivasyonu, doğal antikoagülasyon yollarında defekt olması ve trombositlerin tromboksan üretiminin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Antifosfolipid antikorlar, endotel hücre yüzeyini aktive ederek hücre yüzeyini tromboze durumdan trombojenik hale geçirmektedirler.

• Yüzeysel tromboemboli için kalıtsal geçiş en sık görülen kalıtsal defekt Aktive Protein C Rezistansıdır (APC-R). Olguların çoğunda (> %90) APC-R, koagülasyon faktörü kodlayan gen olan Faktör V, Faktör V von Leiden geninde bir nokta mutasyon olması sonucu oluşmaktadır. Heterozigot Faktör V taşıyanlarda venöz tromboembolik durum ortaya çıkması üç ile beş kat daha fazla oranda izlenmektedir, tekrarlayan düşük olgularında hastaların %8'inde bu olgu gözlenmektedir.

• Hiperhomosisteinemi arteriyel ve venöz tromboz için major risk faktörü olarak gösterilmiştir. Homosisteinin remetilasyon yolunda görevli olan Metilen-tetrahidrofolat-redüktaz (MTHFR) geninde C677T polimorfizmi ile plazma total homosistein düzeyleri arasında bir ilişkinin varlığı bulunmuş ve venöz trombozu olan hastaların %11 ile arteriyel trombozu olan hastaların %19'unda bu polimorfizm tespit edilmiştir.

Panel İçeriği

- MTHFR (Metilen-tetrahidrofolat-redüktaz) (C677T) Mutasyonu
- Faktör V Leiden Mutasyonu (Q506) (APC Genotipi)
- Faktör II Mutasyonu (G20210A)
- Anti-Fosfolipid Antikorlar (APA), Anti-Kardiolipin IgG ve IgM Antikorları
- Lupus Antikoagülan (LAC)
- Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT)
- Protrombin zamanı (PT)
- Trombosit Sayımı

Örnek Özellikleri

- 10 ml kırmızı kapaklı tüp 1 adet
- 4.5 ml mavi kapaklı (Sitrata) tüp 2 adet
- 4.5 ml mor kapaklı (EDTA) tüp 3 adet

Semen Analizi

- Semen örneklerinde konsantrasyon, hareketlilik ve canlılık ölçümleri yapılması, sperm analizi için WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yayınlanan 'WHO Laboratory Manuel for the Examination of Human Semen and Servical Mucus Interaction' kitapta bildirilen testlerdir.
- ASA (Anti Sperm Antikorlar) sperm yüzeyinde otoantikorlar (IgG, IgM) olup olmadığının araştırılması için kullanılmaktadır.
- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) sperm kromatin bütünlüğünün acridine orange isimli boya ile araştırılmasıdır. İnsitu ortamda düşük pH'la indükte edilebilen DNA denatürasyonuna sperm DNA'sının duyarlılığının ölçüldüğü bu yöntem; WHO tarafından kabul edilen sperm konsantrasyonu, morfoloji ve vitalite parametreleri ile korelasyon göstermeyen, tek başına anlamlı bilgi sağlayan, bağımsız bir "predictive" parametredir.

Panel İçeriği

- Sperm Konsantrasyonu Ölçümü
- Sperm Hareketliliği Ölçümü
- Canlılık Ölçümü
- ASA (Antisperm Antikorları)
- Acrozom Reaksiyonu (MCP, CD46)
- İnhibin B
- SCSA (sperm Chromatine Structure Assay)

Örnek Özellikleri

- 2-7 günlük cinsel açıklık sonrası alınmış semen örneği
- Tüm örneklerin en geç bir saat içinde laboratuvara ulaştırılması, mümkünse laboratuvarında örnek verilmesi gereklidir.
- SCSA için örnek laboratuvarımız tarafından sağlanan TNE Buffer içinde ve uygun hazırlık aşaması sonrasında gönderilmelidir.

Uygulanan Testler İle İlgili Genel Bilgiler

APA (Anti-Fosfolipid Antikorlar)

- Antifosfolipid antikorlar organa spesifik olmayan anyonik ve zwitterionic fosfolipidlere bağlanan antikorlardır. Fosfolipidler hücre zarındaki önemli moleküllerdir. Bu moleküllere karşı gelişen antikorlar hücre fonksiyonlarını bozarak iltihaplanma ve pıhtılaşmaya neden olur.
- Erken gebelik kayıplarının en önemli nedenlerinden biri antifosfolipid antikorlardır.
- Tekrarlayan gebelik kayıpları olan kadınların %22'sinde antifosfolipid antikorları tespit edilmiştir. Antifosfolipid antikorlarının oluşma ihtimali her gebelik kaybı ile %15 artar.
- Antifosfolipid antikorları embriyonik implantasyon, trofoblastik fonksiyon ve differensiyasyonu ile plasental trombozu etkilemektedir.

- Kardiyolipin, fosfoethanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilgliserol, fosfotidilinositol, fosfotidilkolin ve fosfatidik asite karşı Ig M, IgG ve IgA tipinde antikorlar oluşur. Hücre ölümü veya hasarı bu moleküllerin hepsine veya birine karşı antikor gelişimine neden olur. Fosfolipidlere karşı oluşan antikorlar plasentanın uterusu tutunmasını ve sınıtyotroblastlara dönüşmesini engeller.
- Antifosfolipid antikorlarından en çok lupus antikoagülanı ve antikardiolipin antikorları (IgG ve IgM) klinik önemi gösterilmiştir.

APA (+) kadınlara heparin veya prednizon + aspirin ya da IVIG uygulandığında gebelik oranının arttığı bildirilmektedir.

ANA (Anti-Nükleer Antikorlar)

- Tekrarlayan düşük yapan kadınların %22'sinde, infertilite ve tüp bebek tedavilerinde ısrarla gebelik elde edilemeyen kadınların %50'sinde tespit edilmiştir.
- ANA saptanması SLE (Sistemik Lupus Eritematozus) ve kollagen vaskülit RAFS (Reproductive Autoimmune Failure Syndrome) için taşıyan bireylerin saptanmasında önemlidir.
- Bu antikorlar implantasyon sırasında embryo etrafında, implantasyondan sonra da plasenta etrafında inflamasyona neden olur.

- DNA'ya karşı oluşan otoantikor plasenta etrafında iltihabi reaksiyon oluşmasına neden olur. DNA ve DNA yıkım ürünlerine karşı antikorlar oluşur. Bu antikorlar dsDNA (çift iplikli DNA), ssDNA (tek iplikli DNA) ve DNA'yı meydana getiren polinükleotid ve histon gibi daha küçük moleküllere karşı oluşabilir.

Anti-Tiroid Antikorlar (ATA)

Anti Tiroglobulin Antikoru
Anti Tiroid Peroksidaz Antikoru

• Anti tiroid antikoru taşıyan kadınlarda düşük riski diğer kadınlardan iki kat daha fazladır. Bu antikorlar IVF/ET sonrası başarısızlık olduğunda da yüksek oranda saptanmışlardır.

Anti tiroid antikor olan kadınlardan yapılan endometrial biyopsilerde aktive T hücrelerinin yüksek oranda olduğu izlenmiştir. Tekrarlayan düşük yapan kadınların 1/3 de ATA ya da ANA pozitifliği saptanmıştır.

Anti-Over Antikorları (AOA)

• Overe karşı gelişmiş olan antikorlar over hücreleri yüzeyindeki fonksiyonel proteinleri maskeleyebilir ya da hücre içi protein işlevleri ile etkileşerek over fonksiyonları ve fertilitiyi etkileyebilir. Artmış oranda anti over antikoru taşıyanlarda ovülasyon

indüksiyonuna düşük oranda yanıt ya da yanıtızlık gelişebilir, bu hastalarda Prematür Over Yetmezliği izlenebilir. Antiover antikorları İnhibin B düzeyinin azalmasından önce izlenebilir ya da azalmayı indükleyici etki gösterebilir.

Inhibin B

• Over granülosa hücreleri İnhibin B salgılamaktadırlar. İnhibin pitüiter glanddan FSH sekresyonunu kontrol etmektedir. Bu nedenle FSH' a göre daha doğrudan over fonksiyonu hakkında bilgi sağlamaktadır. IVF hastalarında siklusun 3. gününde

inhibin B serum konsantrasyonu ölçümü IVF sikluslarının gonodatropin uyarısına yanıtını önceden belirlemede yararlı olmaktadır.

İmmunoglobulin Paneli (IgG, IgM, IgA)

• Endometrioz, tekrarlayan düşük, infertilite ve IVF sonrası implantasyon olmaması halinde total IgG izotiplerinde belirgin

anomali izlenebilir. Hipergammaglobulinemi olgularında IVF ile klinik gebelik olgularının azaldığı bildirilmektedir.

Reprodüktif İmmunfenotipleme

• CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56 monoklonal antikorlarını içeren bir panel çalışılmaktadır. İmmun sistemin dengede olması da fekdasyon ve farklılaşma için önemli bir etkidir.

• Tekrarlayan düşük, infertilite ve IVF sonrası implantasyon olmaması halinde CD56 + hücreleri tespit edilmelidir. CD56 + hücrelerin sayısı arttığında embriyo implantasyonunu önler ve plasental hücrelere zarar vererek desidua tabakasında harabiyete ve düşüğe yol açtığı gösterilmiştir.

NK Aktivasyon Testi

• NK hücreleri sekretuar endometrium ve erken gebelikte decidua'da en sık gözlenen hücrelerdir (Uterin NK). Trofoblastik hücrelerin migrasyonunu düzenleyici rolleri olduğu düşünülmektedir.

• NK hücre aktivasyon testleri dolaşımdaki NK hücrelerinin öldürme fonksiyonunun yanı sıra bu hücrelerin IL-2 ile uyarımı ve aktiviteyi baskılamak için IVIG etkisini göstermekte de kullanılabilir.

• Embriyo implantasyonu önler. Plasental hücrelere zarar vererek desidua tabakasında harabiyete ve düşüğe yol açar.

• Spontan düşük yapan ya da IVF başarısızlığı ile sonlanan olgularda çevresel kan ve endometrial NK aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir. Normalde NK aktivitesi %10'den azdır. Endometrioz tanısı alan IVF hastalarının % 40'ında NK aktivitesi artmıştır.

SCSA-Sperm Chromatin Structure Assay

• İnfertil erkeklerden alınan sperm örneklerinde kromozom anomalileri, sodyum dodesil sülfat (SDS) ile indüklenen dekondeksasyona düşük direnç, DNA kırılmalarında artış ve in situ asitle indüklenen DNA denatürasyonuna duyarlılıkta artış gözlenmektedir.

• SCSA sperm kromatin bütünlüğünün kantitatif ölçümünü sağlayan, asitle indüklenen in situ DNA denatürasyonu hakkında bilgi edinmemizi sağlayan bir yöntemdir. SCSA fertil bireyler reprodüktif streslere maruz kalmadıkça, zaman içinde stabil özellik göstermektedir.

• ART'de (Assisted Reproductive Technuquies-Yardımla Üreme Teknikleri) başarılı olma için WHO (Dünya Sağlık Örgütü) parametreleri olan konsantrasyon, motilite ve morfoloji parametreleri ile korelasyon göstermemekte, DNA kırılma ve in vivo fertilitite oranları ile korelasyon göstermektedir. Bu nedenle SCSA'nın bağımsız bir parametre olduğu ve ART başarısını önceden saptamada rol oynadığı düşünülmektedir.

İMMUNOLOJİK İNFERTİLİTE TESTLERİ

Yüksek Riskli Gebelik İzleme Paneli	Tekrarlayan Düşükler Paneli	Prematür Over Yetmezliği Paneli	IVF Tarama Paneli	Over Kapasite Ölçüm Paneli	Endometrioz Paneli	Koagülasyon Paneli	Erkeğe Yönelik Standart Testler	Tromboz Paneli
Anti Kardiyolipin Antikorlar	Anti Kardiyolipin Antikorlar	Anti Kardiyolipin Antikorlar	Anti Kardiyolipin Antikorlar	Anti Kardiyolipin Antikorlar	Anti Kardiyolipin Antikorlar	Lupus Antikoagülan	Sperm Konsantrasyonu Ölçümü	MTFHR (metillen-tetrahidrofolat-redüktaz geni)
Reproduktif İmmunfenotip	Anti Nükleer Antikorlar	Anti Nükleer Antikorlar	Anti Tiroid Antikorlar	Inhibin B	Anti Nükleer Antikorlar	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı - APTT	Sperm Hareketliliği Ölçümü	Faktör V Leiden Mutasyonu (Q506) (APC Genotipi)
Aktive PTT	Anti Tiroid Antikorlar	Anti Tiroid Antikorlar	NK Aktivasyon Testi	FSH (Folikül Stimulan Hormon)	CA125	Protrombin Zamanı - PT	Canlılık Ölçümü	Faktör II Mutasyonu (G20210A)
Trombositler	İmmunoglobulin Panel	Anti Over Antikorları		Luteinizan Hormon	Soluble CD23		ASA - Anti Sperm Antikorlar	Anti Kardiyolipin antikorlar
Üçlü Test	Reproduktif İmmunfenotip	Inhibin B		Estradiol				Lupus Antikoagülan
Inhibin B	NK Aktivasyon Testi			Granüloza hücrelerinden DNA Analizi ve Apoptosis Ölçümü				Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı - APTT
	Lupus Antikoagülan Lökosit Antikor							Protrombin Zamanı - PT
	Aktive PTT Protrombin Zamanı							Trombosit Sayımı

Referans Kaynaklar

- 1 Millenova Immunology Laboratories 2003
- 2 Repromedix Usersguide 2003
- 3 Royal College of Obstetricians and Gynaecologists – Immunological Testing and Interventions for Reproductive Failure-Scientific Advisory Committee Opinion Paper 5
- 4 WHO Laboratory Manuel for the Examination of Human Semen and Servical Mucus Interaction-1999: 4-28



gürsel mahallesi kağıthane caddesi no:14/3 kağıthane - istanbul • www.centro.com.tr
tel: 0 212 320 64 00 pbx • faks: 0 212 320 64 17 • e-posta : centro@centro.com.tr