

КЛИНИЧКИ ИСТРАЖУВАЊА

## СОЦИОДЕМОГРАФСКИ ПРОФИЛ И МУТАЦИИ ЗА ТРОМБОФИЛИЈА КАЈ ЖЕНИ СО НЕУСПЕШНА *IN VITRO* ФЕРТИЛИЗАЦИЈА – ПОЧЕТНИ РЕЗУЛТАТИ ОД СТУДИЈА НА СЛУЧАЈ И КОНТРОЛА

Елена Петковиќ<sup>1</sup>, Анита Христова-Димчева<sup>1</sup>, Рада Грубовиќ-Растворцева<sup>1</sup>, Седула Усеини<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт за трансфузиона медицина, Скопје, Република Северна Македонија

### Извадок

**Цитирање:** Петковиќ Е, Христова-Димчева А, Грубовиќ-Растворцева Р, Усеини С. Социодемографски профил и мутации за тромбофилија кај жени со неуспешна *in vitro* фертилизација – почетни резултати од студија на случај и контрола. Арх Ј Здравје 2019;11(2): 19-25.

**Клучни зборови:** тромбофилија, фактор V Leiden, метилентетрахидрофолат редуктаза, протромбин, неуспешна ИВФ

**\*Кореспонденција:** Елена Петковиќ, Институт за трансфузиона медицина, Скопје, Република Северна Македонија, E-mail: elena.petkovic@yahoo.com

**Примено:** 18-фев-2019; **Ревидирано:** 27-апр-2019; **Прифатено:** 20-мај-2019; **Објавено:** 15-јун-2019

**Печатарски права:** © 2019 Елена Петковиќ. Оваа статија е со отворен пристап дистрибуирана под условите на нелокализирана лиценца, која овозможува неограничена употреба, дистрибуција и репродукција на било кој медиум, доколку се цитираат оригиналниот(ите) автор(и) и изворот.

**Конкурентски интереси:** Авторот изјавува дека нема конкурентски интереси.

За неуспешната *in vitro* фертилизација (ИВФ) се заслужни повеќе фактори, меѓу кои последниве години се вбројува и наследната тромбофилија. Тромбофилија е состојба на предиспозиција за тромбоемболизам. Цел на трудот е да се евалуираат социодемографските карактеристики и да се испита застапеноста на мутациите за тромбофилија кај жените со неуспешна *in vitro* фертилизација. Материјал и методи: Во ретроспективно-проспективна студија на случај и контрола се евалуирани 52 жени, поделени во две групи. Во испитуваната група (ИГ) се вклучени 22 жени со најмалку три неуспешни ИВФ. Во контролната група (КГ) се вклучени 30 жени на иста возраст, што веќе родиле барем едно здраво дете, без акушерски компликации. Кај жените е испитано присуство на мутации на генот за фактор II протромбин (G20210A), фактор V Leiden (FVL) и метилентетрахидрофолатредуктаза (MTHFR C677T). Социодемографски податоци, податоци од лична, акушерска и семејна анамнеза беа прибрани со стандарден прашалник. Резултати: Застапеноста на националноста во испитуваните групи приближно одговара на националната структура во Република Македонија. И во двете групи најзастапена група е на возраст од 30 до 34 години (40% во КГ и 50% во ИГ). Според степенот на образование се регистрира хомогеност помеѓу двете групи. Во ИГ во најголем процент се регистрира MTHFR хетерозигот 63,6% vs. 56,7% во КГ, потоа FV Leiden хетерозигот со 13,6% vs. 3,3% во КГ, MTHFR хомозигот со 9,1% vs. 6,7% во КГ и фактор II (G20210A) хетерозигот со 4,5% vs. 6,7 во КГ. 72,7% од жените во ИГ и 60% во КГ имаат присуство на една тромбофилна мутација, а 9,1% од жените во ИГ и 6,7% во КГ имаат присуство на две тромбофилини мутации. 18,2% од жените во ИГ и 33,3% во КГ немаат ниту една мутација. Заклучок: Социодемографскиот профил на жените со неуспешни ИВФ е жена на возраст помеѓу 30 и 34 години, со високо образование, кај која има присуство на најмалку една

CLINICAL SCIENCE

## SOCIODEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND THROMBOPHILIC MUTATIONS IN WOMEN WITH *IN VITRO* FERTILIZATION FAILURE – INITIAL RESULTS FROM CASE CONTROL STUDY

Elena Petkovic<sup>1</sup>, Anita Hristova Dimceva<sup>1</sup>, Rada Grubovic Rastvorceva<sup>1</sup>, Sedula Useini<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of transfusion medicine, Skopje, Republic of North Macedonia

### Abstract

**Citation:** Petkovic E, Hristova Dimceva A, Grubovic Rastvorceva R, Useini S. Sociodemographic characteristics and thrombophilic mutations in women with *in vitro* fertilization failure – initial results from case control study. Arch Pub Health 2019; 11 (2): 19-25

**Key words:** thrombophilia, factor V Leiden, methylentetrahydrofolate reductase, prothrombin, IVF failure.

**\*Correspondence:** Elena Petkovic, Institute of transfusion medicine Skopje, Republic of North Macedonia. E-mail: elena.petkovic@yahoo.com

**Received:** 18-Feb-2019; **Revised:** 27-Apr-2019; **Accepted:** 20-May-2019; **Published:** 15-Jun-2019

**Copyright:** © 2019, Elena Petkovic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

**Competing Interests:** The author have declared that no competing interests

There are many factors for *in vitro* fertilization (IVF) failure, and hereditary thrombophilia has been mentioned as one of them in the last few years. Thrombophilia is a condition of predisposition to thromboembolism. The aim of the study was to evaluate the sociodemographic characteristics and to examine the representation of thrombophilic mutations in women with IVF failure. Material and methods: In a retrospective-prospective case-control study we evaluated 52 women, divided in two groups. Twenty-two women with at least three IVF failures were included in the examined group (EG). Thirty women, age matched, who gave birth to at least one healthy child without obstetric complications were included in the control group. Presence of gene mutations for factor II Prothrombin (G20210A), factor V Leiden (FVL) and methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) was examined in both groups. Sociodemographic data, data from personal, family and obstetric anamnesis was collected with standard questionnaire. Results: Representation of nationality in both groups roughly corresponds to the national structure in Republic of Macedonia. In both groups the most prevalent age was from 30 to 34 years (40% in the CG and 50% in the EG). According to the degree of education, homogeneity between the two groups was registered. In most of the EG, MTHFR heterozygous was 63.6% vs. 56.7% in the CG, followed by the FV Leiden heterozygous with 13.6% vs. 3.3% in the CG, MTHFR homozygous with 9.1% vs. 6.7% in CG, factor II Prothrombin (G20210A) heterozygous with 4.5% vs. 6.7 in CG. 72.7% of women in the EG and 60% in the CG had one thrombophilic mutation, and 9.1% of women in EG and 6.7% in CG had two thrombophilic mutations. 18.2% of women in EG and 33.3% in CG did not have any mutations. Conclusion: The sociodemographic profile of women with IVF failure is a woman aged between 30 and 34 years with a university degree, with at least one thrombophilic mutation. Thrombophilic mutation has not been registered in only a small percentage of women with failed IVF.

## Вовед

Успешната имплантација е комплексен процес кој вклучува два главни играчи: мајката како домаќин и ембрионот. И покрај трансферирањето на повеќе ембриони во поголемиот број центри за инфертилитет, само една третина од сите циклуси на *in vitro* фертилизација (ИВФ) достигнуваат клиничка бременост, а остатокот од нив сèуште не успеваат<sup>1</sup>.

Проблемите кои потекнуваат од страна на домаќинот како абнормална анатомија на матката, неприемчив ендометриум и медицинска состојба на мајката (како тромбофилија и абнормален имунолошки одговор) може негативно да влијаат врз врската помеѓу ембрионот и ендометриумот која е пресудна за успешна имплантација<sup>2,3</sup>.

Неуспешна концепција, и покрај повторен трансфер на ембриони со добар квалитет, е значаен клинички проблем во праксата на ИВФ. Дефиницијата за рекурентен тераписки неуспех варира. Многу различни клиничари го дефинирале како неуспех да се постигне бременост по 2-6 циклуси на ИВФ во кои повеќе од 10 ембриони со висок степен биле трансферирани во утерусот како повторувачки неуспешни имплантации<sup>4</sup>. Постои големо интересирање за потенцијалните причини за рекурентни неуспешни имплантации и стратегии со кои може да се подобри имплантацијата преку промени во клиничката и ембриолошка пракса<sup>5</sup>.

Неодамна, наследната мутација на генот за фактор V Leiden G1691A (FVL), генот за метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) C677T, генот за фактор II протромбин G20210A, дефицит на антиромбин III (АТIII), протеин Ц (PC) и протеин С (PS) или стекнатата тромбофилија (антифосфолипидните антитела и лупус антикоагулант) се вмешани во губење на раната бременост и неуспешна ИВФ, преку нарушување на почетниот процес на васкуларизација што се јавува при имплантација, што е неопходно за успешна бременост.

За неуспешната *in vitro* фертилизација (ИВФ) се заслужни повеќе фактори, меѓу кои последниве години се вброју-

ва и наследната тромбофилија. Тромбофилија е состојба на предиспозиција за тромбоемболизам. Нема доволно податоци за асоцираноста помеѓу тромбофилијата и инфертилитетот и неуспешната ИВФ, посебно во нашата земја.

Најчести причини за наследна тромбофилија се: дефицит на природните инхибитори на коагулацијата антиромбин III (АТIII), дефицит на протеин Ц (PC), дефицит на протеин С (PS) како и генетските мутации за фактор V Leiden G1691A, фактор II протромбин G2010A и метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR C677T).

Мутација на генот за фактор V Leiden G1691A се наследува на автосомно доминантен начин. FVL мутацијата (супституција на аденин за гванин на нуклеотидот 1691 во генот за FV што резултира со замена на аминокиселините глутамин за аргинин) е генетско нарушување што се карактеризира со слаб антикоагулантен одговор кон PCa. Активираниот PC е природен антикоагулантен протеин кој ги раскинува и инактивира Va и VIIIa, а со тоа оневозможува понатамошно создавање на тромбин. Мутацијата Leiden создава резистенција на PCa што резултира со протромботична состојба која доведува до ризик од тромбоза<sup>6,8</sup>. Оваа мутација е многу честа кај општата популација со преваленција 3-8%. Највисока стапка на хетерозиготност има во Европа, додека мутацијата е многу ретка кај Азијати, Африканци и домородни Австралијанци. FVL мутацијата е најчестиот генетски ризик-фактор за венски тромбоемболизам, кој се наоѓа кај 20-25% од пациентите со ВТЕ и кај 50% од пациентите со фамилијарна тромбофилија<sup>9</sup>.

Мутацијата на генот за фактор II протромбин G2010A е поврзана со зголемен ризик за тромбоза и компликации во бременост. Преваленцијата на хетерозиготи е 2-3% кај европското население. Слично како кај хомозиготната FVL мутација, дава висок ризик за тромбоза и неповолен исход на бременост<sup>6,8</sup>.

Мутација на генот за метилентетрахидрофолат редуктаза MTHFR C677T може да доведе до хиперхомоцистеинија. Хомоцистеинот е резултат на метаболизмот на аминокиселината метионин

внесен со исхраната. Дефицит на витамините Б6, Б12 и фолна киселина може да резултира со покачени нивоа на хомоцистеин. Хиперхомоцистеинемията може да биде: лесна, умерена и тешка. Тешката хиперхомоцистеинемия се јавува поради автосомно рецесивно хомозиготна дефициенција или на цистатион-бета синтетаза или на метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR). Клиничките манифестации на хиперхомоцистеинемия вклучуваат рана атеросклероза, невролошки абнормалности и рекурентен тромбоемболизам. Лесна и умерена форма се јавува поради автосомно доминантна (хетерозиготна) дефициенција на цистатион бета синтетаза или поради хомозиготност за С677Т термолабилен мутант, присутен кај 11% од белата европска популација. Овие пациенти имаат ризик за атеросклероза, тромбоемболизам, фетални дефекти на невралната туба и рекурентни абортуси<sup>7,8</sup>.

Цел на трудот е да се евалуираат социодемографските карактеристики и да се испита застапеноста на мутациите за тромбофилија кај жените со неуспешна *in vitro* фертилизација.

## Материјал и методи

Во ретроспективно-проспективна студија на случај и контрола се евалуирани 52 жени, поделени во две групи. Во оваа студија се прикажани почетните резултати и е опфатен помал број од вкупниот очекуван број испитаници кои се регрутираат во амбулантата при Институтот за трансфузиона медицина (ИТМ)-Скопје. Беше обработен материјалот од извршените прегледи и анализи во амбулантата при ИТМ-Скопје во периодот од 2015-2017 година, добиен од пациентките со дијагнози согласно инклузионите критериуми.

Критериуми за учество во клиничкото испитување:

Инклузиони критериуми:

- Жени на возраст од 18-45 години,
- Пациентки со историја на три неуспешни

пешни циклуси на ИВФ со трансферирани најмалку три ембриони со добар квалитет.

Ексклузиони критериуми:

- Жени кои имале претходна историја на венски тромбоемболизам,
- Жени со претходно постоечки причини за секундарна тромбофилија: автоимуни заболувања (како системски лупус еритематозус, ревматоиден артритис, Хашимотов тироидитис), позитивни АФА, позитивен LA, екстремна обезност, дислипидемиа, нефротски синдром,
- Жени кои ќе одбијат учество во студијата или ќе се откажат во некој момент од студијата.

Во испитуваната група (ИГ) се вклучени 22 жени со историја на најмалку три неуспешни циклуси на ИВФ, со трансферирани најмалку три ембриони со добар квалитет. Индикациите за ИВФ се: машки фактор, женски фактор и необјаснет инфертилитет.

Во контролната група (КГ) се вклучени 30 жени на иста возраст, што веќе родиле барем едно здраво дете, без акушерски компликации..

Кај жените е испитано присуство на мутации на генот за фактор II (G20210A), фактор V Leiden (FVL) и метилентетрахидрофолатредуктаза (MTHFR C677T). Социодемографски податоци, податоци од лична, акушерска и семејна анамнеза беа прибрани со стандарден прашалник. Примероците крв од вклучените жени се испитуваа во лабораторијата за молекуларна биологија при Институтот за трансфузиона медицина – Скопје, со претходно дадена информациона согласност пред земањето на крвните примероци и користење на резултатите во изработка на студијата, одобрена од Етичкиот комитет при Медицинскиот факултет- Скопје.

Молекуларна детекција на *point* мутации со помош на Oregon кит е метод кој се користи за испитување на мутации на фактор II (G20210A), фактор V Leiden (G1691A) и метилентетрахидрофолатредуктаза MTHFR C677T. Беа потребни 2ml венска крв земена со вакумтајнер во K2EDTA.

## Резултати

Застапеноста на националноста во испитуваните групи е прикажана во Табела 1 и приближно одговара на националната структура во Република Македонија.

**Табела 1.** Етничка припадност на испитаниците

Етничка припадност	Контролна група	Испитувана група
Македонци	20 (66,7%)	18 (81,8%)
Албанци	7 (23,3%)	3 (13,6%)
Турци	1 (3,3%)	0
Бошњаци	1 (3,3%)	1 (4,5%)
други	1 (3,3%)	0
<b>Вкупно</b>	<b>30</b>	<b>22</b>

И во двете групи најзастапената група е на возраст од 30 до 34 години (40% во КГ и 50% во ИГ), прикажана во Табела 2.

**Табела 2.** Возраст на пациентките во групите

Возраст	Контролна група	Испитувана група
18-24	2 (6,7%)	0
25-29	8 (26,7%)	2 (9,1%)
30-34	12 (40%)	11 (50%)
35-39	7 (23,3%)	5 (22,7%)
40-45	1 (3,3%)	4 (18,2%)
<b>вкупно</b>	<b>30</b>	<b>22</b>

Според нивото на образование се регистрира хомогеност помеѓу двете групи, 50% од жените се со високо образование во двете групи; со средно образование се 33,3% од КГ наспроти 36,4% од ИГ; со основно образование се 16,7% од КГ наспроти 13,6% од ИГ.

**Табела 2.** Возраст на пациентките во групите

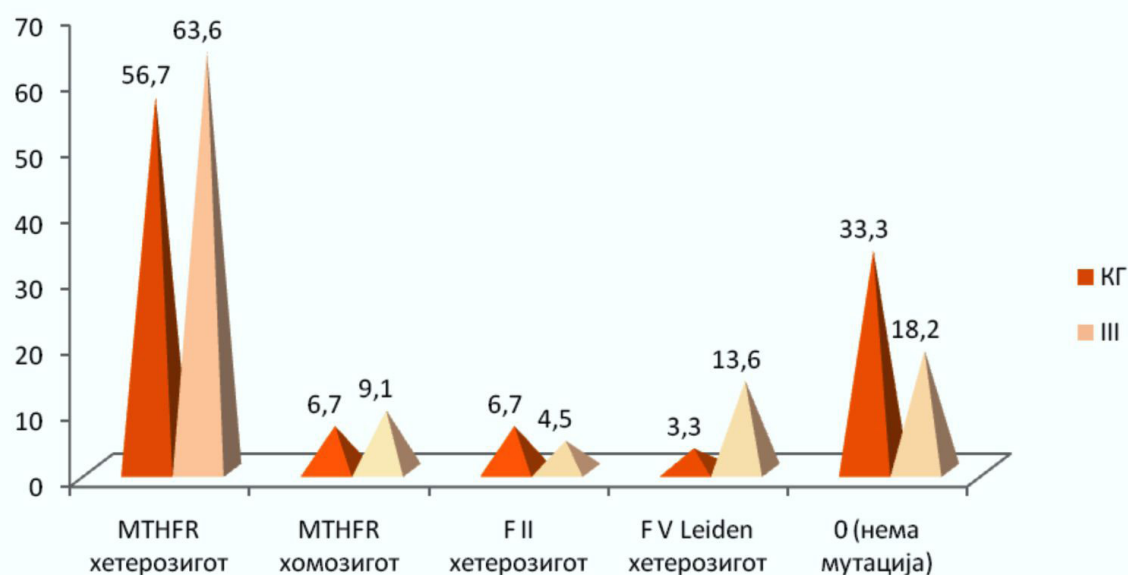
Ниво на образование	Контролна група	Испитувана група
високо	15 (50%)	11 (50%)
средно	10 (33,3%)	8 (36,4%)
основно	5 (16,7%)	3 (13,6%)
<b>вкупно</b>	<b>30</b>	<b>22</b>

Кај 72,7% од жените во ИГ и 60% во КГ има присуство на една тромбофилна мутација, а кај 9,1% од жените во ИГ и 6,7% во КГ има присуство на две тромбофилни мутации. 18,2% од жените во ИГ и 33,3% во КГ немаат ниту една мутација.

Табела 2. Возраст на пациентките во групите

Ниво на образование	Контролна група	Испитувана група
0 (нема мутација)	10 (33,3%)	4 (18,2%)
1 мутација	18 (60%)	16 (72,7%)
2 мутации	2 (6,7%)	2 (9,1%)
<b>вкупно</b>	<b>30</b>	<b>22</b>

Во ИГ во најголем процент се регистрира МТНFR хетерозигот 63,6% наспроти 56,7% во КГ, потоа FV Leiden хетерозигот со 13,6% наспроти 3,3% во КГ, МТНFR хомозигот со 9,1% наспроти 6,7% во КГ и фактор II (G20210A) хетерозигот со 4,5% наспроти 6,7 во КГ.



Графикон 1. Присуство на мутации кај испитаниците

## Дискусија

Во оваа студија беше направена ана-При споредба на социодемографските податоци помеѓу двете групи во нашата студија според возраста, едукативното ниво и етничката припадност немаше голема разлика, односно двете групи беа хомогени.

Податоците од студии на контрола и случај сугерираат дека жени со неуспех во асистираниот репродуктивен технологија почесто се позитивни на FV Leiden и некои подгрупи на антифосфолипидни антитела (кои не беа цел на овој труд и таквите жени беа исклучени од студијата) споредени со фертилни жени кои родиле.

Нашите резултати покажаа дека 18,2% од жените во ИГ и 33,3% во КГ немаат ниту една мутација. Во ИГ во најголем процент се регистрира МТНFR хетерозигот 63,6% vs. 56,7% во КГ, потоа FV Leiden хетерозигот со 13,6% vs. 3,3% во КГ, МТНFR хомозигот со 9,1% vs. 6,7% во КГ и фактор II (G20210A) хетерозигот со 4,5% vs. 6,7 во КГ.

Во студијата на контрола и случај, Azem F и соработниците прикажуваат сигнификатно повисоки стапки на наследна тромбофилија кај рекурентни неуспешни имплантации отколку кај здрави фертилни парови<sup>10</sup>. Слични резултати добиле и Grandone и соработниците во својата студија на случај и контрола<sup>11</sup>. Нивните резултати суге-

пираат дека наследната тромбофилија може да игра улога во етиологијата на рекурентен ИВФ неуспехи или фетален губиток по ИВФ. Но, тие се во конфликт со друга поголема студија на Martinelli и соработниците, која не докажала асоцијација помеѓу матуралната тромбофилија и неуспешната ИВФ<sup>12</sup>.

Во ревијалниот труд на Di Nisio и соработниците на тема тромбофилии и исход на ИВФ биле прегледани 694 студии, од кои само 33 (6092 пациенти) биле целосно анализирани<sup>13</sup>. Во 10 студии од овој преглед бил евалуиран односот помеѓу наследната тромбофилија и асистираниот репродуктивен технологија (ART). Собраните податоци за пациентите од 8 контролирани студии на случаи покажале 3 пати зголемен ризик за неуспешен ART во асоцијација со фактор V Leiden. Во 3 кохортни студии немало разлика во исходот помеѓу оние со и оние без фактор V Leiden мутацијата.

## Заклучок

Социодемографскиот профил на жените со неуспешни ИВФ е жена на возраст помеѓу 30 и 34 години, со високо образование, кај која има присуство на најмалку една тромбофилна мутација, FV Leiden хетерозигот или MTHFR хомозигот. Само кај мал процент од жените со неуспешни ИВФ не е регистрирана ниту една тромбофилна мутација. Даден е само профилот бидејќи се изработени само проценти на структурата поради малиот примерок на испитаници. Потребно е регрутирање на целиот предвиден примерок за да може податоците да се обработат статистички, да се добие статистичка сигнификантност, а со тоа и ќе се добијат целосни и појасни податоци.

## Референци

1. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril* 2012; 97:1039-1043.
2. Fukui A, Funamizu A, Yokota M, Ya-

mada K, Nakamura R, Fukuhara R, et al. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2011;90:105-10.

3. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006; 21:3036-43.
4. Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R and Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG* 2005; 112(6):773-780.
5. Scott L. Embryological strategies for overcoming recurrent assisted reproductive technology treatment failure. *Hum Fertil* 2002; 5: 206-214.
6. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA; Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132(2): 171-96.
7. Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol* 2002;99(2):333-41.
8. Vucic N, Frleta M, Petrovic D, Ostojic V. Thrombophilia, preeclampsia and other pregnancy complications. *Acta Med Croatica* 2009; 63(4):297-305.
9. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genetics in medicine* 2011; 13: 1-16.
10. Azem F, Many A, Ben Ami I, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* 2004; 19: 368-370.
11. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MG, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertil Steril* 2001;76: 201-202.
12. Martinelli I, Taiolo E, Ragni G, et al. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and mater-

nal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88: 789-793.

13. Di Nisio M, Rutjes AWS, Ferrante N, Tiboni GM, Cucurullo F, Porreca E. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 2011; 18:2670-2678.