

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Karolina Miloš**

**Opravdanost primjene niskomolekularnog  
heparina u pacijentica s ponavljanim  
implantacijskim neuspjehom**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Karolina Miloš**

**Opravdanost primjene niskomolekularnog  
heparina u pacijentica s ponavljanim  
implantacijskim neuspjehom**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC „Zagreb“ pod vodstvom prof.dr.sc. Hrvoja Vrčića, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

Mentor: prof.dr.sc. Hrvoje Vrčić, dr. med.

## **POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU:**

IVF - in vitro fertilizacija

hCG - humani korionski gonadotropin

IL1a - interleukin alfa

IL1b - interleukin beta

CAM - stanične adhezijske molekule

LMWH - niskomolekularni heparin

RIF - ponavljani implantacijski neuspjeh

LAC - lupus antikoagulans

ACL - antikardiolipinska antitijela

SLE - sistemski eritematozni lupus

BMI - indeks tjelesne težine

PCOS - sindrom policističnih jajnika

LH - luteinizirajući hormon

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

PGD - predimplantacijska genetička dijagnoza

IVIg - intravenski imunoglobulini

UFH - nefrakcionirani heparin

APTV - aktivirano protrombinsko vrijeme

TGFb - transformirajući čimbenik rasta beta

HB-EGF - heparin-vežući epidermalni čimbenik rasta

IGF - inzulinu sličan čimbenik rasta

IL-1 - interleukin 1

BMI - indeks tjelesne mase

IUGR - intrauterini zastoj u rastu

PPRV - prijevremeno prsnuće vodenjaka

FET - transfer smrznutih embrija

AIH - artifičijelna intrauterina inseminacija

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. IMPLANTACIJA</b>	1
<b>3. PONAVLJANI IMPLANTACIJSKI NEUSPJEH (RIF)</b>	3
3.1. Definicija ponavljano implantacijskog neuspjeha	4
3.2. Uzroci ponavljano implantacijskog neuspjeha	4
3.2.1. Uzroci od strane majke	4
3.2.1.1. Kongenitalne anomalije uterusa	4
3.2.1.2. Stečena intrakavitarna patološka stanja maternice	5
3.2.1.2.1. Miomi	5
3.2.1.2.2. Polipi endometrija	6
3.2.1.2.3. Intrakavitarna priraslice	6
3.2.1.3. Endometrioza	6
3.2.1.4. Adenomioza	7
3.2.1.5. Saktosalpinks	7
3.2.1.6. Trombofilija	8
3.2.1.7. Antifosfolipidni sindrom	9
3.2.1.8. Pretilost	10
3.2.1.9. Imunološki čimbenici	11
3.2.2. Uzroci od strane embrija	11
3.2.2.1. Kvaliteta jajne stanice	11
3.2.2.2. Kvaliteta spermija	12
3.2.2.3. Kromosomske abnormalnosti roditelja	12
3.2.3. Ponavljani implantacijski neuspjeh neobjašnjenog uzroka	12
3.3. Dijagnostički postupak kod bolesnica s RIF	12
3.4. Liječenje bolesnica s RIF	13
<b>4. NISKOMOLEKULARNI HEPARIN</b>	14
<b>5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	16
<b>6. ISPITANICI I METODE</b>	16
<b>7. REZULTATI</b>	17
<b>8. RASPRAVA</b>	24
<b>9. ZAKLJUČAK</b>	27
<b>10. ZAHVALE</b>	28
<b>11. LITERATURA</b>	29
<b>12. ŽIVOTOPIS</b>	40

## **SAŽETAK**

### **Opravdanost primjene niskomolekularnog heparina u pacijentica s ponavljanim implantacijskim neuspjehom**

**Karolina Miloš**

Ponavljani implantacijski neuspjeh (RIF) definira se kao nemogućnost postizanja trudnoće nakon 3 uzastopna IVF postupka s transferom najmanje 4 visoko kvalitetna embrija. Uzroci RIF-a mogu biti od strane majke i od strane embrija. Jedan od češćih uzroka RIF-a je nasljedna trombofilija. U velikom broju slučajeva uzrok je još uvijek nepoznat. Niskomolekularni heparin se koristi kao rutinska terapija kod bolesnica s nasljednom trombofilijom zbog njegovog antikoagulacijskog učinka. Mnoga istraživanja utvrdila su njegov učinak u procesu implantacije. Cilj ovog istraživanja bio je prikazati opravdanost primjene LMWH kod bolesnica s problemima sa začecem ili iznošenjem trudnoće, hospitaliziranih na Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb od 2013. do 2017. godine s naglaskom na bolesnice s ponavljanim implantacijskim neuspjesima. Primjena LMWH u najvećem je broju slučajeva bila povezana s pozitivnim ishodom trudnoće, odnosno porođajem zdravog novorođenčeta u terminu. Nije bilo značajnih razlika između bolesnica koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje i bolesnica koje su zanijele spontanim putem. Pitanje opravdanosti primjene LMWH kod bolesnica s ponavljanim implantacijskih neuspjesima zahtjeva daljnju obradu s obzirom na oprečne rezultate različitih studija.

Ključne riječi: ponavljani implantacijski neuspjeh, niskomolekularni heparin, implantacija, trombofilija

## **SUMMARY**

### **The rationale of the administration of low-molecular-weight heparin in patients with repeated implantation failure**

**Karolina Miloš**

Recurrent implantation failure (RIF) is defined as inability to achieve pregnancy after 3 consecutive IVFs with at least 4 high-quality embryo transfer. RIF can be due to mother causes and embryo causes. One of the most common causes of RIF is inherited thrombophilia. In a large number of cases the cause is still unknown. Low-molecular-weight heparin (LMWH) is used as a routine therapy in patients with hereditary thrombophilia due to its anticoagulant effect. Many studies have determined its effect on the implantation process. The aim of this study was to show the rationale of the use of LMWH in patients with inability to conceive or to carry to term who were hospitalized at the Department of Women's Diseases and Births of UHC Zagreb from 2013 to 2017 with emphasis on patients with recurrent implantation failure. The use of LMWH in most cases was associated with a positive pregnancy outcome. There were no significant differences between the patients who underwent the process of IVF and the patients who conceived spontaneously. The question of the rationale of the administration of LMWH in patients with recurrent implantation failure requires further research due to the contradictory results of different studies.

Key words: recurrent implantation failure, low-molecular-weight heparin, implantation, thrombophilia



## **1. UVOD**

Ponavljani implantacijski neuspjeh je problem s kojim se suočavaju mnoge žene koje prolaze proces potpomognute oplodnje. Procjenjuje se da će oko 10 % žena koje idu u postupak IVF doživjeti ponavljani implantacijski neuspjeh. Uspješna implantacija je složeni proces koji zahtijeva sinkroniziran razvoj i interakciju endometrija i blastociste kao i raznih medijatora. Uspješnom implantacijom u kliničkoj praksi smatra se ultrazvučno dokazano postojanje gestacijske vreće. Sukladno tome implantacijski neuspjeh u kliničkom smislu je izostanak ultrazvučnog dokaza o postojanju intrauterine gestacijske vreće (1). Proces potpomognute oplodnje dio je rutinske prakse, ali je i dalje povezan s većim brojem rizika u usporedbi s prirodnim načinom oplodnje (2). Jedna od strategija za poboljšanje problema perinatalnog rizika te povećanje broja uspješnih ishoda trudnoća nakon IVF-a je primjena niskomolekularnog heparina (LMWH). LMWH je dokazano uspješan u poboljšanju ishoda IVF trudnoća kod žena s trombofilijom (3). Osim toga, razjašnjena je i njegova uloga u modeliranju mnogih poznatih mehanizama koji su temelj uspješne implantacije (4). Brojni potvrđeni učinci LMWH čine ga potencijalnom terapijom za sve bolesnice s ponavljanim implantacijskim neuspjesima neovisno o tome imaju li trombofiliju ili ne. Ovim radom pokušat će se približiti odgovoru na pitanje o opravdanosti njegove primjene u bolesnica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima.

## **2. IMPLANTACIJA**

Implantacija je proces u kojem dolazi do priljublivanja embrija za decidualno promijenjenu površinu endometrija. Nakon ovulacije koja se događa na prelasku iz

folikularne u sekrecijsku fazu menstrualnog ciklusa, jajna stanica zajedno s *coronom radiatom* i *cumulusom oophorusom*, otpušta se u peritonealnu šupljinu te uz pomoć cilija i peristaltike jajovoda ubrzo usmjerava u sam jajovod. U jajovodu dolazi do fertilizacije odnosno kontakta jajne stanice i spermatozoa. Tako nastaje diploidna zigota. Ovo se događa unutar 2 dana od ovulacije. Od trenutka nastanka zigote do ulaska u maternicu prođe otprilike 3 dana. Za to se vrijeme zigota dijeli te ulazi u maternicu u stadiju morule. Morula na ulasku u šupljinu maternice sadrži 12-16 stanica te se nastavlja dijeliti i nakuplja tekućina između stanica. Tako prelazi u stadij blastule. Otprilike 4 do 5 dana nakon fertilizacije 58-stanična blastula diferencira se u 5 embrionalnih stanica i 53 stanica predodređenih za razvoj trofoblasta. Vanjski sloj tih stanica naziva se trofoektoderm (5). 107-stanična blastocista nastavlja nakupljati tekućinu, ali se veličinom puno ne razlikuje od zigote. U tom stadiju blastocista sadrži 9 embrionalnih stanica i 99 stanica trofoblasta. Tada dolazi do odvajanja *zone pellucide* posljedično lučenju specifičnih proteaza iz sekretorno promijenjenih endometralnih žlijezda (6). Odvajanje od *zone pellucide* omogućuje interakciju između endometrija i blastociste. Blastocista luči citokine i hormone kao što su IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i hCG, koji utječu na receptivnost endometrija (7, 8). Embrio se implantira u endometriju 7 dana nakon fertilizacije. Proces implantacije možemo podijeliti u tri stadija: apozicija, adhezija i invazija. Apozicija se odnosi na početno prianjanje blastociste na endometriju. Blastocista najčešće prianja na gornjem i stražnjem zidu maternice. Adhezija je jači kontakt blastociste i endometrija. To uključuje djelovanje staničnih adhezijskih molekula (CAM) kao što su integrini (9). Invazija obuhvaća penetraciju sinciotrofoblasta i citotrofoblasta do u unutarnju trećinu miometrija i krvožilje maternice. Uspješna implantacija zahtjeva pravilan odnos estrogena i progesterona koji pripremaju endometriju. Receptivnost endometrija vremenski je limitirana te je implantacija moguća od 20. do 24. dana ciklusa. Za vrijeme interakcije s

endometrijem, blastocista se sastoji od 100-250 stanica (5). Može se reći da je implantacija osjetljiv proces koji zahtjeva usklađenu i pravodobnu interakciju raznih molekula, embrija i uterusa. Mnogo uzroka može dovesti do neuspješne implantacije kako in vivo tako i in vitro.

### **3. PONAVLJANI IMPLANTACIJSKI NEUSPJEH (RIF)**

#### **3.1. Definicija ponavljanog implantacijskog neuspjeha**

Ponavljani implantacijski neuspjeh je klinički entitet koji se odnosi na neuspjeh u postizanju kliničke trudnoće nakon transfera najmanje četiri visokokvalitetna embrija u najmanje tri ciklusa kod žena mlađih od 40 godina (1). Klinička definicija implantacijskog neuspjeha odnosi se na izostanak ultrazvučno dokazanog postojanje gestacijske vreće. To može uslijediti u vrlo ranim stadijima, dok još nije došlo do prodiranja blastociste u endometrij što se očituje negativnim testovima na trudnoću (negativan hCG u krvi i urinu). Može se dogoditi i nakon što je došlo do prodora blastociste u površinski dio endometrija kada je započeto lučenje hCG, ali je proces prekinut prije formiranja gestacijske vreće. U tom slučaju govorimo o biokemijskoj trudnoći (1). Vjerojatnost da će se embrio implantirati iznosi 30%, stoga je vjerojatnost implantacijskog neuspjeha 70%. S obzirom na to da je implantacija proces ovisan o embriju, endometriju te raznim medijatorima bilo koji problem vezan za jedan od ta tri faktora može dovesti do poremećaja implantacije. To ovisi o više čimbenika kao što su kvaliteta embrija, broj prenesenih embrija, stadiju razvoja prenesenog embrija, radi li se o zamrznutom ili svježem embriju, dobi majke te stanju uterusa (1).

## **3.2. Uzroci ponavljanog implantacijskog neuspjeha**

Uzroke ponavljanog implantacijskog neuspjeha možemo podijeliti na uzroke od strane majke kao što su: anatomske uzroke, endometrioza, adenomioza, saktosalpinks, imunološki faktori, endokrini faktori, trombofilija, antifosfolipidni sindrom, pretilost i drugi te na embrionalne uzroke kao što su: kvaliteta jajne stanice, kvaliteta spermija i kromosomske abnormalnosti roditelja (1, 10).

### **3.2.1. Uzroci od strane majke**

#### **3.2.1.1. Kongenitalne anomalije uterusa**

Kongenitalne anomalije uterusa mogu utjecati na receptivnost endometrija i manifestirati se kao neplodnost ili ponavljeni implantacijski neuspjeh (11). Najčešća anomalija uterusa je uterus septus. Dokazano je da je u žena s tim stanjem povećan rizik od pobačaja u prvom i drugom trimestru trudnoće, a moguća je i povezanost s neplodnošću (12, 13). Ti se rezultati pridaju činjenici da septirani uterus ometa materničnu šupljinu. Također, često dolazi do nepotpune opskrbe septuma krvlju što može biti preliminarni dokaz povezanosti uterusa septusa s ponavljenim implantacijskim neuspjesima (14). Sedlasta maternica, uterus arcuatus, može biti povezana s nepovoljnim ishodom trudnoće ako je septum unutar maternice duži od 1 centimetra. Ostale kongenitalne anomalije uterusa nisu dokazano povezane s ponavljenim implantacijskim neuspjesima.

### **3.2.1.2. Stečena intrakavitarna patološka stanja maternice**

Brojna stečena intrakavitarna patološka stanja maternice kao što su miomi, polipi endometrija, intrauterine priraslice, adenomioza i endometrioza mogu doprinijeti RIF. Ta stanja ostaju neprepoznata u 25% do 50% bolesnica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima (15).

#### **3.2.1.2.1. Miomi**

Miomi su najčešći benigni tumori ženskog reproduktivnog trakta. Smatraju se mogućim uzrokom subfertiliteta, a točan mehanizam se još istražuje. Smatra se da učinak na reprodukciju ovisi o veličini, lokalizaciji, povećanoj kontraktilnosti maternice, kroničnoj upali sluznice te poremećenoj citokinskoj regulaciji koju miomi uzrokuju (16). Razlikujemo submukozne i intramuralne miome. Pokazala se povezanost između submukoznih mioma i implantacijskih neuspjeha te povećanog broja pobačaja pa se u žena s ponavljanim implantacijskim neuspjesima preporučuju ukloniti jer njihovo uklanjanje povećava stopu trudnoća (17). Intramuralni miomi veći od 4 cm koji remete materničnu šupljinu dovode do gubitka trudnoće. Rezultati različitih studija o utjecaju intramuralnih mioma na ishod implantacije se razlikuju pa tako neke studije potvrđuju negativni učinak mioma većih od 4 cm dok druge studije isto negiraju (18, 19). Rezultati metaanalize govore u prilog smanjene stope implantacije kod žena s intramuralnim miomima u usporedbi s onima koje ih nemaju (20).

### **3.2.1.2.2. Polipi endometrija**

Polipi endometrija su žarišta hiperplazije endometralne strome i žlijezda koja se protežu u šupljinu maternice. Polipi također dovode do ponavljanih implantacijskih neuspjeha (21). Čini se da je način na koji polipi utječu na neuspjeh implantacije sličan mehanizmu kojim na neuspjeh implantacije utječu miomi. Jedna studija pokazala je da histeroskopsko odstranjenje endometralnih polipa u žena koje su prolazile postupak intrauterine inseminacije dovodi do dvostrukog porasta broja klinički utvrđenih trudnoća (22).

### **3.2.1.2.3. Intrauterine priraslice**

Prisutnost adhezija unutar šupljine maternice može u ranoj fazi ometati implantaciju sprečavanjem embrija da se pričvrsti na površinu endometrija (1). Adhezije su najčešće posljedica kiretaža, kirurških postupaka na maternici ili upala. Jedno istraživanje utvrdilo je postojanje priraslica u 8.5 % bolesnica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima (23). Također, u nekoliko istraživanja potvrdila se pozitivna korelacija između histeroskopskog odstranjenja priraslica i fertilizacije (24 25, 26).

### **3.2.1.3 Endometrioza**

Endometrioza označava bolest u kojoj se tkivo endometrija nalazi izvan maternice. Simptomi su bolnost i neplodnost. Endometriotično tkivo odgovara na hormonske podražaje kao i normalan endometrij pa zbog ektopične lokalizacije uzrokuje unutarnje krvarenje, priraslice, upale i ožiljke. Endometrioza se smatra jednim od vodećih uzroka subfertilnosti koji pogađa oko 10% žena reproduktivne dobi (27). U žena s endometriozom povećana je

učestalost neuspjeha IVF-a u usporedbi sa ženama koje nemaju endometriozu (28). Pokazalo se i da žene s endometriozom imaju smanjenu stope fertilizacije i implantacije te smanjen broj oocita. Smatra se da je za neplodnost u endometriozu najodgovornija lošija kvaliteta oocita i da to najviše utječe na neuspjeh implantacije (29).

#### **3.2.1.4. Adenomioza**

Adenomioza je bolest u kojoj se tkivo endometrija nalazi unutar miometrija. Najčešće tegobe povezane s adenomiozom su pojačana, bolna i produljena menstruacijska krvarenja iako može biti i asimptomatska. Iako se najčešće dijagnosticira nakon 40-te godine postoje studije koje su pokazale povezanost adenomioze i RIF-a (30). U adenomiozi je promijenjena funkcija i receptivnost endometrija.

#### **3.2.1.5. Saktosalpinks**

Saktosalpinks naziv je za začepljen i dilatiran jajovod i najčešće je posljedica zdjelične upalne bolesti. Ovisno o sadržaju koji ispunjava jajovod razlikujemo hidrosalpinks, piosalpinks i hematosalpinks. Istraživanja su pokazala da je hidrosalpinks povezan s nižom stopom trudnoća putem IVF, nižom stopom implantacije i porođaja te s češćim ranim spontanim pobačajima (31).

### 3.2.1.6. Trombofilija

Trombofilija je naziv za skupinu poremećaja koji se očituju pojačanim zgrušavanjem krvi. Trudnoća i puerperium su sami po sebi stanja povezana s hiperkoagulabilnosti. U studiji koja je istraživala rizik od venske tromboembolije i plućne embolije za vrijeme trudnoće i puerperija nađeno je da je u trećem tromjesečju i prvih 6 tjedana postpartalno rizik veći 6 do 22 puta o odnosu na opću populaciju (35). Nekoliko važnih proteina djeluju kao inhibitori u koagulacijskoj kaskadi. Njihov manjak dovodi do hiperkoagulabilnosti i potencijalnih tromboembolijskih incidenata (5). Iako je manjak tih inhibitora prisutan u oko 15% europske populacije bijele rase oni su odgovorni za gotovo 50% svih tromboembolijskih incidenata tijekom trudnoće (32,33).

Trombofilije dijelimo na nasljedne i stečene. Najčešće nasljedne trombofilije su: manjak antitrombina, manjak proteina C, manjak proteina S, rezistencija na protein C- mutacija faktora V Leiden, mutacija protrombina G20210A i hiperhomocistinemija. U stečene trombofilije ubrajamo: antifosfolipidni sindrom, heparinom induciranu trombocitopeniju i rak. Nasljedna trombofilija nađena je u polovice pacijenata s tromboembolijskim incidentom prije 45-te godine bez provocirajućeg faktora ili s minimalnim provocirajućim faktorom za razvoj hiperkoagulabilnog stanja. Od velike važnosti je i pozitivna obiteljska anamneza rekurentnih tromboza ili nagle smrti od plućne embolije (34).

Metaanaliza Robertsona i sur. (2005) sumirala je 25 istraživanja vezanih uz temu trombofilije i trudnoće. Dokazala se povezanost između trombofilije i ponavljano gubitka trudnoće u najranijim stadijima, u prvom trimestru, nerekurentim gubicima trudnoće u drugom i trećem trimestru te povezanost s preeklampsijom, abrupcijom posteljice i zaostajanjem u rastu fetusa (36). Alfirević i sur. u svojoj su studiji utvrdili učestalost



trombofilije od 53% među bolesnicama s komplikacijama trudnoće kao preeklampsija, mrtvorodenje, abrupcija posteljice i hipertenzija u trudnoći (37).

Metaanaliza o učinku trombofilije na ishod IVF-a utvrdila je da žene s ponavljanim implantacijskim neuspjesima imaju veću prevalenciju mutacija faktora V Leiden i češće su pozitivne na antifosfolipidna protutijela. Povezanost između ponavljanih neuspjeha implantacije nakon IVF-a i protrombinskih mutacija, mutacije metilentetrahidrofolat reductaze, manjka proteina S, proteina C ili antitrombina u ovom slučaju nije utvrđena (38). Smatra se da te komplikacije nastaju zbog tromboze maternalnih krvnih žila koja uzrokuje smanjenje perfuzije interviloznog prostora. Na taj je način spriječena invazija sinciotrofoblasta u maternalne krvne žile što dovodi do implantacijskog neuspjeha. (39) Neka istraživanja pokazuju da trombofilija može utjecati na razne funkcije trofoblasta kao što su invazija, diferencijacija, proliferacija, hormonska funkcija i decidualizacija što također može dovesti do ponavljanih implantacijskih neuspjeha (40).

### **3.2.1.7. Antifosfolipidni sindrom**

Antifosfolipidni sindrom ili sindrom antifosfolipidnih protutijela je autoimuna bolest obilježena trombozom ili komplikacijama u trudnoći. Antifosfolipidna protutijela su lupus antikoagulans-LAC, antikardiolipinska antitijela-ACL i antitijela na beta-2 glikoprotein. Ta su protutijela pronađena u oko 2% pacijenata s netraumatskom venskom trombozom te mogu i ne moraju biti povezana sa SLE (5). Antifosfolipidni sindrom imaju žene sa srednje visokim ili visokim razinama antifosfolipidnih protutijela i sljedećim kliničkim manifestacijama: najmanje 1 neobjašnjena smrt fetusa u prvih 10 tjedana gestacije, najmanje 1 prijevremeni porođaj prije 34. tjedna trudnoće zbog eklampsije, ozbiljne preeklampsije ili

placentarne insuficijencije te najmanje 3 neobjašnjena uzastopna pobačaj prije 10.tjedna (41). Antifosfolipidni sindrom je najčešća stečena trombofilija. Utvrđeno je da izravno utječe na gubitak trudnoće i da se liječenjem gubitak trudnoće može uspješno spriječiti. Antifosfolipidna protutijela mogu djelovati prokoagulantno i tako dovesti do tromboze maternalnih krvnih žila i omesti invaziju trofoblasta. Antifosfolipidni sindrom često dovodi do gubitka trudnoće i povećava rizik od ponavljanih pobačaja (42).

### **3.2.1.8. Pretilost**

Pretilost se može definirati kao indeks tjelesne mase jednak ili veći od 30 kg/m<sup>2</sup>. To je kronična bolest koja nastaje prekomjernim nakupljanjem masti u organizmu. Najčešće je posljedica prekomjernog unosa hrane i nedovoljne fizičke aktivnosti. Povećan indeks tjelesne mase povezan je s povećanim rizikom od spontanog pobačaja (43). U mehanizmu pretilosti bitna je uloga leptina čija razina u plazmi korelira s BMI. Receptori leptina pronađeni su na sekretornom endometriju te vjerojatno imaju utjecaj na regulaciju angiogeneze uterusa, a time i na implantaciju (44). Pretilost je u brojnim slučajevima povezana i sa sindromom policističnih jajnika. Mnoga istraživanja utvrdila su povezanost između PCOS i povećanog rizika od implantacijskog neuspjeha. Pretile žene s policističnim jajnicima imaju povišenu ekspresiju proupalnih i smanjenu ekspresiju protuupalnih faktora, smanjena je endometrijska proizvodnja adhezijskih faktora, insulin-like growth factor-binding protein-1 i  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrina (45).

### **3.2.1.9. Imunološki čimbenici**

Imunološki aspekt RIF-a najviše je povezan s procesom decidualizacije. Proces decidualizacije smatra se kritičnim za stvaranje i održavanje trudnoće. Decidualizirane stromalne stanice imaju sposobnost regulirati invaziju trofoblasta i majčin lokalni imunološki odgovor (46, 47). Postoje oprečna stajališta o vrijednosti istraživanja i liječenja imunoloških čimbenika u žena s RIF (48, 49).

### **3.2.2. Embrionalni uzroci ponavljanih implantacijskih neuspjeha**

Iako je uzrok RIF-a u većini slučajeva od strane majke, do toga stanja mogu dovesti i uzroci od strane embrija. Kvalitetan embrio je onaj koji sadrži odgovarajući broj stanica s obzirom na stupanj razvoja te odgovarajuću ekspanziju i kvalitetu embrionalnih stanica i trofoektoderma (10).

#### **3.2.2.1. Kvaliteta oocite**

Na lošu kvalitetu oocite sumnja se kada postoji loš odgovor na ovarijsku stimulaciju (50). Kvaliteta oocita pada s dobi majke kada dolazi do povećane incidencije kromosomskih abnormalnosti. To dovodi do češćih oštećenja mitohondrijske DNA (51). Osim oocite značajnu ulogu u procesu implantacije imaju i stanice *cumulusa oophorusa*. Te su stanice izvor prostaglandina i igraju ulogu u angiogenezi na mjestu implantacije (52).

### **3.2.2.2 Kvaliteta spermija**

Slabija kvaliteta spermija također utječe na slabiju kvalitetu embrija. Mnogo faktora kao što su pušenje, kemoterapija, radioterapija, infekcije genitalnog trakta mogu utjecati na oštećenje DNA unutar spermija (53, 54, 55). Studije su pokazale da je oštećenje DNA spermija povezano s postizanjem trudnoće i prirodnim i umjetnim putem (56, 57, 58).

### **3.2.2.3 Kromosomske abnormalnosti roditelja**

Dokazano je da balansirane translokacije u roditelja mogu rezultirati proizvodnjom gameta s kromosomskim aberacijama. To dovodi do neuspjeha reprodukcije od neispravne gametogeneze pa sve do rekurentnih spontanih pobačaja (59). Pokazalo se da parovi s RIF nepoznatog uzroka imaju 2.5% veću šansu da su nositelji balansirane kromosomske translokacije (60).

### **3.2.3 Ponavljani implantacijski neuspjeh neobjašnjenog uzroka**

Idiopatski RIF je onaj u kojega se pravi uzrok ne može utvrditi. Odnosi se na neobjašnjen neuspjeh u postizanju trudnoće nakon embriotransfera kvalitetnog zametka te kod izostanka anatomskih, histoloških, endokrinih, metaboličkih i imunoloških poremećaja u majke (61). Ovo ostavlja mjesta za nova istraživanja.

### **3.3. Dijagnostički postupak kod bolesnica s RIF**

U dijagnostičkom postupku kod parova koji se suočavaju s RIF-om potreban je detaljan i multidisciplinarni pristup. S obzirom na raznolikost etiologiju RIF-a, postupak treba

obuhvatiti ispitivanje rizičnih faktora od strane embrija i od strane para. Sukladno definiciji, u dijagnostički postupak potrebno je krenuti nakon neuspjelih embriotransfera najmanje 4 visokokvalitetna embrija u tri uzastopna ciklusa (1).

U dijagnostičkom postupku bolesnica s ponavljanim implantacijskih neuspjesima indicirane su sljedeće pretrage:

- kompletna i diferencijalna krvna slika
- predimplantacijska genetička dijagnoza (PGD) i probir na aneuploidiju
- kariogram supružnika
- spermogram partnera
- histeroskopija, trodimenzionalni ultrazvuk, histerosalpingografija i sonohisterografija
- trombofilijski testovi: faktor V Leiden, proteini C i S, protrombin, MTHFR C677T, antitrombin; antifosfolipida protutijela
- hormonske pretrage - FSH, LH, E2, P4, TSH, T3, T4, antitireoidna protutijela

### **3.4. Liječenje bolesnica s ponavljanim RIF**

Liječenje bolesnica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima usmjereno je na liječenje uzroka. Anatomski uzroci od strane majke indikacija su za histeroskopske intervencije kao što su miomektomija, polipektomija, septektomija, adhezioliza i ekscizija saktosalpinksa. Ako je uzrok RIF-a tanak i nereceptivan endometrij u obzir dolazi farmakološka terapija. Opcije su aspirin, sildenafil, visoke doze estrogena, gonadotropini, IVIg. Također, u nekim je slučajevima indicirana mehanička stimulacija. Trombofilija i antifosfolipidni sindrom liječe se heparinom, najčešće LMWH, odnosno kombinacijom heparina i aspirina. (62) Još se uvijek istražuje prigodna terapija za RIF neobjašnjenog uzroka.

#### 4. NISKOMOLEKULARNI HEPARIN - LMWH

Niskomolekularni heparin je antikoagulans dobiven enzimatskom (npr. tinzaparin) ili kemijskom (npr. nadroparin, dalteparin, enoxiparin) razgradnjom nefrakcioniranog heparina (UFH) (63). Heparin je smjesa sulfatnih mukopolisaharida koji se veže za površinu endotelnih stanica i plazmatskih proteina. Djeluje tako da inhibira proteine koagulacijske kaskade (trombin, faktor Xa, faktor IIa) tvoreći s njima stabilne komplekse. Učinak heparina ovisan je o prisutnosti endogenog antikoagulansa antritrombina. Vezanjem heparina za antitrombin dolazi do konformacijske promjene i otkrivaju se aktivna vezna mjesta na antitrombinu. To omogućuje bržu interakciju antitrombina s trombinom čije se djelovanje na taj način inhibira. (5, 64, 65). LMWH ima malu molekularnu masu od 4 300-5 000 kDa za razliku od UFH čija je masa 15 000 kDa. Zbog toga što je manji i nema mogućnost simultanog vezanja i za antitrombin i za trombin, LMWH je manje efikasan od UFH u inhibiciji faktora IIa, dok su u inaktivaciji faktora Xa jednako djelotvorni. Ni LMWH ni UHC ne prolaze placentarnu barijeru stoga je njihovo korištenje za vrijeme trudnoće sigurno. LMWH ima bolju bioraspoloživost, dulje vrijeme poluraspada u plazmi, manji rizik nastanka osteoporoze i trombocitopenije, rjeđe ga je potrebno aplicirati i odgovor na dozu je više predvidljiv. To su razlozi zbog kojih korištenje LMWH u trudnoći ima prednost pred UFH (66). LMWH se daje subkutano. Ima poluvijek eliminacije duži od UFH-a i ide kinetikom prvog reda stoga ga je lakše dozirati. Za razliku od UFH, LMWH ne produljuje APTV. Eliminacije LMWH odvija se preko bubrega što može predstavljati problem u slučajevima renalne insuficijencije kada je sigurnije davati UFH.

Uloga heparina u povećanju stope porođaja i uspješnih trudnoća nakon IVF-a u bolesnica s trombofilijom proučavana je u mnogim istraživanjima. Iako su rezultati manjkavi

i često oprečni, LMWH se koristi kao rutinska terapija kod navedenih stanja. Kombinacija LMWH i aspirina indicirana je u bolesnica s antifosfolipidnim sindromom (63). Također, dokazana je opravdanost njegove primjene u bolesnica s nasljednom trombofilijom (63, 67, 68).

Bolesnice koje prolaze proces ovarijske stimulacije te potom IVF-a, neovisno o nasljednoj trombofiliji i antifosfolipidnom sindromu mogu biti ugrožene stanjem pojačane koagulabilnosti krvi. Proces ovarijske stimulacije izlaže bolesnice visokim dozama egzogenih gonadotropina što dovodi do povećanog rizika od tromboze. Mogućnost heparina da modulira hemostatski odgovor na ovarijsku stimulaciju može smanjiti rizik od tromboze. Na ovaj način može povoljno utjecati na stopu trudnoća i porođaja u postupcima asistiranog oplodnje. (63)

Osim navedenih mehanizama djelovanja, dokazana je i uloga UFH i LMWH u brojnim procesima vezanim za implantaciju. Scott i Greer u svojoj su studiji pokazali utjecaj heparina na adheziju blastociste, implantaciju, invaziju i diferencijaciju trofoblasta i kako to može povoljno utjecati na ishod trudnoće. LMWH utječe na implantaciju djelujući na razne molekule kao što su selektini, E-kadherini, TGF-beta, interleukini, matriks metaloproteinaze, HB-EGF i IGF (63). LMWH modulira sintezu selektina, imunoglobulina važnih za staničnu adheziju, iz blastociste i endometrija (69). Dokazano je da smanjuje ekspresiju E-kadherina, glikoproteinskih adhezijskih molekula na stanicama endometrija, što se pripisuje njegovoj mogućoj ulozi u promociji ekstravilozne diferencijacije trofoblasta (70, 71). LMWH inhibira djelovanje TGF- $\beta$  koji je zadužen za inhibiciju diferencijacije i invazije trofoblasta u deciduu (72). Njegova se uloga može vidjeti i u povećanju IL-1 u aktiviranim leukocitima što vjerojatno pozitivno utječe na adheziju blastociste (73, 74). Potiče transkripciju i ekspresiju matriks metaloproteinaza 2 i 9. Matriks metaloproteinaze 2 i 9 spadaju u skupinu gelatinaza i

imaju sposobnost razgradnje kolagena tip IV, glavne komponente bazalne membrane (75). Tako omogućuju invaziju trofoblasta kroz deciduu do krvnih žila maternice (76, 77). LMWH potpomaže razvoj embrija u IVF u stadij blastociste preko HB-EGF (78,79). Također, povećava razinu IGF-I, važnog faktora rasta uključenog u implantaciju i fetalni razvoj (80,81).

## **5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je prikazati karakteristike i reproduksijske ishode kod bolesnica koje su tijekom trudnoće primale niskomolekularni heparin, a koje su bile liječene na Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb od 2013. do 2017. godine s naglaskom na bolesnice s ponavljanim implantacijskim neuspjesima.

## **6. ISPITANICI I METODE**

Ispitanici su bolesnice u reproduktivnoj dobi liječene LMWH-om na Zavodu za humanu reprodukciju u Klinici za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb u razdoblju od 2013. do 2017. godine. Prikupljanjem podataka obuhvaćeno je 139 bolesnica koje su primale LMWH. Iz istraživanja su isključene bolesnice koje su započele s primjenom LMWH nakon 6. tjedna trudnoće. U statističku analizu uključeno je 87 bolesnica kod kojih je primjena LMWH započeta prilikom stimulacije ovulacije, embriotransfera ili pozitivnog testa na trudnoću.



Na temelju proučene medicinske dokumentacije prikupljene iz Bolničkog informacijskog sustava (BIS) dobiveni su podaci o bolesnicama. Prikupljeni podaci uneseni su u računalni program Microsoft Excel te analizirani pomoću IBM-ovog programa SPSS u kojem su izrađeni i grafovi.

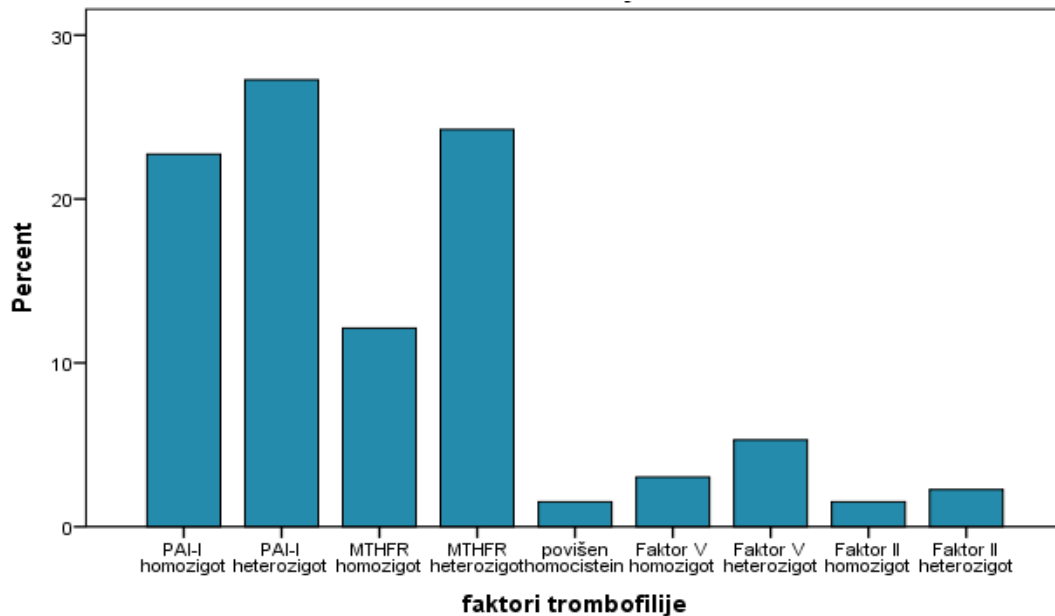
## **7. REZULTATI**

U razdoblju između 2013. i 2017.godine na Zavodu za humanu reprodukciju KBC-a Zagreb, obrađeno je 87 bolesnica koje su primale LMWH od stimulacije ovulacije, embriotransfera ili pozitivnog testa na trudnoću.

Od 87 bolesnica, 78 bolesnica (89,66%) imalo je neku od mutacija trombofilijskih faktora (faktor V Leiden, faktor II, MTHFR, PAI-I, homocistein, protein C, protein S i antitrombin III). Devet bolesnica (10,34%) nije imalo ni jednu od mutacija trombofilijskih faktora.

Od dijagnostičkih testova trombofilije rađeni su sljedeći testovi: mutacije faktora koagulacije V-Leiden, faktora koagulacije II-protrombina, MTHFR, PAI-I, mjerenje razine homocisteina. U najvećem broju slučajeva radilo se o homozigotnoj mutaciji za PAI-I, 36 bolesnica, zatim heterozigotnoj mutaciji za MTHFR, 32 bolesnice. Trideset bolesnica bilo je heterozigot za PAI-I, a 16 bolesnica homozigot za MTHFR. Dvije bolesnice imale su povišene razine homocisteina uz mutaciju MTHFR. Četiri bolesnice bile su homozigoti za faktor koagulacije V-Leiden, a njih 7 heterozigoti. Homozigotnu mutaciju faktora koagulacije

II imale su 2 bolesnice, a heterozigotnu mutaciju istog gena njih 3. Protein S, protein C i antitrombin bili su normalnih vrijednosti kod svih bolesnica.



**Slika 7.-1 Trombofilijski testovi kod bolesnica koje su primale LMWH**

Od 78 bolesnica s mutacijom nekog od trombofilijskih faktora, njih 13 (16,67%) imalo je u obiteljskoj anamnezi mutacije trombofilijskih faktora, duboku vensku trombozu ili plućnu emboliju. Osmam bolesnica imalo je obiteljsku anamnezu nasljedne trombofilije u prvom koljenu (61,54%), 3 bolesnice DVT u prvom koljenu (23,08%), 1 bolesnica imala je pozitivnu obiteljsku anamnezu plućne embolije u 1.koljenu (7,69%).

Od 87 bolesnica koje su primale LMWH na Zavodu za humanu reprodukciju, njih 61 primalo je Clexane (enoksiparin), a njih 26 primalo je Fraxiparine (nadroparin). Doze Clexanea bile su 0,4ml i/ili 0,6ml. Doze Fraxiparinea bile su 0,4ml.

Od 87 bolesnica, podaci o reprodukcijском ishodu dostupni su za 81 bolesnicu. Od 81 bolesnice, 41 bolesnica prolazila je postupak potpomognute oplodnje, a 40 bolesnica zatrudnjelo je spontanim putem.

Od 41 bolesnice koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje, njih 31 je rodilo, 2 bolesnice imale su spontani pobačaj, a kod 8 bolesnica nije došlo do trudnoće odnosno imale su implantacijski neuspjeh.

Od bolesnica koje su zatrudnjele uz pomoć IVF-a, većina je primala LMWH od 1.dana embriotransfera ili stimulacije ovulacije (22 bolesnice). Od te 22 bolesnice, 14 bolesnica je rodilo (63,64%), a kod 8 bolesnica (36,3%) nije došlo do trudnoće.

Ostale bolesnice koje su prolazile postupak umjetne oplodnje primale su LMWH od pozitivnog testa na trudnoću, odnosno 4.,5. ili 6.tjedna trudnoće.

Bolesnice koje su zatrudnjele spontanim putem (40 bolesnica), primale su LMWH od pozitivnog testa na trudnoću (4.,5. ili 6.tjedna trudnoće).

Od 40 bolesnica koje su zatrudnjele spontanim putem, rodilo je njih 29, a 10 bolesnica imalo je spontani pobačaj, od čega je kod 1 bolesnice došlo do pobačaja jednog od dva ploda.

U tablici 7.-1. prikazani su razlozi uvođenja LMWH te ishod trudnoće kod bolesnica u postupku IVF-a kojima je LMWH uveden kao terapija 1.dana embriotransfera ili od stimulacije ovulacije. Najčešća mutacija trombofilijских faktora u ovoj grupi bolesnica bila je homozigotna mutacija PAI-I (9 bolesnica). Heterozigot za PAI-I bilo je 7 bolesnica. Homozigotnu mutaciju MTHFR imale su 4 bolesnice, a heterozigotnu mutaciju MTHFR imalo je 6 bolesnica. Dvije bolesnice imale su lagano povišene vrijednosti homocisteina. Tri bolesnice bile su heterozigoti za faktor V-Leiden, a 1 bolesnica bila je homozigot za faktor II. Tri bolesnice nisu imale nikakve mutacije trombofilijских faktora. Četrnaest bolesnica rodilo je zdravo novorođenče u terminu dok kod 8 bolesnica nije došlo do trudnoće.

**Tablica 7.-1. Razlozi primjene LMWH i ishod trudnoće u bolesnica u postupku IVF-a**

Dan uvođenja LMWH	Razlog uvođenja LMWH	Ishod trudnoće
Od stimulacije ovulacije	PAI-I heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	Faktor V heterozigot, MTHFR homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	Faktor V heterozigot, MTHFR homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	PAI-I homozigot, MTHFR homozigot	Nije došlo do trudnoće
	Ne može zatrudnjeti	Nije došlo do trudnoće
	Faktor II heterozigot	Nije došlo do trudnoće

<b>Od 1. dana embriotransfera</b>	MTHFR heterozigot, PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	MTHFR heterozigot, PAI-I heterozigot	Nije došlo do trudnoće
	PAI-I homozigot	Nije došlo do trudnoće
	Ne može zatrudnjeti	Nije došlo do trudnoće
	PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	MTHFR heterozigot, PAI-I heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	MTHFR homozigot, PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	MTHFR homozigot, PAI-I homozigot	Nije došlo do trudnoće
	PAI-I heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	Spontani pobačaji	Nije došlo do trudnoće
	MTHFR heterozigot, PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	PAI-I homozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	MTHFR heterozigot, PAI-I heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	PAI-I heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta
	Faktor V heterozigot, MTHFR heterozigot	Porođaj u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta

Od 59 bolesnica kojima je LMWH uveden od pozitivnog testa na trudnoću, odnosno između 4.i 6.tjedna trudnoće, njih 19 bilo je na IVF-u, a njih 40 zatrudnjelo je spontano.

**Tablica 7.-2. Ishod spontanih i IVF trudnoća u pacijentica koje su primale LMWH od pozitivnog testa na trudnoću**

	<b>Spontane trudnoće</b>	<b>IVF trudnoće</b>
<b>Pobačaji</b>	10 (25%)	2 (10,52%)
<b>Porodaji</b>	30 (75%)	17 (89,48%)

Od bolesnica kojima je LMWH uveden od pozitivnog testa na trudnoću, a zatrudnjele su putem IVF-a, 10 bolesnica bile su heterozigoti za PAI-I, 6 za MTHFR, 6 homozigoti za PAI-I i 3 homozigoti za MTHFR. U ovoj skupini bolesnica, 17 trudnoća (89,47%) završilo je porođajem u terminu s rađanjem zdravog novorođenčeta. Kod dvije bolesnice (PAI-I heterozigot i PAI-I homozigot) došlo je do zadržanog pobačaja u 8.i 9. tjednu trudnoće.

Najveći broj bolesnica kojima je LMWH uveden od pozitivnog testa na trudnoću, a zatrudnjele su spontanom putem, imale su homozigotnu mutaciju PAI-I (19 bolesnica). Trinaest bolesnica bilo je heterozigot za PAI-I. Heterozigotna mutacija MTFHR bila je prisutna kod 17 bolesnica, a homozigotna mutacija istog gena kod 5 bolesnica. Heterozigoti

za faktor V Leiden bile su 2 bolesnice, a homozigot 2 bolesnice. Homozigotnu mutaciju faktora II imala je 1 bolesnica, a heterozigotnu mutaciju 2 bolesnice.

Od 40 bolesnica koje su zatrudnjele spontanom putem, njih 14 (35%) je ranije imalo uspješnu trudnoću i porođaj. Sedamnaest bolesnica (42,5%) imalo je barem jedan spontani pobačaj. Od 41 bolesnice koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje, njih 4 (9,76%) je ranije imalo uspješnu trudnoću i porođaj, a njih 10 (24,39%) imalo je barem jedan pobačaj.

## 8. RASPRAVA

Strategija primjene niskomolekularnog heparina (LMWH) s idejom poboljšanja problema perinatalnog rizika te povećanja broja uspješnih trudnoća nakon IVF-a, područje je interesa mnogih istraživanja. Opravdanost njegove primjene u bolesnica s nasljednom trombofilijom dokazana je u različitim istraživanjima (63, 67, 68). Utvrđena je i njegova uloga u modeliranju mnogih poznatih mehanizama koji su temelj uspješne implantacije (4). Opravdanost primjene LMWH odnosi se na njegovu sposobnost sprečavanja stvaranja tromba čime se trofoblast štiti od ozljede te se tako potiče uspješna implantacija i naknadna placentacija (84). Brojni istraženi učinci LMWH čine ga potencijalnom terapijom za bolesnice s ponavljanim implantacijskim neuspjesima neovisno o trombofiliji.

U retrospektivnoj kohortnoj kontroliranoj studiji o utjecaju LMWH i aspirina na ishod stope živorođene djece nije pronađen statistički značajan rezultat. Studija je obuhvaćala 234 bolesnice mlađe od 44 godine koje su imale 1 ili više neuspješnih IVF ciklusa. Bolesnice su primale LMWH i/ili aspirin. Zaključak te studije bio je da LMWH i/ili Aspirin ne povećavaju uspješnost IVF-a (82).

Metaanaliza o učinku heparina na ishod IVF-a pokazala je oprečne rezultate. Metaanaliza randomiziranih studija pokazala je da nema razlike u kliničkoj stopi trudnoća (RR 1,23, 95% CI 0,97-1,57), stopi živorođene djece (RR 1,27, 95% CI 0,89-1,81), stopi implantacije (RR 1,39, 95% CI 0,96-2,01) i stopi spontanog pobačaja (RR 0,77, 95% CI 0,24-2,42) u žena koje su uzimale LMWH u usporedbi s placebom tijekom postupka IVF-a. Ipak, metaanaliza opservacijskih studija pokazala je statistički značajan porast u kliničkoj stopi trudnoće (RR 1,83, 95% CI 1,04-3,23, P = 0,04) i stopi živorođene djece (RR 2,64, 95% CI 1,84- 3,80, P <0,0001) (83).



Ovo istraživanje obuhvatilo je 87 bolesnica koje su primale LMWH od stimulacije ovulacije, embriotransfera ili od pozitivnog testa na trudnoću. Većina bolesnica imala je neku od mutacija faktora trombofilije (78 bolesnica, 89,66%). Najčešća mutacija bila je mutacija PAI-I gena (homozigoti-36 bolesnica, 46,15%, heterozigoti-30 bolesnica, 38,46%). Slične rezultate dobili su u svom istraživanju Bigdeli i suradnici. Oni su proučavali povezanost između mutacija faktora trombofilije i nepovoljnih reproduktivskih ishoda te su utvrdili da je najčešća mutacija, s učestalošću od čak 65%, mutacija PAI-I (homozigoti i heterozigoti). Uspoređujući istraživanu s kontrolnom skupinom, došli su do zaključka da je nepovoljni reproduktivski ishod 5,5 puta češći kod bolesnica s PAI-I mutacijom. Za MTHFR gen utvrdili su 2,7 puta veću učestalost nepovoljnih reproduktivskih ishoda u istraživanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (85).

U ovom istraživanju uspoređivane su dvije skupine bolesnica, one koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje i one koje su zanijele spontanom putem. Unutar grupe bolesnica koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje, postotak porođaja nakon primjene LMWH bio je 75,61% (31/41 bolesnica), a postotak pobačaja bio je 2,88% (2/41 bolesnica). Kod 8 bolesnica (19,51%) nije došlo do trudnoće nakon primjene LMWH, odnosno imale su implantacijski neuspjeh. U grupi bolesnica koje su zanijele spontanom putem, postotak porođaja nakon primjene LMWH bio je 72,5% (29/40 bolesnica), a postotak pobačaja 25% (10/40 bolesnica).

Unutar grupe bolesnica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima koje su prolazile postupak potpomognute oplodnje, njih 22 je primalo LMWH od stimulacije ovulacije ili od embriotransfera. Uspješnu trudnoću, odnosno porođaj zdravog novorođenčeta u terminu imalo je 14 od 22 bolesnice (63,64%), dok je implantacijski neuspjeh imalo 8 od 22

bolesnice (36,36%). Unutar skupine bolesnica koje su primale LMWH od pozitivnog testa na trudnoću (19 bolesnica), njih 17 (89,47%) imalo je uspješan porođaj zdravog novorođenčeta u terminu, dok su 2 bolesnice (10,53%) imale spontani pobačaj.

## 9. ZAKLJUČAK

Primjena niskomolekularnog heparina kod bolesnica s nasljednom trombofilijom, usprkos oprečnim rezultatima istraživanja, koristi se u današnjoj rutinskoj praksi. S obzirom na raznolike i oprečne rezultate može se zaključiti da opravdanost primjene LMWH kod RIF-a neobjašnjenog uzroka nije dovoljno istražena. Brojni dokazani i potencijalni učinci LMWH otvaraju pitanja o mogućnosti njegove šire primjene. Skupina bolesnica koja je analizirana u ovom istraživanju je heterogena te se na temelju ovih podataka ne može sa sigurnošću tvrditi o opravdanosti primjene LMWH u pacijentica s ponavljanim implantacijskim neuspjesima. Tema zahtjeva dodatnu detaljniju obradu.

## **10. ZAHVALE**

Prije svega, želim se zahvaliti svome mentoru prof.dr.sc.Hrvoju Vrčiću na prilici da radim ovaj rad, na pomoći, savjetima i prenesenom znanju. Hvala i članovima komisije na korisnim savjetima i kritikama.

Hvala mojim roditeljima i ostatku obitelji što su mi bili podrška u svakom trenutku mog obrazovanja i bez kojih to ne bi bilo moguće. Hvala mojim sestrama na vedrini i pozitivnoj energiji koju su prenosile na mene. Hvala mojim prijateljima i mom partneru na smijehu, poticanju, podršci i razumijevanju.

## 11. LITERATURA

1. Coughlan C et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013.
2. Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2014;103:551–563.
3. Fiedler K, Wurfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res*. 2004;9:207–214.
4. Nelson SM, Greer IA. Potential role of heparin in assisted conception. *Hum Reprod Update*. 2008;14(6):623-45.
5. Cunnigham, F Gary. *Williams obstetrics*. 24th edition. New York: McGraw-Hill Education/ Medical. 2014.
6. O'Sullivan CM, Liu SY, Karpinka JB, et al. Embryonic hatching enzyme strypsin/ISP1 is expressed with ISP2 in endometrial glands during implantation. *Mol Repod Dev*. 2002; 62:328.
7. Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, et al. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril*. 2002;78:221, 2002
8. Licht P, Russu V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) int he embryo –endometrial microenvironment: implications for differentiation nad implantation. *Semin Repod Med*. 2001; 19:37.

9. Lessey BA, Castelbaum AJ: Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3:107.
10. Cutting, R., Morroll, D., Roberts, S.A., Pickering, S., Rutherford, A. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum. Fertil. (Camb.)* 2008; 11, 131–146.
11. Taylor, E., Gomel, V. The uterus and fertility. *Fertil. Steril.* 2008; 89, 1–16.
12. Fedele, L., Arcaini, L., Parazzini, F., Vercellini, P., Di Nola, G. Reproductive prognosis after hysteroscopic metroplasty in 102 women: life-table analysis. *Fertil. Steril.* 1993; 59, 768–772.
13. Pabuccu, R., Gomel, V. Reproductive outcome after hysteroscopic metroplasty in women with septate uterus and otherwise unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 2004; 81, 1675–1678.
14. Fedele, L., Bianchi, S., Agnoli, B., Tozzi, L., Vignali, M. Urinary tract anomalies associated with unicornuate uterus. *J. Urol.* 1996;155, 847–848.
15. Makrakis, E., Pantos, K. The outcomes of hysteroscopy in women with implantation failures after in-vitro fertilization: findings and effect on subsequent pregnancy rates. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2010; 22, 339–343.
16. V.C. Buttram Jr., R. Reiter. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil. Steril.* 1981;36:433-445
17. E.A. Pritts, W.H. Parker, D.L. Olive. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil. Steril.* 2009;91:1215-1223.

18. T. Eldar-Geva, S. Meagher, D.L. Healy, V. MacLachlan, S. Breheny, C. Wood. Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertil. Steril.* 1998;70:687-691.
19. R. Hart, Y. Khalaf, C.T. Yeong, P. Seed, A. Taylor, P. Braude. A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum. Reprod.* 2001;16:2411-2417.
20. S.K. Sunkara, M. Khairy, T. El-Toukhy, Y. Khalaf, A. Coomarasamy. The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2010;25:418-429.
21. Richlin, S.S., Ramachandran, S., Shanti, A., Murphy, A.A., Parthasarathy, S. Glycodelin levels in uterine flushings and in plasma of patients with leiomyomas and polyps: implications for implantation. *Hum. Reprod.* 2002;17, 2742–2747.
22. Bosteels, J., Weyers, S., Puttemans, P., Panayotidis, C., Van Herendael, B., Gomel, V., Mol, B.W., Mathieu, C., D’Hooghe, T. The effectiveness of hysteroscopy in improving pregnancy rates in subfertile women without other gynaecological symptoms: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 16. 2010;1–11.
23. Demirel, A., Gurgan, T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure. *Reprod. Biomed. Online* 8. 2004; 590–594.
24. Dawood, A., Al-Talib, A., Tulandi, T. Predisposing factors and treatment outcome of different stages of intrauterine adhesions. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2010;32, 767–770.

25. Yasmin, H., Nasir, A., Noorani, K.J. Hystroscopic management of Ashermans syndrome. *J. Pak. Med. Assoc.* 2007;57, 553–555.
26. Pace, S., Stentella, P., Catania, R., Palazzetti, P.L., Frega, A. Endoscopic treatment of intrauterine adhesions. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2003;30, 26–28.
27. Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med.* 1989;34(1):41-6
28. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002;77(6):1148-55.
29. Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohí J, Simón C. Ann N Y. Endometrial quality in infertile women with endometriosis *Acad Sci.* 2001;943:122-30.
30. A. Maheshwari, S. Gurunath, F. Fatima, S. Bhattacharya. Adenomyosis and subfertility: a systematic review of prevalence, diagnosis, treatment and fertility outcomes. *Hum. Reprod. Update.* 2012;18:374-392
31. Strandell A, Waldenstorm U, Nilsson L, Hamberger L. Hydrosalpinx reduces in-vitro fertilization/embryo transfer pregnancy rates. *Hum Reprod* 1994;9:861-3.
32. Lockwood CJ: Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:0333.
33. Pierangeli SS, Leader B, Barilaro G, et al: Acquired and inherited trombophilia disorders in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2011; 38:271.
34. Anderson JA, Weitz JI: Hypercoagulable states. *Crit Care Clin.* 2011; 27:933.



35. Sultan AA, West J, Tata LJ, et al: Risk of first venous thromboembolism in and around pregnancy: a population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2011; 156:366.
36. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al: Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol.* 2005; 132:171.
37. Alfirovic Z, Roberts D, Martlew W. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;101(1):6-14.
38. Di Nisio M, Rutjes AW, Ferrante N, Tiboni GM, Cuccurullo F, Porreca E. Blood. Thrombophilia and outcomes of assisted reproduction technologies: a systematic review and meta-analysis. 2011;118(10):2670-8.
39. E. Grandone, D. Colaizzo, A. Lo Bue, M.G. Checola, E. Cittadini, M. Margaglione. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertil. Steril.* 2001;76:201-202.
40. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2694-8.
41. American College of Obstetricians and Gynecologists: Antiphospholipid syndrome. *Practice Bulletin* 132. 2012.
42. Silver RM, Branch DW. Recurrent miscarriage: autoimmune considerations. *Clin Obstet Gynecol.* 1994;37(3):745-60.

43. Veleva Z, Tiitinen A, Vilska S, Hydén-Granskog C, Tomás C, Martikainen H, Tapanainen JS. High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Hum Reprod.* 2008;23(4):878-84.
44. González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simon C. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4883-8.
45. Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006;20(2):235-44.
46. Blois, S.M., Klapp, B.F., Barrientos, G. Decidualisation and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J. Reprod. Immunol.* 2011;88, 86–92.
47. Gellersen, B., Brosens, I.A., Brosens, J.J. Decidualisation of the human endometrium: mechanisms, functions and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* 2007; 25, 445–453.
48. Clark, D.A., Stricker, R.B. Is intravenous immunoglobulins (IVIg) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilisation and embryo transfer (IVF). *J. Assist. Reprod. Genet.* 2006;23, 113.
49. Stephenson, M.D., Fluker, M.R. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil. Steril.* 2006;74, 1108–1113.

50. Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum. Reprod.* 2011; 26, 1616–1624.
51. Wang, L.Y., Wang, D.H., Zou, X.Y., Xu, C.M. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2010;10, 483–492.
52. Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J., Hamamah, S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol. Hum. Reprod.* 2010;16, 531–538.
53. Erenpreiss, J., Bungum, M., Spano, M., Elzanaty, S., Orbidans, J., Giwercman, A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum. Reprod.* 2006;21, 2061–2064.
54. Morris, I.D. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int. J. Androl.* 2002; 25, 255–261.
55. Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J., Jefferies, T.M. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.* 1999;423, 103–111.
56. Evenson, D.P., Wixon, R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 2008;90, 1229–1231.
57. Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., Giwercman, A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 2004;19, 1401–1408.

58. Duran, E.H., Morshedi, M., Taylor, S., Oehninger, S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.* 2002;17, 3122–3128.
59. Crosignani, Rubin. *Genetic Control of Gamete Production and Function*. Academic Press, New York. 1999.
60. Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M., Kasterstein, E., Strassburger, D., Ron-EI, R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 2002;78, 515–519.
61. Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent Implantation Failure: The Role of the Endometrium *J Reprod Infertil.* 2014; 15(4): 173–183.
62. Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF); *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(11): 1227–1239.
63. Nelson SM, Greer IA. Potential role of heparin in assisted conception. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):623-45.
64. B.Katzung. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izdanje, McGraw Hill, New York. 2011.
65. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology*, International edition, 7th edition, Churchill Livingstone, London. 2012.
66. Bates SM, Greer IA, Middledorp S, et al. VTE, trombophilia, antitrombotic therapy, and pregnancy. *Chest.* 2012;141:e691S.

67. Brenner B, Hoffman R, Carp H, Dulitsky M, Younis J. Efficacy and safety of two doses of enoxaparin in women with thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the LIVE-ENOX study. *J Thromb Haemost* 2005;3:227–229.
68. Fiedler K, Würfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res.* 2004;9(4):207-14
69. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L and P-selectins. *J Clin Invest.* 2002;110:127– 136.
70. Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Vince G. Effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin on trophoblast function. *Obstet Gynecol.* 2004;104:354–361.
71. Erden O, Imir A, Guvenal T, Muslehiddinoglu A, Arici S, Cetin M, Cetin A. Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry. *Hum Reprod.* 2006;21:3014–3018.
72. Weigert C, Brodbeck K, Haring HU, Gambaro G, Schleicher ED. Low-molecular-weight heparin prevents high glucose- and phorbol ester-induced TGF-beta 1 gene activation. *Kidney Int.* 2001;60:935–943
73. Call DR, Remick DG. Low molecular weight heparin is associated with greater cytokine production in a stimulated whole blood model. *Shock* 1998;10:192– 197.

74. Dimitriadis E, Stoikos C, Baca M, Fairlie WD, McCoubrie JE, Salamonsen LA. Relaxin and prostaglandin E2 regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3458–3465.
75. Šerman Lj, Šerman A. Uloga glikoproteina u procesima implantacije i placentacije. *Gynaecol Perinatol*. 2006;15(2):82–88.
76. Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts placenta. 2003;24:53– 64
77. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:59
78. Martin DC, Fowlkes JL, Babic B, Khokha R. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol*. 1999;146:881– 892.
79. Armant DR, Kilburn BA, Petkova A, Edwin SS, Duniec-Dmuchowski ZM, Edwards HJ, Romero R, Leach RE. Human trophoblast survival at low oxygen concentrations requires metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 2006;133: 751–759.
80. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945–948.

81. Moller AV, Jorgensen SP, Chen JW, Larnkjaer A, Ledet T, Flyvbjerg A, Frystyk J. Glycosaminoglycans increase levels of free and bioactive IGF-I in vitro. *Eur J Endocrinol* 2006;155:297–305.
82. Akhtar MA, Eljabu H, Hopkisson J, Raine-Fenning N, Quenby S, Jayaprakasan K. Aspirin and heparin as adjuvants during IVF do not improve live birth rates in unexplained implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):586-94.
83. Seshadri S, Sunkara SK, Khalaf Y, El-Toukhy T, Hamoda H. Effect of heparin on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(6):572-84.
84. Qublan H, Amarin Z, Dabbas M et al. LMWH in the treatment of recurrent IVF-ET failure and thrombophilia: a prospective randomized placebo controlled trial. *Infertility&IVF Center, King Hussein Medical Center, Amman, Jordan Hum Fertil (Camb.)* 2008;11(4):246-53
85. Bigdeli R, Younesi MR, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H et al. Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2018;10.1080/1939368.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.9.1993. u Puli. Osnovnu školu završila sam u Poreču, a srednju školu u Pazinu. Maturirala sam 2012.godine u Gimnaziji i strukovnoj školi Jurja Dobrile te iste godine upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija bila sam demonstrator na Katedri za kirurgiju Medicinskog fakulteta. Od 3.godine fakulteta bila sam kapetan ženske odbojkaške sekcije fakulteta, a od 4.godine potpredsjednica Sportske udruge studenata medicine „SportMEF“. U sklopu odbojkaške sekcije više sam puta sam osvajala 2.i 3.mjesta na Sveučilišnim prvenstvima grada Zagreba i Humanijadama. U sklopu udruge „SportMEF“ aktivno sam sudjelovala u organizaciji raznih projekata, kao natjecanja „162 stube“ za što smo nagrađeni Rektorovom nagradom 2017.godine. Kao član odbojkaške ekipe Sveučilišne reprezentacije, natjecala sam se na Europskim igrama Zagreb-Rijeka 2016.i osvojila 8.mjesto. Aktivno sam sudjelovala u Danima zdravstvenih karijera te sam 2018.godine vodila tribinu na temu „Žene u medicini- obitelj vs.karijera“. Sudjelovala sam u javnozdravstvenim akcijama koje se odigravaju u sklopu kongresa Štamparovi dani u Požeško-Slavonskoj županiji. U rujnu 2017.godine odradila sam ljetnu praksu u Maroku, Marakeš, na odjelu za ginekologiju i opstetriciju, u trajanju od mjesec dana. Osim fakultetskih aktivnosti, tijekom akademskog obrazovanja trenirala sam i igrala odbojku u 1.hrvatskoj ligi.