

Povezanost polimorfizma Asn680/Ser680 receptora za FSH i odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika kod žena u postupku izvantjelesne oplodnje

Bauman, Renato

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:365725>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

RENATO BAUMAN

**POVEZANOST POLIMORFIZMA Asn680/Ser680
RECEPTORA ZA FSH I ODGOVORA NA
KONTROLIRANU STIMULACIJU JAJNIKA KOD
ŽENA U POSTUPKU IZVANTJELESNE OPLODNJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

RENATO BAUMAN

**THE RELATION OF FSH RECEPTOR Asn680ISer680
POLYMORPHISM ON THE CONTROLLED OVARIAN
STIMULATION RESPONSE IN PATIENTS
UNDERGOING IN VITRO FERTILISATION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

RENATO BAUMAN

**POVEZANOST POLIMORFIZMA Asn680/Ser680
RECEPTORA ZA FSH I ODGOVORA NA
KONTROLIRANU STIMULACIJU JAJNIKA KOD
ŽENA U POSTUPKU IZVANTJELESNE OPLODNJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Jerka Dumić, red. prof.

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

RENATO BAUMAN

**THE RELATION OF FSH RECEPTOR Asn680/Ser680
POLYMORPHISM ON THE CONTROLLED OVARIAN
STIMULATION RESPONSE IN PATIENTS
UNDERGOING IN VITRO FERTILISATION**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Professor Jerka Dumić

Zagreb, 2012

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravsiva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice "Sveti Duh" Zagreb te na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu izvandoktorskog studija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Srdačno zahvaljujem na suradnji, pomoći i povjerenju te nesebičnom i neprestanom entuzijazmu voditeljici rada prof dr. sc. Jerki Dumić, bez čijeg pozitivnog stava ovaj rad zasigurno ne bi doživio dan uveza.

Doc. dr. sc. Sanji Dabelić zahvaljujem na svesrdnoj pomoći pri genetičkim analizama. Gospođi Ankici Anić, lab. med. ing. i doc. dr. sc. Vlatku Rumenjaku zahvaljujem na suradnji i pomoći pri analizi laboratorijskih hormonskih parametara.

Na iznimnoj pomoći pri statističkoj obradi rezultata najljepše zahvaljujem doc. dr. sc. Nataši Bogavac-Stanojević.

Dr. sc. Sanji Vujisić i dr. sc. Dariji Hafner veliko hvala za suradnju i pomoć pri analizi folikularnog aspirata i izolaciji jajnih stanica.

Za suradnju i pomoć prilikom uzimanja uzoraka iskrenu zahvalnost želim iskazati dr. Tatjani Pavelić Turudić, dr. sc. Ivani Erceg Ivkošić, dr. Zlatki Srebrniković, dr. Ivi Laušin, dr. sc. Ankici Tikvici te medicinskim sestrama Jadranki Radovanović i Peri Škopljanac.

Doc. dr. sc. Feodori Stipoljev iskreno hvala na inspiraciji i iskazanoj brizi za završetak rada. Cjelokupnom osoblju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu zahvaljujem na suradnji i pomoći.

Osobne zahvale upućujem mojoj obitelji, a posebice supruzi Gruši na iskrenim poticajima i konkretnoj pomoći na putu do obrane doktorskog rada.

SAŽETAK

Uspješnost postupka izvantjelesne oplodnje (IVF) uvelike ovisi o odgovoru jajnika na kontroliranu stimulaciju čija se adekvatnost povezuje s prisutnošću polimorfizma 2039G>A u genu za receptor folikul stimulirajućeg hormona (FSHR), kao i bazalnom koncentracijom FSH, luteinizirajućeg hormona (LH), estradiola (E2), hormona koji stimulira tireoideu (TSH) i prolaktina. Polimorfizam jedne baze (SNP) rezultira zamjenom asparagina serinom na položaju 680 u FSHR (Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰). Kako bi se pridonijelo rasvjetljavanju korisnosti ovog polimorfizma u predviđanju odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, analiziran je genotip 211 žena podvrgnutih postupku izvantjelesne oplodnje te im je uz hormonski status određeni broj antralnih folikula. Primjenom odgovarajućih statističkih testova utvrđeno je da genotip za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR* nije dobar prediktor ovarijske rezerve niti odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, pa se genskim probirom ne mogu jednoznačno identificirati ispitanice s mogućim lošijim odgovorom na COS. Ipak, nađeno je da genotipizacija za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ima potencijalnu vrijednost za identifikaciju ispitanica mlađe dobi genotipa Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ koje su predisponirane za pojačan odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju. Utvrđeno je također, da je najbolji neovisan prediktor ovarijske rezerve i odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika (*eng.* controlled ovarian stimulation, COS) mjereno prije započinjanja terapije, broj antralnih folikula, a da predikcijski model formiran na temelju parametara određenih prije početka COS (broj antralnih folikula, dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, E2 i TSH) zbog svoje dijagnostičke točnosti veće od dijagnostičke točnosti broja antralnih folikula (AUC 0,89 vs. 0,84) može značajno pridonijeti procjeni odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju. Koncentracija E2 izmjerena na dan primjene humanog korionskog gonadotropina za stimulaciju ovulacije uz veliku dijagnostičku točnost (AUC = 0,91) najbolji je neovisni prediktor odgovora na COS.

Ključne riječi: izvantjelesna oplodnja, receptor za folikul stimulirajući hormon, polimorfizam jedne baze Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR*

SUMMARY

The successfulness of the *in vitro* fertilization (IVF) largely depends on the women's response on controlled ovarian stimulation which adequateness has been assumed to be connected to the single nucleotide polymorphism (SNP) 2039G>A in follicle-stimulating hormone receptor gene, as well as the basal concentration of follicle —stimulating hormone (TSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), thyroid-stimulating hormone (TSH) and prolactin. With the purpose to contribute to the evaluation of SNP 2039G>A in a prediction of ovarian response to the controlled stimulation, 211 women undergoing IVF were genotyped.

In addition to hormonal status determination, the number of antral follicles was estimated. Using appropriate statistical analyses it was found that genotype of SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ in *FSHR* gene is neither a good predictor of ovarian reserve nor ovarian response on controlled stimulation. Thus, genetic screening for poor responders on controlled ovarian stimulation (COS) is not diagnostically valuable. However, it was found that genotyping of this SNP could be potentially useful for identification of women of younger age (< 32 years) with Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ genotype predisposed for hyperresponse on controlled stimulation. It was also found that the best independent predictor of ovarian reserve and response on COS determined before the therapy application is antral follicle count (AFC), while the prediction model formed of the parameters determined before the therapy application (AFC, age, body mass index, basal concentration of FSH, E2 and TSH) based on higher diagnostic accuracy than AFC (AUC 0,89 vs. 0,84) could significantly contribute to the prediction of ovarian response on COS. E2 concentration measured on the day of application of human chorionic gonadotropine for stimulation of ovulation with highest diagnostic accuracy (AUC = 0,91) is the best independent predictor of ovarian response on controlled stimulation.

Keywords: *in vitro* fertilisation; follicle-stimulating hormone receptor, single nucleotide polymorphism Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ in *FSHR* gene

SADRŽAJ

1 Uvod.....	1
1.1 Neplodnost.....	2
1.1.1 Genetski uzroci neplodnosti.....	3
1.1.2 Folikulogeneza.....	4
1.1.3 Hormoni u reprodukciji.....	5
1.1.3.1 Hormoni hipotalamusa.....	5
1.1.3.2 Hormoni hipofize.....	6
1.1.3.2.1 Folikul stimulirajući hormon i luteinizirajući hormon.....	6
1.1.3.2.2 Prolaktin.....	9
1.1.3.2.3 Hormon koji stimulira tireoideu.....	10
1.1.3.3 Hormoni jajnika.....	10
1.1.3.3.1 Estrogeni.....	10
1.1.3.3.2 Progesteron.....	11
1.1.3.3.3. Antimilerijski hormon.....	11
1.1.3.3.4 Inhibin B.....	12
1.1.4 Receptor za folikul stimulirajući hormon.....	13
1.1.5 Signalni put FSH u granulosa stanicama.....	16
1.2 Liječenje neplodnosti.....	18
1.2.1 Metode pomognute oplodnje.....	19
1.2.2 Postupak izvantjelesne oplodnje (IVF).....	21
1.2.3. Lijekovi u medicinski pomognutoj oplodnji.....	23
1.2.3.1 Lijekovi za stimulaciju jajnika.....	24
1.2.3.2 Lijekovi koji povećavaju uspješnost postupka dobivanja oocita.....	25
1.2.3.3 Lijekovi za tempiranje postupka.....	26
1.2.3.4 Lijekovi za podršku žutom tijelu.....	27
1.2.3.5 Ostali lijekovi koji mogu biti prepisani u postupku pomognute oplodnje.....	28
1.5 Svrha i ciljevi rada.....	31
2 Materijal i metode.....	32
2.1 Ispitanice.....	33
2.2 Metode.....	33
2.2.1 Sakupljanje uzoraka.....	33
2.2.1.1 Sakupljanje uzoraka seruma.....	33

2.2.1.2 Sakupljanje uzoraka pune krvi.....	34
2.2.2 Određivanje hormonskog statusa.....	34
2.2.3 Folikulometrija.....	34
2.2.4 Postupak aspiracije folikula.....	35
2.2.5 Određivanje broja oocita i uspješnosti oplodnje.....	36
2.2.6 Izolacija genomske DNA.....	37
2.2.7 Određivanje polimorfizma jedne baze lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu.....	38
2.2.8 Statistička analiza.....	39
3 Rezultati.....	42
3.1 Učestalost genotipova za SNP Asn ⁶⁸⁰ /Ser ⁶⁸⁰ u ispitivanoj populaciji.....	43
3.2 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji.....	43
3.2.1 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na genotip za SNP Asn680/Ser680.....	43
3.2.2 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na primijenjenu terapiju.....	45
3.2.3 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na dob.....	48
3.2.1 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na broj dobivenih oocita.....	51
3.3 Korelacija vrijednosti određivanih parametara s brojem oocita.....	60
3.4 Prediktivne vrijednosti ispitivanih parametara za COS.....	63
3.4.1 Prediktivne vrijednosti ispitivanih parametara za COS u skupini ispitanica s genotipom SS za SNP Asn680/Ser680.....	74
4 Rasprava.....	83
5 Zaključci.....	107
6 Popis literature.....	109
7 Popis kratica i simbola.....	122
8 Životopis.....	124

1 UVOD

1.1 Neplodnost

Neplodnost se definira kao izostanak željene trudnoće uz redovite, nezaštićene spolne odnose kroz razdoblje od najmanje godinu dana. Danas neplodnost predstavlja velik zdravstveni problem koji pogađa 15% populacije reproduktivne dobi u razvijenim zemljama. Sve češća pojava bračne neplodnosti znakovito je povezana sa socijalnim fenomenima odgađanja rađanja i svakodnevnog stresa života u velikim urbanim sredinama. U normalnim je prirodnim uvjetima plodnost žene niska, što znači da ukoliko zdrav mladi par ima odnos točno na dan kad se kod žene zbiva ovulacija šansa da žena zatrudni je svega 20%. Kod žena starijih od 40 godina ta je šansa 4-5%, a sposobnost oplodnje partnerice se smanjuje i sa dobi muškarca. Poznato je da većina (50-60%) trudnoća završi vrlo rano (tzv. biokemijska trudnoća jer je moguće detektirati povišenje koncentracije β -hCG u serumu, ali se trudnoća prestane razvijati i razina ovog hormona opada). Ukoliko se trudnoća nastavi dalje razvijati, šansa za rani spontani pobačaj (prije 12. tjedna trudnoće) je 10-15%. Nakon 12. tjedna trudnoće pobačaji su rijetki i trudnoća obično završava rađanjem djeteta u terminu.

Neplodnim se smatra:

- par koji ne uspije ostvariti trudnoću nakon godinu dana nezaštićenih odnosa, ako je žena mlađa od 36 godina;
- par koji ne uspije ostvariti trudnoću nakon 6 mjeseci nezaštićenih odnosa, ako je žena starija od 36 godina;
- žena koja uspije zanijeti, ali ne uspijeva iznijeti trudnoću do termina.

Navedeni razlozi upućuju na potrebu pomoći stručnjaka koji se bave dijagnostikom i liječenjem neplodnosti.

Svakako treba napomenuti da se danas u neplodnost ubraja i umanjena plodnost, jer će tek 85% parova ostvariti trudnoću u prvoj godini pokušavanja. Najveći broj parova koji pokušavaju ostvariti trudnoću uspjeh će tijekom 3 godine nezaštićenih odnosa, međutim kako se parovi danas sve kasnije odlučuju za trudnoću, potreba za potpomognutom oplodnjom je sve veća.

Procijenjeno je da će se otprilike trećina žena koja odgađa trudnoću do polovice tridesetih i polovica žena nakon 40. godine života suočiti s problemom neplodnosti (Navot i sur., 1994). Iz svega navedenog moguće je zaključiti da je neplodnost važan javnozdravstveni problem, bez obzira na razinu razvijenosti zemlje te je obradu neplodnosti uputno započeti čim su spomenuti gore navedeni uvjeti zadovoljeni.

Neplodnost može biti posljedica anatomskih, fizioloških ili endokrinoloških poremećaja kod

žena, no sve veća je učestalost neplodnosti kod muškaraca, pa je prilikom obrade neplodnog para nužno i partnera medicinski obraditi. Muški čimbenik neplodnosti prisutan je kod 30% parova, ženski u 35%, a neplodnost kod oba partnera nalazimo u 20% parova, dok kod 15% neplodnih parova nije moguće naći jasan razlog za neplodnost.

Uzroci ženske neplodnosti navedeni su u tablici 1.1.

Tablica 1.1 Uzroci ženske neplodnosti – ovulacijska disfunkcija

UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI – OVULACIJSKA DISFUNKCIJA	
Genetski	Bolesti nadbubrežne žlijezde
Autoimuni	Hiperandrogenemija
Kemo/radioterapija	Gubitak tjelesne težine
Bolesti hipofize	Pretjerana tjelovježba
Bolesti štitnjače	Lijekovi, narkotici
UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI – TUBARNI/PERITONEALNI	
Upalna bolest zdjelice (PID)	Prethodna/e izvanmaternične trudnoća/e
Endometrioza	Peritubarne i periovarijske priraslice
UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI – CERVICALNI FAKTOR	
Neodgovarajuća sluz	
Cervicitis	
Antispermalna antitijela	
UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI – UTERINI FAKTOR	
Miomi	
Kongenitalne malformacije	
Intrauterine adhezije	

1.1.1 Genetski uzroci neplodnosti

Posljednjih desetljeća došlo je do naglog razvoja dijagnostičkih metoda, kojima je moguće otkriti genetski uzrok neplodnosti, a to su prije svega kromosomski i genski poremećaji. U kromosomske poremećaje spadaju Turnerov sindrom (45,X; 30% bolesnica s primarnom amenorejom), delecija dijela jednog X kromosoma (ukoliko se radi o deleciji kratkog kraka, prisutan je i niski rast, ako se radi o deleciji dugog kraka, a da uključuje regiju Xq13-q26, prisutna je ovarijska disfunkcija), Swayerov sindrom (46, XY), X-autosomalne translokacije,

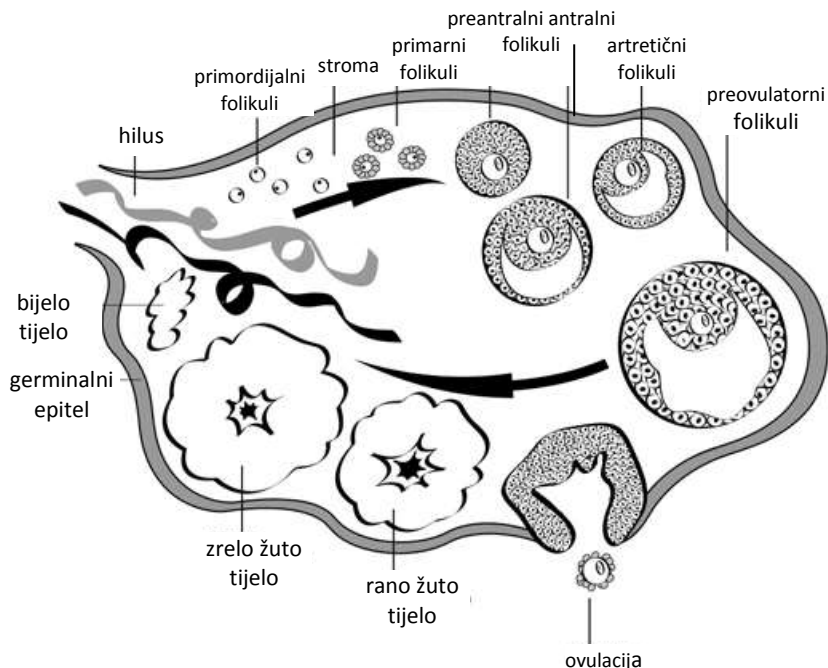
gonadna disgeneza s niskim rastom, miješana gonadna disgeneza i mozaični oblici s Y-staničnom linijom.

U genske poremećaje koji su uzrok ženske neplodnosti ubrajaju se:

1. Sindrom fragilnog X kromosoma - FRAXA mutacije, žene su nositelji premutacijskih alela gena *FMRI* (*eng.* fragile X mental retardation 1 gene) uključenog u patogenezu fragilnog X sindroma. Žene mogu imati povećani rizik ulaska u menopauzu prije 40. godine života, odnosno u prijevremenu menopauzu. FRAXA mutacije nađene su kod 6,5% žena koje su ušle u prijevremenu menopauzu u odnosu na 0,04% u općoj populaciji.
2. Kallmanov sindrom (hipogonadotropni hipogonadizam) karakteriziran je deficijencijom hormona koji otpušta gonadotropine (*eng.* gonadotropin-releasing hormone, GnRH), što ima za posljedicu neadekvatnog razvoja sekundarnih spolnih karakteristika, a ulazak u pubertet odgođen ili u potpunosti izostane.
3. Sindrom androgenske neosjetljivosti je X-vezana recesivna bolest uzrokovana mutacijama u genu za androgenski receptor koji je smješten u Xq11-12 regiji.
4. Mutacije u genima koji kodiraju za β -podjedinicu luteinizirajućeg (LH) i folikul-stimulirajućeg hormona (FSH).
5. Mutacije u genu za receptor folikul stimulirajućeg hormona opisane su kod žena s hipergonadotropnim hipogonadizmom i primarnom amenorejom i onemogućuju pravilno prikazivanje receptora na površini stanice.

1.1.2 Folikulogeneza

Do puberteta, u jajnicima zdravih djevojčica, prisutno je 300000 do 500000 tzv. primordijalnih folikula – jajašaca s ovojnicom granuloznih stanica. Nakon puberteta dio njih preobrazbom prelazi u primarne folikule u kojima se mogu razviti zrele jajne stanice. Približno svakih 28 dana gonadotropni hormoni potaknu rast 8 do 12 primarnih folikula u preantralne, odnosno antralne folikule. Jedan od njih sazrijeva i ovulira 14. dana ciklusa, a tijekom tog perioda se uglavnom luči estrogen. Nakon ovulacije, sekrecijske stanice ovuliranog folikula razvijaju se u žuto tijelo, koje luči velike količine progesterona i estrogena. Tijekom sljedeća 2 tjedna, ukoliko ne dođe do oplodnje, žuto tijelo degenerira, zbog čega se smanji lučenje hormona jajnika (pod utjecajem inhibina B) te započinje menstruacija. Zatim slijedi novi ovarijski ciklus (Slika 1.1). Kada se iscrpi zaliha primordijalnih folikula u jajnicima, nastupa menopauza.



Slika 1.1 Folikulogeneza

1.1.3 Hormoni u reprodukciji

Pravilno i pravovremeno izlučivanje ženskih spolnih hormona ključno je, ne samo za razvoj ženskih spolnih osobina tijekom puberteta, već je preduvjet regularnih menstrualnih ciklusa tijekom reproduktivne dobi (slika 1.2), kao i ostvarivanja trudnoće. Menstrualni ciklus ima za cilj stvoriti i ponuditi jajnu stanicu za oplodnju te istovremeno stvoriti uvjete za implantaciju oplodene jajne stanice. Menstrualni se ciklus odvija pod kontrolom hormona koji se stvaraju u endokrinim žlijezdama hipotalamusa, hipofize i jajnika.

1.1.3.1 Hormoni hipotalamusa

Hipotalamus je dio diencefalona, dijela mozga koji je smješten na bazi lubanje, a većim je dijelom izgrađen od živčanih stanica koji imaju karakteristike i neurona i endokrinih stanica. Osnovna je uloga hipotalamusa stvaranje neurohormona koji djeluju na oslobađanje hormona hipofize. Hormoni koji potiču sekreciju hormona hipofize su hormon koji oslobađa gonadotropine (*eng.* gonadotrophin releasing hormone, GnRH), hormon koji oslobađa tireotropin (*eng.* thyrotropin releasing hormone, TRH), hormon koji oslobađa kortikotropin (*eng.* corticotropin releasing hormone, CRH) i hormon koji oslobađa hormon rasta (*eng.* growth hormone releasing hormone, GHRH). Hormoni hipotalamusa koji inhibiraju sekreciju hormona hipofize su somatostatin koji inhibira hormon rasta i dopamin koji inhibira lučenje prolaktina (*eng.* prolactin inhibiting factor, PIF).

GnRH kontrolira sekreciju gonadotropina iz hipofize i to folikul stimulirajućeg hormona (*eng.* follicle stimulating hormone, FSH) i luteinizirajućeg hormona (*eng.* luteinizing hormone, LH). GnRH je dekaeptid, čiji je poluvrijeme života kratak i iznosi 2 do 4 minute, pa se stoga mora kontinuirano izlučivati (Shalev i Leung, 2003). Izlučivanje GnRH je skokovito, odnosno pulzatilno, a amplituda i frekvencije pulseva se razlikuju ovisno o fazama menstrualnog ciklusa; dok su u prvoj fazi brže (2-3 pulsa/sat), u drugoj su fazi sporije (1 puls/sat). Skokovito izlučivanje GnRH neophodno je za fiziološko oslobađanje gonadotropina odnosno odvijanje normalnog menstrualnog ciklusa. GnRH potiče ekspresiju svojih receptora na stanicama hipofize (*eng.* up-regulation). Trajno povišena amplituda i spora frekvencija skokova dovodi do smanjenja broja receptora (*eng.* down-regulation) što ima za posljedicu anovulaciju i amenoreju. Amplituda i frekvencija sekrecije GnRH regulirana je povratnom spregom hormona jajnika i gonadotropina.

1.1.3.2 Hormoni hipofize

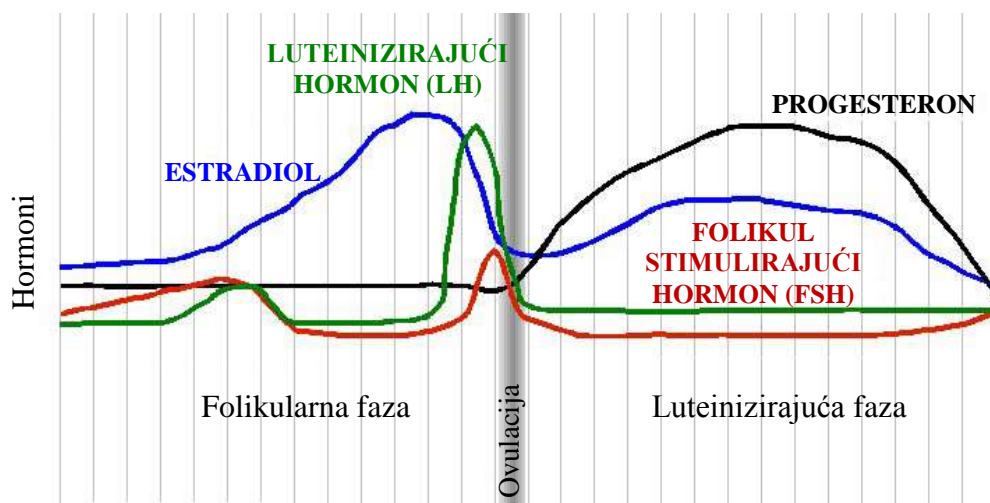
Hipofiza se sastoji iz prednjeg (adenohipofiza) i stražnjeg režnja (neurohipofiza). Adenohipofiza se nastavlja na hipotalamus i izravno je s njim povezana, dok je neurohipofiza izravni produžetak hipotalamusa. Smjer cirkulacije krvi omogućava kontrolu hipotalamusa nad hipofizom, a odvija se putem otpuštanja neurohormona u cirkulaciju. Postoji i retrogradni krvotok kojim je omogućeno da hormoni hipofize imaju učinak na hipotalamus (kratka povratna sprega).

U adenohipofizi se stvaraju gonadotropini: folikul stimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH) te hormon koji stimulira tireoideu (*eng.* thyroid stimulating hormone, TSH), adrenokortikotropni hormon (*eng.* adrenocorticotropic hormone, ACTH), hormon rasta (*eng.* growth hormone, GH) i prolaktin (PRL).

1.1.3.2.1 Folikul stimulirajući hormon i luteinizirajući hormon

FSH i LH su glikoproteini relativne molekulske mase oko 30000 koji se oba sastoje od po jedne α i jedne β podjedinice. α podjedinice FSH i LH, koje su izgrađene od 92 aminokiseline, dijele iznimnu strukturnu sličnost, ne samo međusobno, već i s TSH i humanim korionskim gonadotropinom (*eng.* human chorionic gonadotropin, hCG), dok se β podjedinice razlikuju. β podjedinica FSH sastoji se od 118 aminokiselina i odgovorna je specifičnu biološku ulogu FSH, kao i za interakciju s receptorom za FSH (*eng.* FSH receptor, FSHR) (Dias i Van Roey, 2001). Ljudski FSH smjesa je različitih izoformi koje se međusobno razlikuju na temelju broja sijalinskih kiselina na krajevima oligosaharidnih

struktura koje su ključne za njegovu biološku aktivnost (Dias, 2001). Gen koji kodira α podjedinicu, smješten je na kromosomu 6p21.1-23, i eksprimira se u različitim staničnim tipovima, dok je gen za α podjedinicu smješten na kromosomu 11p13 i eksprimira se u gonadotropnim stanicama hipofize. U tim se stanicama eksprimira i gen za β podjedinicu LH, koji je smješten unutar genskog klastera LHB/CGB na kromosomu 19q13.32. Poluvrijeme života FSH iznosi 4 sata, a LH tek 30 minuta. FSH i LH se izlučuju skokovito, a amplituda i frekvencija izlučivanja su pod utjecajem GnRH hipotalamusa, ali i koncentracije estradiola i progesterona. Prva, folikularna odnosno estrogenska faza ciklusa odlikuje se nižim amplitudama i višim frekvencijama (60 – 90/minuti). U drugoj, luteinskoj ili progesteronskoj fazi ciklusa amplitude su više, a frekvencija je značajno niža (svakih 180 do 240 minuta) (slika 1.2).



Slika 1.2 Promjene razine spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa. U prvom dijelu ciklusa FSH nadvladava LH te se taj dio ciklusa naziva folikularna faza. Drugi dio ciklusa obilježava visoka razina LH pa se taj period naziva lutealna faza. Razina estradiola do pojave ovulacije raste, a zatim naglo opada, dok pik progesterona slijedi nekoliko dana nakon ovulacije. Pozadinska boja prikazuje bazalnu temperaturu, koja je niža u folikularnoj, a povišena u lutealnoj fazi ciklusa.

Kao što je prethodno rečeno, skokovitim izlučivanjem GnRH mijenja broj vlastitih receptora na gonadotropnim stanicama hipofize te time regulira vlastito izlučivanje kao i odgovor tih stanica. Česte pulsacije povećavaju broj receptora, dok rijetke pulsacije ili jednolična sekrecija smanjuju broj receptora koji postaju i manje osjetljivi.

GnRH se veže za receptore i potiče sintezu, sekreciju i pohranu gonadotropina koja se zbiva u stanicama adenohipofize. Prvi je učinak GnRH otpuštanje sekretornih granula u cirkulaciju, a odgođeni učinak ima utjecaj na pohranu gonadotropina za moguće kasnije otpuštanje.

Steroidni hormoni jajnika imaju i negativno i pozitivno djelovanje na sekreciju i GnRH i gonadotropina koje se zbiva i na razini hipofize i na razini hipotalamusa. Estrogen primjerice inhibira sekreciju FSH; na samom kraju menstruacijskog ciklusa dolazi do smanjenja stvaranja estrogena i progesterona iz žutog tijela što uvjetuje pojačanu sintezu i pohranu gonadotropina te porast koncentracije FSH (pozitivno povratno djelovanje estrogena). U kasnoj folikularnoj fazi ciklusa tijekom koje granuloza stanice vodećeg folikula stvaraju sve više estrogena dolazi do laganog pada koncentracije FSH, koja pada i zbog djelovanja inhibina koji specifično koči sintezu FSH, a koji se također stvara u stanicama vodećeg folikula. Utjecaj estrogena na LH je dvojak: pri nižoj koncentraciji uvjetuje sniženje razine LH, no približavanjem sredine ciklusa, GnRH povećava broj svojih receptora čime se postiže pozitivno povratno djelovanje estradiola na razini hipofize (Kelly i Qiu, 2010). Porast estrogena priprema gonadotropne stanice na bolji odgovor na GnRH. Kritično visoka koncentracija estrogena (200 ng/L) koja je zadržana kroz vremensko razdoblje od 36 do 48 sati mijenja inhibitorski učinak na sekreciju LH u stimulirajući učinak. U tom razdoblju estrogen mijenja i poboljšava i bioaktivnost molekule LH. Porast LH dovodi do morfoloških promjena folikula spremnog za ovulaciju, a granuloza stanice pod utjecajem LH počinju i sa sekrecijom progesterona.

Progesteron ima također povratno djelovanje na regulaciju stvaranja gonadotropina. Progesteron u niskoj dozi povećava odgovor LH na GnRH, a odgovoran je i za preovulacijski skok LH koji ima kritičnu ulogu za ovulaciju. Skok LH dovodi do promjena unutar folikula koje su neophodne za sazrijevanje i ekspulziju oocite. Nakon ovulacije dolazi do stvaranja žutog tijela koje stvara veću koncentraciju prvenstveno progesterona, ali i estrogena. Ove više koncentracije steroidnih hormona inhibiraju stvaranje gonadotropina iz hipofize i inhibiraju skokovito izlučivanje GnRH iz hipotalamusa što se naziva negativno povratno djelovanje.

Gonadotropini djeluju na folikule u jajniku, FSH potiče rast i sazrijevanje folikula i diferencijaciju granuloza stanica, a LH inducira ovulaciju, sazrijevanje oocite i luteinizaciju folikula. FSH je od presudne važnosti za sazrijevanje oocite; granuloza stanice koje ekspresiraju FSH receptore interagiraju s oocitom te osiguravaju nutrijente te tako kontroliraju njeno sazrijevanje (Perlman i sur., 2006).

1.1.3.2.2 Prolaktin

Prolaktin je polipeptid izgrađen od 198 aminokiselina, koji se stvara u adenohipofizi, a odgovoran je za sintezu mlijeka u dojkama. Po svojoj je strukturi sličan hormonu rasta i humanom placentalnom laktogenu (*eng.* human placental lactogen, hPL). Koncentracija prolaktina u serumu žena znakovito je viša nego kod muškaraca u zbog utjecaja estrogena. Povećavaju je i neka fiziološka stanja kao što su spavanje, tjelesni napor, stres, hipoglikemija, trudnoća i dojenje. Prolaktin omogućava laktaciju nakon poroda, ali nakon što su na dojku tijekom trudnoće djelovali estrogen i progesteron. Za urednu laktaciju još su neophodni oksitocin i tiroksin. Prolaktin ima ulogu u nastanku predmenstrualnih simptoma vezanih za dojku jer je u lutealnoj fazi njegova koncentracija blago povećana. Ima ulogu i u normalnom funkcioniranju žutog tijela. Transkripciju gena koji kodira prolaktin stimuliraju prvenstveno estrogeni, dok manju ulogu imaju TRH (*eng.* thyrotropin releasing hormone) i drugi faktori rasta. Sekrecija prolaktina je pod kontrolom prolaktin inhibirajućeg faktora (PIF) – dopamina koji se luči u hipotalamusu. Poremećaji lučenja prolaktina uzrokovani su stoga smanjenjem stvaranja dopamina ili stanja koja uvjetuju prekid prijenosa dopamina iz hipotalamusa do hipofize. Prolaktin je jedinstven među hormonima hipofize jer je primarno pod inhibicijskom kontrolom, odnosno izostanak kontrole uzrokuje povišenje serumske koncentracije prolaktina (Crosignani i sur., 1991). Klinički se povišena koncentracija prolaktina odlikuje izostankom menstruacijskog ciklusa i stvaranjem mlijeka u dojkama. Hiperprolaktinemiju najčešće izaziva prolaktinom, dobroćudni tumor hipofize koji stvara povećanu količinu prolaktina. Hiperprolaktinemija često prati hipotireozu, cirozu jetre i zloćudne tumore (karcinom pluća, hipernefron), a javlja se i kao posljedica uzimanja nekih lijekova, osobito blokatora dopaminskih receptora (neuroleptici: fenotijazini i butirofenoni i antiemetici: metoklopramid, domperidon i sulpirid). Hiperprolaktinemija može uzrokovati poremećaj menstruacijskog ciklusa, neplodnost, galaktoreju, hirsutizam, akne, sekundarnu osteoporozu i smanjenje libida. Granično povišeni prolaktin utječe na skraćivanje lutealne faze ciklusa i insuficijenciju žutog tijela (Olive i Palter, 2007). Bolesnica može imati ovulacije, ali ne ostvaruje trudnoću. Sljedeći mogući učinak hiperprolaktinemije je anovulacija, a koju slijedi neplodnost. Povišena razina prolaktina (iznad 30 µg/L) djeluje inhibitory na hipotalamus i lučenje GnRH, a posljedično se smanjuje i stvaranje FSH i LH u hipofizi, razvija se hipogonadotropni hipogonadizam i zaustavlja dozrijevanje folikula u jajniku te stvaranje estrogena i progesterona te posljedično i ovulacija (Pfeifer, 1989). Hormoni koji bi mogli stimulirati prolaktin su TRH, vazopresin, β-endorfin i epidermalni faktor rasta, a moguće je da stimulatívni učinak imaju i stres, manipulacija dojkama i tjelesna aktivnost. Prolaktin

zasigurno ima i utjecaj na maturaciju oocite, fertilizaciju i rani razvoj zametka u sisavaca. Novije istraživanje na miševima upućuje na to da je prisutnost prolaktina neophodna za pravilan razvoj i maturaciju oocite, mejoze, fertilizacije i ranog razvitka zametka (Kiapekou i sur., 2009).

1.1.3.2.3 Hormon koji stimulira tireoideu

Hormon koji stimulira tireoideu (*eng.* thyroid stimulating hormone, TSH) proizvodi se u adenohipofizi kao odgovor na TRH iz hipotalamusa. TSH stimulira proizvodnju T3 i T4 u štitnoj žlijezdi, a što ima negativni povratni utjecaj na stvaranje TSH u hipofizi. Abnormalnosti sekrecije hormona štitnjače, bilo da se radi o hipotiroidizmu ili hipertiroidizmu povezane su s ovulacijskom disfunkcijom kao rezultat različitih nepravilnih utjecaja na osovinu hipotalamus-hipofiza-jajnik. Hormoni štitnjače u stalnoj su interakciji s ostalim hormonima koji održavaju redovitost menstrualnog ciklusa. Optimalno je funkcioniranje štitnjače stoga neophodno za ostvarivanje uredne plodnosti. Učinak hormona štitnjače može biti izravan putem receptora za hormone štitnjače smještenim na jajniku i neizravan, putem utjecaja na sekreciju globulina koji veže spolne hormone (*eng.* sex hormone-binding globulin, SHBG), prolaktina i GnRH (Jones i sur., 2004). Autoimuna bolest štitnjače i prisutnost antitireoidnih protutijela najrašireniji je uzrok hipotiroidizma u žena reproduktivne dobi. Izolirana autoimuna bolest štitnjače povezana je s povišenim rizikom spontanog pobačaja u prvom trimestru trudnoće, a žene s hipotiroidizmom češće imaju neurednosti menstrualnog ciklusa, neplodnost ili imaju povišen rizik za morbiditet u trudnoći (Poppe i sur., 2007). Tijekom postupka kontrolirane stimulacije jajnika za pokušaj izvantjelesne oplodnje očekivano je povišenje TSH, ovisno o trajanju stimulacije. Povišenje TSH izrazitije je ukoliko pacijentica ima prisutna antitireoidna protutijela. Smatra se da suprafiziološke koncentracije estrogena, a koje su prisutne prilikom stimulacije jajnika imaju utjecaj na povišenje koncentracije TSH. Promjene koncentracije hormona štitnjače tijekom stimulacije nemaju utjecaj na konačni ishod pomognute oplodnje, osim u slučaju razvoja sindroma hiperstimulacije kod pacijentica s prisutnim antitireoidnim protutijelima. U ovom slučaju zbivaju se dramatične promjene koje dovode do izraženog hipotiroidizma s izravnim utjecajem na ishod postupka izvantjelesne oplodnje (Poppe i sur., 2008).

1.1.3.3 Hormoni jajnika

1.1.3.3.1 Estrogen

Estrogeni se stvaraju u kori jajnika, a izgrađeni su od 18 ugljikovih atoma (C18), koji, a imaju steroidnu strukturu, s tim da je prsten A aromatiziran. Jajnik stvara nekoliko estrogena: estron (E1), estriol (E3) i biološki najaktivniji estradiol 17β (E2). Koncentracija estrogena u serumu relativno je niska (ng/L). Slobodni se estrogeni vežu u plazmi na proteine, a u jetri se konjugiraju s glukuronskom kiselinom ili sulfatiraju te se većim dijelom izlučuju putem bubrega kao glukuronidi ili kao sulfati, dok se manji dio eliminira preko žuči u crijeva. Koncentracija estrogena u ženskom tijelu ovisi o fazama menstruacijskog ciklusa, a kontinuirano se povećava do ovulacije. U vrijeme ovulacije koncentracija estrogena kratkotrajno pada, ali potom je opet visoka u sredini faze žutog tijela sve do njegove atrofije što dovodi do naglog pada koncentracija estrogena i progesterona te nastupa menstruacije.

Estrogeni djeluju na sintezu proteina u organima koji su pod njihovim utjecajem. U rodnici djeluju na proliferaciju višeslojnog pločastog epitela u kojima se skuplja veća količina glikogena. Povećavaju također sekreciju žlijezda u vratu maternice čime sekret postaje obilan, proziran i bistar. Djeluju na miškulaturu maternice i na endometriju koji pod njihovim utjecajem proliferira. Pojačavaju motilitet i podražljivost jajovoda unutar kojeg umnožavaju trepetljikasti epitel.

Kod djevojaka koje još nisu dosegle spolnu zrelost estrogeni izravno utječu na razvoj sekundarnih spolnih karakteristika i na proliferaciju izvodnih kanalića dojke. Imaju ograničen anabolički učinak, a imaju pozitivan učinak na stvaranje matriksa kostiju. Djeluju na retenciju tekućine, te na lipide u krvi mijenjajući odnos β i α frakcije lipoproteina.

1.1.3.3.2 Progesteron

Progesteron je steroidni hormon jajnika izgrađen od 21 atoma ugljika (C21) koji se najvećim dijelom stvara u drugoj fazi menstruacijskog ciklusa u žutom tijelu. Progesteron izaziva sekrecijsku promjenu endometrija koja omogućava implantaciju zametka, a ujedno relaksira miometriju. Progesteron djeluje i na ostalo glatko mišićje u tijelu. Njegov učinak vidljiv je i na rodnici i cervikalnoj sluzi koja pod njegovim utjecajem postaje gusta i mutna. Progesteron ima učinak i na termoregulacijski centar te je stoga tjelesna temperatura nešto viša u drugoj fazi ciklusa odnosno u trudnoći, a priprema žlijezde dojke za laktaciju.

1.1.3.3.3 Anti-milerijski hormon

Anti-milerijski hormon (*eng.* anti-mullerian hormone, AMH) je glikoprotein hormonske skupine transformirajućeg faktora rasta β (*eng.* transforming growth factor, TGF- β) kojeg

stvaraju stanice granuloze čim se razviju primordijalni folikuli. Prisutan je u svim fazama ciklusa od trenutka kad folikuli narastu do 6 mm promjera. Biološka uloga AMH kod žena nije sasvim razjašnjena, no smatra se da djeluje kao modulator odabira folikula za rast i kao modulator steroidogeneze u jajniku. Uz to djeluje supresivno na primordijalne folikule djelujući na pregranulozu stanice s ciljem ograničavanja broja folikula, a potom omogućava folikulogenezu ovisnu o FSH. Njegove koncentracije u krvi pokazatelj su rezerve prisutnih folikula u jajnicima (Fanchin i sur., 2005). Smanjenjem broja primarnih folikula tijekom reproduktivnog razdoblja, opada i prosječna koncentracija AMH u serumu. Lučenje AMH u krvi nije ovisno o mehanizmima djelovanja gonadotropina iz hipofize na cikličke hormonske promjene u jajnicima te su njegove koncentracije stabilne tijekom cijelog menstrualnog ciklusa. U slučaju sindroma policističnih jajnika, prisutan je veliki broj malih antralnih folikula, što ima za posljedicu visoku razinu AMH u serumu i folikularnoj tekućini (Visser i sur., 2006).

AMH se smatra jednim od mogućih prediktora funkcionalne rezerve jajnika i mogućim prediktorom broja folikula u ranoj fazi maturacije. Postoji znakovita povezanost snižavanja koncentracije AMH s dobi žene (Anderson i sur., 2012; Nelson i sur., 2010). Kako se koncentracija AMH ne mijenja tijekom menstruacijskog ciklusa, a izrazito je mala varijabilnost vrijednosti i između menstruacijskih ciklusa, reproducibilnost nalaza značajnija je od vrijednosti koncentracija FSH, E2, inhibina B i broja antralnih folikula (Fanchin i sur., 2005). Niske vrijednosti AMH koreliraju s brojem antralnih folikula koji se smatra glavnim prediktorom lošijeg odgovora jajnika na kontroliranu ovarijsku stimulaciju, no za sada ne postoji poveznost niske vrijednosti AMH s prognozom krajnjeg ishoda postupka pomognute oplodnje, odnosno ostvarene trudnoće i rođenja živog djeteta (Gnoth i sur., 2008). S obzirom na povezanost koncentracije AMH s brojem antralnih folikula, brojem dobivenih zrelih oocita, smatra se da će u budućnosti AMH biti važan klinički parametar za ocjenu funkcionalne rezerve jajnika. Na temelju dosadašnjih spoznaja može se zaključiti da loš odgovor jajnika na stimulaciju možemo očekivati ukoliko su serumske vrijednosti AMH niže od 1 $\mu\text{g/L}$; normalan odgovor očekujemo pri vrijednostima AMH između 1 i 4 $\mu\text{g/L}$, dok pojačan odgovor jajnika na stimulaciju možemo očekivati uz serumske vrijednosti koncentracije AMH iznad 4 $\mu\text{g/L}$ (de Carvalho i sur., 2011). U Republici Hrvatskoj koncentraciju AMH u serumu još uvijek nije moguće odrediti na teret HZZO, već isključivo uz izravno plaćanje usluge, dok u vrijeme početka ove studije takva analiza nije bila dostupna.

1.1.3.3.4 Inhibin B

Inhibin B je također glikoprotein hormonske skupine TGF- β kojeg stvaraju granulosa i teka stanice. Inhibira sekreciju FSH iz hipofize i ima utjecaj na razvoj folikula. Ispitivanje neplodnih pacijentica pokazalo je znakovitu negativnu korelaciju između bazalne koncentracije inhibina B i FSH, kao i znakovitu pozitivnu korelaciju između inhibina B i broja antralnih folikula (Tinkanen i sur., 2001). Brojnim je studijama ispitivana povezanost inhibina B s odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju, no rezultati su različiti, pa se smatra da je prediktivna vrijednost koncentracije inhibina B niska u poredbi s drugim dostupnim biljezima te da se inhibin B smije koristiti u procjeni ovarijske rezerve, ali samo kao dodatni pokazatelj uz ostale analizirane biljege (Broekmans i sur., 2006).

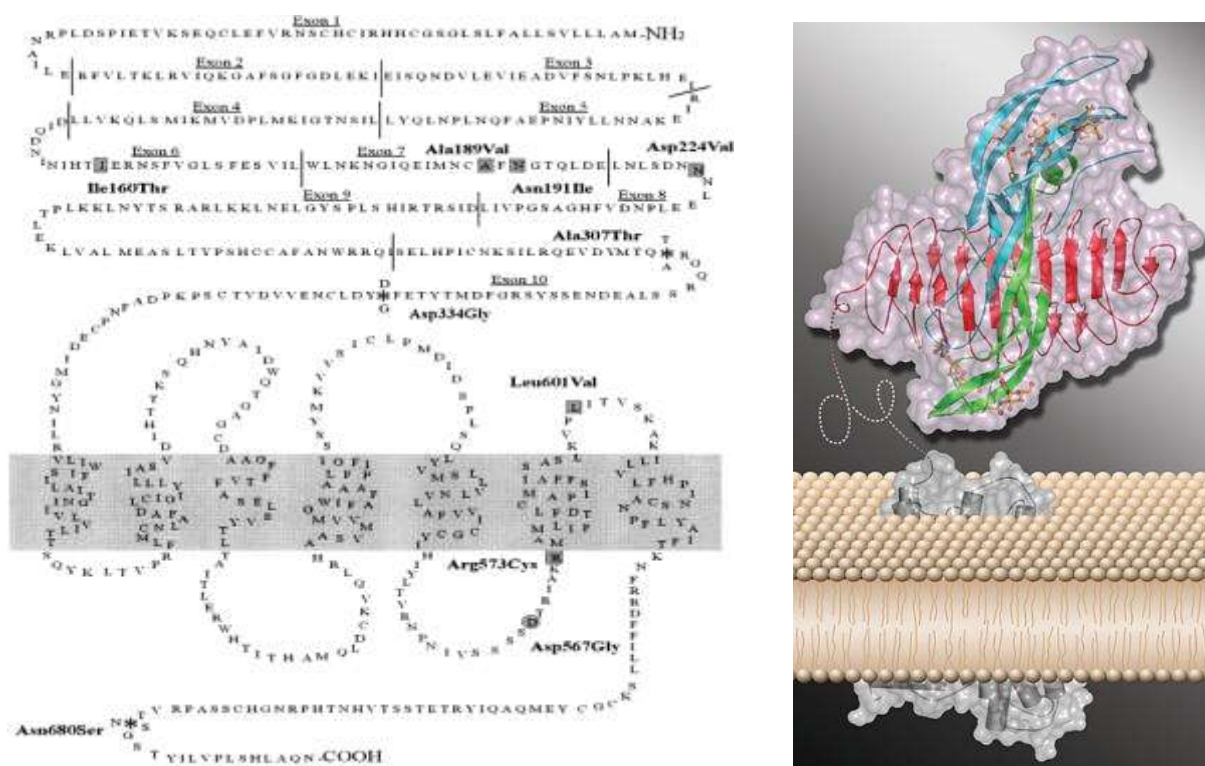
1.1.4 Receptor za folikul stimulirajući hormon

Za djelovanje FSH, nužno je postojanje specifičnog receptora na membrani ciljnih stanica. FSHR (*eng.* follicle stimulating hormone receptor) član je obitelji transmembranskih glikoziliranih receptora, a povezan je s G-proteinima (slika 1.3) (Falconer i sur., 2005; Greb i sur., 2005a; Sudo i sur., 2002). Izgrađen je od 695 aminokiselina, a N-terminalnu izvanstaničnu domenu s C-terminalnom unutarstaničnom domenom spaja 7 transmembranskih domena (Fan i Hendrickson, 2005; Sudo i sur., 2002). Svaka stanica koja se mora podražiti sadrži od 2000 do 100000 receptora. Vežanjem FSH na izvanstaničnu domenu FSHR (slika 1.3) dolazi do pokretanja signalne kaskade koja za posljedicu ima niz staničnih događaja.

Gen koji kodira receptor za FSH (*FSHR*) prvotno je karakteriziran na štakoru (Heckert i Griswold, 1991), a iste je godine kloniran je ljudski *FSHR* (Minegishi i sur., 1991). Proteže se preko regije od 54 kb, sadrži 10 eksona i 9 introna, a mapiran je na kromosomskom lokusu 2p21 (slika 1.4) (Rousseau-Merck i sur., 1993). Od 10 eksona, deseti kodira C-kraj izvanstanične domene, transmembransku i unutarstaničnu domenu receptora, a prvih 9 manjih eksona kodiraju ostatak izvanstanične domene (Levallet i sur., 1999).

Broj prepoznatih mutacija gena *FSHR* raste iz godine u godinu do danas je poznato preko 700 polimorfizama jednog nukleotida (*eng.* single nucleotide polymorphism, SNP), od kojih se samo 8 nalazi u kodirajućoj regiji (Loutradis i sur., 2012; Rizk, 2009) (slika 1.4A). Inaktivacijske mutacije u genu *FSHR* uzrokuju amenoreju, hipergonadotropni hipogonadizam, gubitak funkcije jajnika ili disgenezu, dok one uslijed kojih dolazi do gubitka funkcije FSHR uzrokuju neadekvatan spolni razvoj, razvoj jajnika te neplodnost. Ove mutacije se nalaze po svim regijama, a uzrokuju ili supresiju vežanja FSH ili poremećaj prijenosa signala (Laloti, 2011).

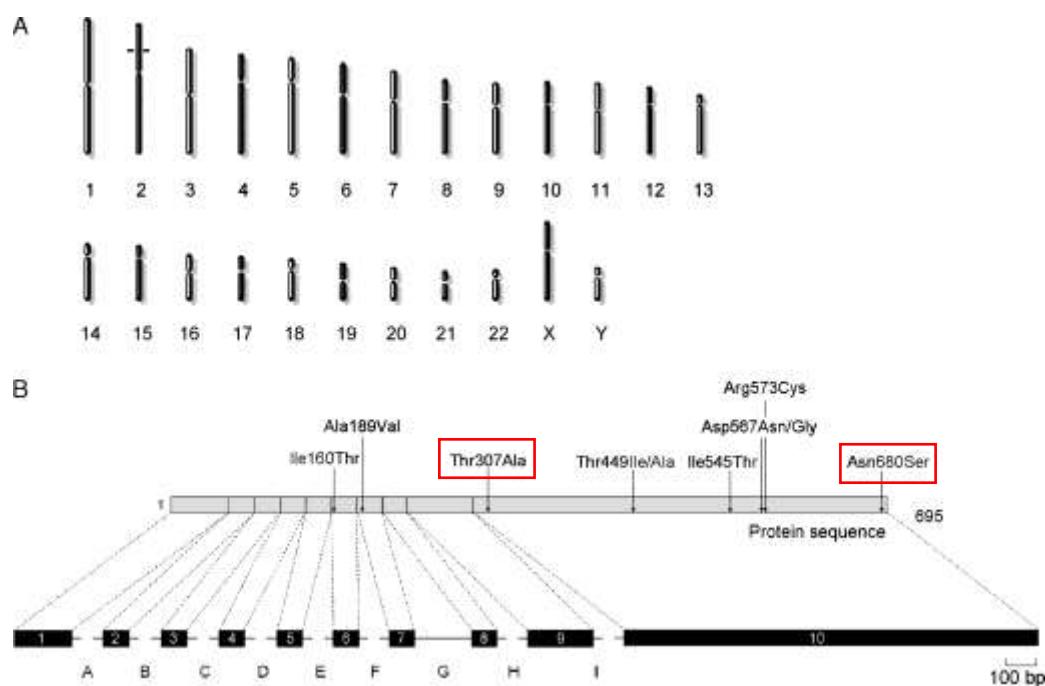
Dva su SNP u genu *FSHR* najistraživanija vezano za plodnost žene, a nalaze se na eksonu 10 gena *FSHR*, od kojih se 1 nalazi na nukleotidnom položaju 919, a drugi na položaju 2039 (slika 1.5). Prvi SNP (rs6165) utječe na slijed aminokiselina na položaju kodona 307 koji je smješten u zglobnoj regiji koja spaja izvanstaničnu i transmembransku domenu, kojeg može zauzeti alanin (Ala) ili treonin (Thr) (p.Ala307Thr; p.A307T, Ala³⁰⁷/Thr³⁰⁷) ovisno o tome nalazi li se na položaju 919 gena baza A ili G (c.919A>G) (Gromoll i Simoni, 2005; Loutradis i sur., 2008). Regija u kojoj se nalazi položaj 307 spaja domenu koja veže hormon s transmembranskom domenom receptora (Gromoll i Simoni, 2005).



Slika 1.3 A) Shematski prikaz strukture FSHR s obilježenim mutacijama/SNP (■ - inaktivirajuća mutacija; ● - aktivirajuća mutacija; * - alelna varijanta) (Levallet i sur., 1999) B) Model kompleksa humanog FSH i FSHR. α i β podjedinice FSH prikazane su u zelenoj i plavoj boji. Crvenom su bojom prikazane leucinom-bogati ponavljajući sljedovi FSHR. Sedmerostruka transmembranska domena receptora, prikazana u sivoj boji, smješta receptor unutar membrane (Fan i Hendrickson, 2005).

Drugi SNP (rs6166) dovodi do promjene aminokiselinskog slijeda na položaju kodona 680 C-kraja unutarstanične domene, gdje je asparagin (Asn) zamijenjen serinom (Ser) (p.Asn680Ser,

p.N680S, Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰), što je posljedica zamjene baze A bazom G na položaju 2039 u genu *FSHR* (c.2039A>G) (Gromoll i Simoni, 2005; Loutradis i sur., 2008). Do danas nije objašnjena točna biološka uloga niti za jedan od ova dva polimorfizma (Simoni i sur., 2008). Kako su oba SNP smještena u istom eksonu (10) postoji vrlo jaka vezana neravnoteža (*eng.* linkage disequilibrium) među njima (Sudo i sur., 2002). Najčešće dolaze u varijantama Thr³⁰⁷/Asn⁶⁸⁰ i Ala³⁰⁷/Ser⁶⁸⁰, koje su u bjelačkoj populaciji gotovo podjednako zastupljene (~40%) (Greb i sur., 2005b; Gromoll i Simoni, 2005). U kineskoj je populaciji zastupljenija prva od navedenih varijacija (60%). (Loutradis i sur., 2008). Zbog gotovo potpune vezane neravnoteže, većina studija usmjerena je samo na genotipizaciju SNP p.N680S (Mohiyiddeen i sur., 2012).



Slika 1.4 (A) Gen *FSHR* mapiran je na kromosomu 2p21-p16. (B) Gen *FSHR* s numeriranim eksonima od 1 do 10 te intronima označenim slovima od A do I smještenim između eksona, te prikaz najčešćih polimorfizama. SNP p.N680S i p.T307A su uokvirene (Binder i sur., 2008).

U programima potpomognute oplodnje reakcija žena koje ovuliraju uz egzogenu terapiju FSH razmjerno je različita. Unatoč kliničkom iskustvu koje je prikupljeno proteklih godina, prognoza ovarijskog odgovora na stimulaciju gonadotropinima ponekad je nepredvidljiva, jer biološke osobine pacijentice imaju veći utjecaja na individualnu reakciju od samog

stimulacijskog protokola. Standardni stimulacijski protokol može rezultirati lošim odgovorom (koji zahtjeva prilagodbu doze FSH) ili ovarijskim hiperstimulacijskim sindromom (*eng.* ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS). OHSS je potencijalno životno ugrožavajuća komplikacija medicinski potpomognute oplodnje, karakterizirana uvećanjem jajnika i ekstravazacijom tekućine u abdomen što rezultira ascitesom, hipovolemijom i hemokonzentracijom. OHSS je najčešće jatrogen te se javlja kao posljedica primjene gonadotropina. Genetičke su studije pokazale kako bi mutacije u genu *FSHR* mogle biti faktor koji vodi do sklonosti razvoja OHSS. Nadalje, primijećeno je kako bi upravo SNP p.Asn680Ser mogao biti prediktor ozbiljnosti simptoma kod pacijentica koje razviju OHSS (Lussiana i sur., 2008). Mogućnost identifikacije žena koje bi prilikom IVF postupka imale loš ili prekomjeran odgovor na stimulaciju imala bi veliki klinički značaj. Štoviše nekoliko je mutacija u genu *FSHR* nedavno pronađeno i opisano kao molekularna baza u patogenezi OHSS (Meduri i sur., 2008). Smatra se kako bi sve pacijentice prije stimulacije trebale biti upoznate s mogućnošću razvoja ove jatrogene komplikacije. Postojanje polimorfizma u genu *FSHR* povezuje se s ovarijskim odgovorom na kontroliranu stimulaciju jajnika, kao i sa stupnjem OHSS ukoliko se razvije (Simoni i sur., 2008). Za nekoliko se parametara vjeruje da bi mogli poslužiti kao prediktori ovarijskog odgovora na kontroliranu stimulaciju. Smatra se da bazalna koncentracija FSH ima najbolju prediktivnu vrijednost, ali i značajnu intra-individualnu varijabilnost od ciklusa do ciklusa. Ostali parametri koji utječu na odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju su distribucija izoformi FSH, prisutnost cirkulirajućih inhibitora te protutijela na FSH. Utjecaji intraovarijske interferencije na razini vezivanja FSH za svoj receptor i prisutnost *FSHR* izoformi s promjenom prijenosa signala također su razmatrani kao moguće odrednice odgovora na hormonsku stimulaciju (Perez Mayorga i sur., 2000). Međutim, nijedna od navedenih hipoteza do danas nije dokazana.

1.1.5 Signalni put FSH u granulosa stanicama

Vežanjem FSH za receptor započinje niz kaskadnih reakcija u granulosa stanici, koja s ostalim granulosa stanicama okružuje oocitu u folikulu, a glavna im je uloga lučenje estrogena. Oko granulosa stanica smještena je bazalna lamina te periferne teka stanice. FSH potiče razvoj 2 vrste granulosa stanica: jedna koja okružuje oocitu te druga koja je smještena periferno i prati bazalnu laminu (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006). Receptor za FSH spojen je s G-proteinom putem kojeg potiče stvaranje cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP), aktivirajući adenilat ciklazu. Zatim se aktivira protein-kinaza ovisna o cAMP-u, koja fosforilira specifične proteine u stanici te pokreće biokemijske reakcije, koje na posljedku

dovode do staničnog odgovora na FSH (slika 1.5).

Diferencijacija stanica izravno je povezana s aktivacijom protein kinaze A (*eng.* protein kinase A, PKA), što je posljedica porasta unutarstanične koncentracije cAMP. Elementi odgovara na cAMP (*eng.* cAMP response elements, CRE) povezuju se s CRE vezujućim proteinom (*eng.* CRE binding protein, CREB), koji je najpoznatiji transkripcijski faktor reguliran od strane PKA. Fosforilacija CREB u granulosa stanicama detektirana je već unutar 1 minute, nakon stimulacije FSH, no sam CREB nije dovoljan da aktivira većinu FSH ciljnih gena. FSH uzrokuje i brzu fosforilaciju i acetilaciju histona H3, koje su također posredovane PKA (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006).

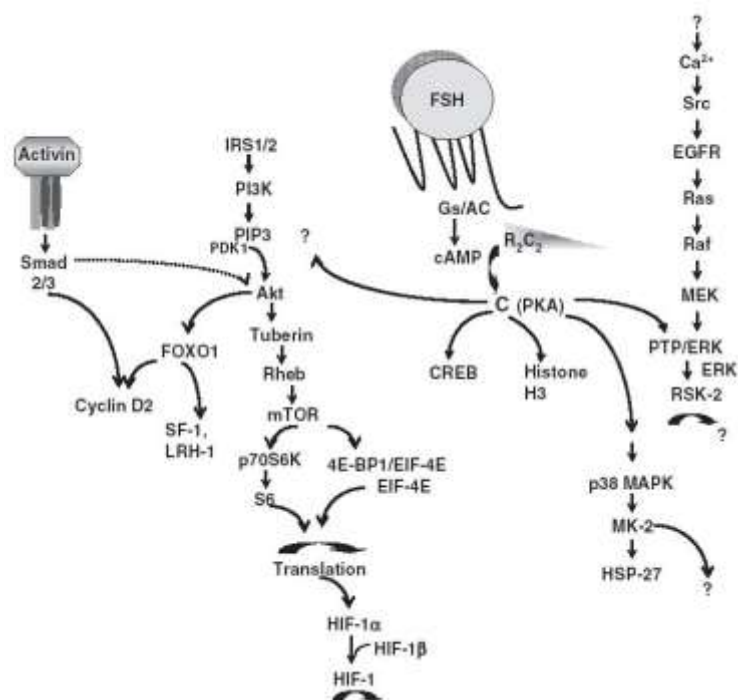
FSH stimulira fosforilaciju izvanstanično reguliranih kinaza 1 i 2 (*eng.* extracellular regulated kinases, ERKs; ERK1, ERK2), već 10 minuta nakon primjene. Još uvijek nije utvrđeno koji signal potiče porast koncentracije Ca^{2+} , no uzrokuje istu aktivaciju ERK kao i FSH. Fosforilacija ERK dokazana je dodatkom fosfoprotein tirozin fosfatazom (*eng.* phosphoprotein tyrosine phosphatase, PTP), koja se veže za ERK, a dodatkom FSH disocira od nje. Posljedica aktivacije ERK je fosforilacija ribosomalne S6 kinaze 2 (*eng.* ribosomal S6 kinase-2, RSK-2), no ciljevi njihove aktivacije u granulosa stanicama još uvijek nisu identificirani.

FSH uzrokuje i fosforilaciju p38 mutagenom aktiviranu protein kinazu (*eng.* mitogen-activated protein kinase, MAPK), također ovisnu o PKA, no nije poznat cilj reguliranja aktivnosti p38 MAPK. Aktivacija p38 MAPK posredovana FSH dovodi do fosforilacije aktin pokrivajućeg proteina HSP-27 (*eng.* actin-capping protein) u granulosa stanicama te zaokruživanja i agregacije ovog proteina. U nezrelim jajnicima, FSH preko p38 MAPK aktivira i potiče p38 MAPK-aktiviranu protein kinazu 2 (*eng.* MAPK-activated protein kinase 2, MK-2) na fosforilaciju proteina toplinskog šoka 27 (*eng.* heat shock protein, Hsp-27).

Uz to, FSH uzoruje aktivaciju fosfatidilinozitol-3 kinaze (*eng.* phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) u granulosa stanicama, koja pretvara fosfatidilinozitol (3,4)-bifosfat (*eng.* phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate, PIP3) u fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (*eng.* phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP2), što rezultira daljnjom fosforilacijom i aktivacijom Akt kinaze (protein kinaza B, PKB), odnosno rastom i razvojem stanica kao odgovor na signal. *Forkhead* protein 1 u O subporodici (*eng.* forkhead box-containing protein 1, FOXO1) supstrat je Akt-a i fosforilira se na podražaj s FSH u granulosa stanicama. FOXO transkripcijski faktori se vežu za DNA kao monomeri u nefosforiliranom obliku s funkcijom i aktivatora i represora transkripcije, ovisno o genu, metabolizmu i preživljavanju stanice. Fosforilacijom se otpuštaju od DNA, izlaze iz stanice i degradiraju. U aktivnom

defosforiliranom obliku, uloga FOXO je održavanje stanice u G₀ fazi represijom ciklina D, no sam FSH nije dovoljan za to postignuće. Potreban je aktivin ili neki drugi član transformirajućeg faktora rasta (*eng.* transforming growth factor, TGF) uz FSH. Zajedno aktiviraju ciklin D₂ promoter-reporter i stimuliraju ekspresiju ciklin D₂ mRNA. Aktivin sam također nije dovoljan za stimuliranje ekspresije ciklina. Transdukcija granulosa stanica s mutantom Smad3 u kojemu je uklonjeno tip receptora potreban za fosforilaciju Akt-a i FOXO1 dovodi do ukinuća indukcije ciklina D₂, što je dokaz da je fosforilacija FOXO1 potrebna za njegovu aktivaciju.

FSH potiče aktivnost brojnih ciljnih gena, primjerice gena za aromatazu, inhibin- α , receptore LH i citokrom P450 koji kida bočni lanac kolesterola (*eng.* cholesterol side chain cleavage, SCC cytochrom P450) u granulosa stanicama, a uz aktivin potiče ekspresiju nuklearnih receptora steroidnog faktora 1 (*eng.* steroidogenic factor-1, SF-1) i jetrenog receptorskog homologa-1 (*eng.* liver receptor homolog-1, LRH-1). Kada se na granulosa stanice djeluje s FSH i aktivinom, FOXO1 u aktivnom obliku suprimira djelovanje aromataze, inhibina- α , steroidogenog faktora-1 (*eng.* steroidogenic factor-1, SF-1) i LRH-1, što upućuje na zaključak da je FOXO1 glavni represor ciljnih gena FSH (Hunzicker-Dunn i Maizels, 2006).



Slika 1.5 Shematski prikaz signalnog puta FSH i njegova regulacija ekspresije ciljnih gena u granulosa stanicama.

1.2 Liječenje neplodnosti

Obrada neplodnih parova započinje detaljnom anamnezom i ginekološkim pregledom ispitanice kod koje je potrebno učiniti Papa-test, bakteriološke briseve cerviksa (test na aerobne i anaerobi mikroorganizme, *Chlamidia* sp., *Ureaplasma* sp., *Mycoplasma* sp.), te hormonsku obradu pacijentice (3. dana menstruacijskog ciklusa određuju se bazalne koncentracije FSH, LH, estradiola, prolaktina i TSH) te spermogram kod partnera.

Transvaginalni ultrazvuk ima vodeću ulogu u dijagnostičkom algoritmu obrade neplodnosti i otkriva moguću uterinu i adneksalnu patologiju, pa je ponekad i sam dovoljan za otkrivanje uzroka neplodnosti.

Muškog partnera treba uputiti na spermogram koji će dati sliku o oplodnom potencijalu sperme. Ukoliko se u ejakulatu nađu leukociti treba učiniti i bakteriološku obradu ejakulata i urina radi sve češćih kroničnih prostatitisa. Danas se često muškarac šalje i na pregled specijalistu urologu u okviru početne obrade neplodnosti. Karakteristike urednog spermograma prikazane u tablici 1.2.

Tablica 1.2 Referentne vrijednosti spermograma

Fizikalne osobine	Brojnost i pokretljivost spermija	Morfologija i vijabilnost spermija
volumen >2 mL	broj spermija >20x10 ⁶	>50% normalne morfologije
pH 7,2-7,0	> 50% progresivno pokretnih	> od 50% živih

Liječenje neplodnosti provodi se dijagnostičkim i terapijskim postupcima kojima je cilj uspješno ostvarivanje trudnoće uz što prirodniji i manje invazivan pristup koji se temelji na uzročnom liječenju. Katkad je za ostvarenje trudnoće dovoljno pridržavanje jednostavnih uputa u smislu promjene životnih navika para, a ponekad dovoljna jednostavna medicinska intervencija u smislu stimulacije ovulacije. Ukoliko ove jednostavne metode zakažu, prelazi se na pomognutu oplodnju.

1.2.1 Metode pomognute oplodnje

Odabir postupka potpomognute oplodnje ovisi prije svega o duljini trajanja neplodnosti, uzroku neplodnosti i dobi žene, a uspješnost postupaka ovisi o mnogo čimbenika.

Metode pomognute oplodnje (MPO) koje se danas koriste u praksi su:

1. Utvrđivanje ovulacije u prirodnom ili stimuliranom ciklusu i tempirani odnos; ultrazvučno, a ponekad se određivanjem hormonskog statusa prati razvoj folikula te se određuje vrijeme ovulacije i optimalan dan za odnos.
2. Inseminacija sjemenom partnera u prirodnom ili stimuliranom ciklusu (*eng.* Artificial

Insemination by Husband/variation Human, AIH) najjednostavnija je metoda potpomognute oplodnje kod koje se u vrijeme ovulacije sjeme partnera obradi u centrifugi te koncentrirano, kroz kateter, unese u maternicu. Indikacije za inseminaciju su lošiji nalazi spermioograma, idiopatska neplodnost i udruženi uzroci neplodnosti (ovulacijska disfunkcija i lošiji spermioogram).

Preduvjet za ove dvije metode su prohodni jajovodi što se može utvrditi ispitivanjem prohodnosti jajovoda rentgenskom snimkom (HSG-histerosalpingografija) ili ultrazvučnim pregledom (sono HSG).

3. Izvantjelesna oplodnja (*eng.* In Vitro Fertilization, IVF) s prijenosom svježih ili smrznutih zametaka je metoda kod koje se vaginalnom punkcijom jajnika žene aspiriraju jajne stanice, koje se zatim u laboratoriju oplode sjemenom partnera. Ako dođe do oplodnje, najviše 2 ili 3 zametka se vraćaju u maternicu. Ukoliko ih ima više, ostali se pokušaju kriopohraniti (zamrznuti) te se vraćaju u sljedećim ciklusima, ukoliko je prvi bio neuspješan. Prema trenutnom Zakonu o metodama potpomognute oplodnje Republike Hrvatske zameci se mogu samo u iznimnim slučajevima kriopohraniti, a dozvoljena je kriopohrana jajnih stanica. Varijanta izvantjelesne oplodnje je intracitoplazmatsko injiciranje spermija (*eng.* Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) u slučajevima težih oblika muške neplodnosti pri čemu se spermij unosi unutar citoplazme jajne stanice kako bi se povećala mogućnost oplodnje. Indikacije za izvantjelesnu oplodnju su neprohodnost jajovoda, teža muška neplodnost, udruženi uzroci, idiopatska neplodnost i endometrioza.

U postupke izvantjelesne oplodnje uključuju se i parovi kod kojih nakon više postupaka inseminacija (barem tri pokušaja) nije došlo do željene trudnoće.

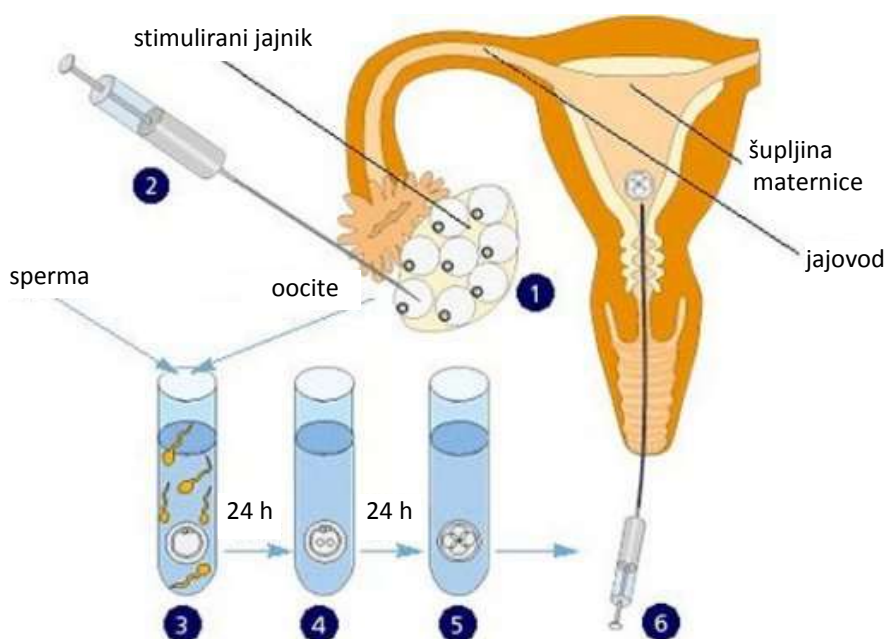
Uspješnost izvantjelesne oplodnje izražava se postotkom ostvarenih trudnoća koji se može izražavati u odnosu na započeti ciklus, na učinjenu aspiraciju oocita te konačno u odnosu na učinjeni transfer embrija. Danas se sve više koristi upravo "*Take home baby rate*" koji odražava odnos započetog ciklusa izvantjelesne oplodnje i poroda zdravog novorođenčeta (Fukuda i sur., 2001).

Općenito, uspješnost inseminacije i IVF/ICSI u prirodnom ciklusu iznosi oko 10-15%, IVF/ICSI u ciklusu s blagom stimulacijom 25-30%, a IVF/ICSI u stimuliranom ciklusu 25-40% po jednom postupku. Međutim, kumulativna stopa uspješnosti, nakon par pokušaja, je uvijek veća, i velika većina parova koji se odluče za pomognutu oplodnju će nakon nekoliko pokušaja dobiti dijete.

1.2.2 Postupak izvantjelesne oplodnje (IVF)

Postupak izvantjelesne oplodnje sastoji se od nekoliko faza (slika 1.6):

1. *Faza uzimanja lijekova za stimulaciju jajnika uz redovitu folikulometriju ultrazvukom*
Uz folikulometriju se vrlo često 7. dana stimuliranog ciklusa te na dan primjene hCG određuje koncentracija estradiola. Lijekovi koji se primjenjuju za stimulaciju jajnika su rekombinantni folikul-stimulirajući hormon (rFSH) ili visokopročišćeni humani menopauzalni gonadotropin (*eng.* highly purified human menopausal gonadotropin, HP-hMG). Moguć je i postupak u prirodnom ciklusu ili uz stimulaciju klomifenom ili letrazolom.



Slika 1.6 Ilustrirani prikaz IVF ciklusa: 1. stimuliranje razvoja folikula; 2. aspiracija jajnih stanica; 3. inseminacija; 4. fertilizacija; 5. razvoj embrija; 6. transfer embrija

2. Folikulometrija i tempiranje postupka

Transvaginalna ultrazvučna pretraga jajnika i endometrija danas je nezamjenljiva metoda za tempiranje postupka, kako inseminacije tako i postupka punkcije i aspiracije folikula za postupak oplodnje izvan tijela. Folikulometrija se provodi svaki dan dok vrijednost vodećeg folikula ne dosegne promjer od 18 mm i tada možemo tempirati postupak pomognute oplodnje. Uobičajene metode za tempiranje postupka su primjena rhCG (125 μg *s.c.*) ili hCG (5000 IU / 10000 IU *i.m.*) i to 32 do 36 sati prije samog postupka. Ukoliko se postupak radi kasnije realna je mogućnost da dođe do ovulacije stimuliranih folikula te se potom mora odustati od postupka.

3. *Aspiracija jajnih stanica*

Najzahvatljiviji zahvat u postupku izvanmaterične oplodnje je aspiracija oocita. Prve aspiracije folikula izvedene su laparoskopski, potom pod kontrolom transabdominalnog ultrazvuka, dok se danas punkcija folikula radi pod kontrolom transvaginalnog ultrazvuka. Punkcijske igle imaju obilježivače koji omogućuju njihovu jasnu vizualizaciju na ultrazvučnom ekranu tako da kad igla probije zid rodnice i uđe u folikul vrh punkcijske igle je jasno vidljiv na ekranu. Svaki centar koji provodi punkcije folikula mora imati na raspolaganju analgeziju ovisno o željama pacijentice, no najčešće se primjenjuje intravenski sedativ i/ili analgetik (bez opće anestezije) ili pacijentica primi peroralnu kombinaciju sedativa i analgetika pola sata prije zahvata.

4. *Prijenos zametaka u materične (eng. embryo transfer).*

Nakon postupka aspiracije folikula dobiveni se aspirat odmah upućuje na obradu u laboratorij za humanu reprodukciju iz kojeg se izoliraju jajne stanice se te ocjenjuje njihovu kvalitetu. Nakon obrade i pripreme jajnih stanica i sjemena obavlja se inseminacija jajnih stanica ili intracitoplazmatska injekcija spermija (ICSI) (slika 1.7).



Slika 1.7 Unošenje jednog spermija u jajnu stanicu injekcijom (ICSI)

Idealno mjesto za podlaganje zamet(a)ka je 2 cm ispod fundusa uterusa. Transvaginalnim ultrazvukom moguće je prije samog postupka izmjeriti dužinu cerviksa te prema izmjerama postaviti potom kateter intrauterino ili je kontrolu pozicije katetera moguće pratiti istovremenim transabdominalnim ultrazvučnim pregledom uz puni mjehur pacijentice koji olakšava vizualizaciju uterusa. Danas se smatra da mirovanje nema učinka na moguću bolju uspješnost postupka (u smislu ostvarivanja trudnoće) te pacijentica nakon postupka smije ustati i ići kući. Analgezija prilikom postupka prijenosa zametaka nije potrebna, no u posljednje vrijeme se preporuča korištenje nesteroidnog analgetika sat vremena prije prijenosa zametaka, a u

smislu smanjenja kontraktilnosti maternice što bi moglo utjecati na veću uspješnost postupka. Svjetski je trend da se u materijšte prenosi jedan, najbolji zametak, dok se preostali podvrgavaju postupku kontroliranog zamrzavanja kako bi se u slučaju neostvarene trudnoće moglo pristupiti ponovljenom prijenosu odmrznutog zametka. Danas je cilj postupka pomognute oplodnje živo i zdravo dijete, a poznavajući rizike višeplođnih trudnoća neophodno je pokušati ostvariti jednoplođnu trudnoću. Dan prijenosa zametka određuje se ovisno o stadiju razvoja zametka, a najčešće je to treći dan, no prijenos zametka može se učiniti i drugi, četvrti ili peti dan nakon postupka aspiracije oocita.

5. *Inseminacija i fertilizacija*

Spermiji se odvoje od ostatka ejakulata te polože zajedno s jajnim stanicama najbolje kvalitete u posebno kontroliranu komoru, gdje se održava odgovarajuća temperatura, pH, vlažnost i koncentracija ugljikovog dioksida. Oko 10000 spermija dodaje se na jednu jajnu stanicu. Miješanje spermija i spolne stanice naziva se inseminacija. Nakon 12-24 sati od inseminacije slijedi fertilizacija, kada spermij prodiere u jajnu stanicu. Prosječno se oplodi 70% jajnih stanica. Ukoliko se procijeni da je mogućnost fertilizacije niska, pristupa se postupku ICSI.

6. *Kultura embrija*

Ukoliko se fertilizirana jajna stanica podijeli, postaje embrij. Unutar 5 dana, normalan embrij ima nekoliko stanica koje se zasebno dijele. Embrij se može podvrgnuti i predimplantacijskoj genetskoj dijagnostici (*eng.* pre-implantation genetic diagnosis, PGD), ukoliko postoji rizik prijenosa genetskog poremećaja s roditelja na dijete. Taj se postupak provodi tako da se 3-4 dana nakon fertilizacije ukloni po jedna stanica od svakog embrija te se obavlja genetičko testiranje.

1.2.3 Lijekovi u medicinski potpomognutoj oplodnji

Razumijevanje učinka lijekova u postupku pomognute oplodnje uvjetovano je razumijevanjem prirodnog menstrualnog ciklusa. Jajnik je pod kontrolom hipofize u kojoj se proizvode FSH i LH. FSH se stvara u prvoj fazi ciklusa i uvjetuje rast folikula i porast estrogena. FSH u kombinaciji s estrogenom uzrokuje nagli skok lučenja LH iz hipofize koji dovodi do konačne maturacije jajne stanice i potom prsnuća folikula-ovulacije. Na mjestu prsnutog folikula stvara se žuto tijelo koje sljedećih 14 dana luči progesteron i estrogen u cirkulaciju, a radi pripreme maternice (endometrija) za moguću trudnoću. Ukoliko trudnoća izostane žuto tijelo (*lat.* corpus luteum) postupno atrofira, a posljedično se smanjuje stvaranje

progesterona i estrogena i konačno dolazi do menstruacije i početka sljedećeg ciklusa. Trudnoća izaziva žuto tijelo na sve veće stvaranje progesterona i estrogena koje održavaju trudnoću sve dok posteljica (trofoblast) u cijelosti ne preuzme ulogu stvaranja hormona, a što se zbiva s navršenih 7 tjedana od izostanka menstruacije.

Lijekovima za stimulaciju jajnika želi se postići veći broj zrelih folikula kako bi se dobilo što veći broj jajnih stanica čime se povećava mogućnost ostvarivanja trudnoće. Postupak aspiracije mora biti učinjen u određenom vremenskom razdoblju koje traje do najviše 4 sata kada je moguće aspirirati jajnu stanicu u sadržaju folikula. Ukoliko se punkciji folikula i aspiraciji folikularne tekućine pristupi prekasno tada će folikuli prsnuti, doći će do ovulacije i postupak se mora prekinuti. Stoga je neophodno postupak vremenski uokviriti („tempirati“). Lijek koji ima učinak sličan hormonu luteinizacije (LH) je humani korionski gonadotropin (*eng.* human chorionic gonadotropin, hCG). Stoga se ordinira primjena hCG 32-36 sati prije no što će se pristupiti punkciji folikula i aspiraciji jajnih stanica i time tempira vrijeme kada postupak treba učiniti. Injekcija hCG-a kojim se tempira ovulacija naziva se „štoperica“.

Veliku ulogu u mogućoj prijevremenoj ovulaciji igra mogući spontani skok LH iz hipofize. U slučaju da se LH iz hipofize spontano krene lučiti (a kao odgovor na povećanu koncentraciju egzogenog FSH i posljedičnog rasta estrogena) tada će doći do prijevremene luteinizacije folikula i ovulacije u nekontrolirano vrijeme. Stoga se uz lijekove za stimulaciju jajnika dodatno koriste i lijekovi koji onemogućavaju skok LH iz hipofize pacijentice te osiguravaju da će hCG („štoperica“) precizno tempirati postupak i osigurati sigurnije dobivanje kvalitetnih jajnih stanica.

1.2.3.1 Lijekovi za stimulaciju jajnika

Najkvalitetniji lijekovi za stimulaciju jajnika su gonadotropini. Danas su u Republici Hrvatskoj na raspolaganju urinarni viskopročišćeni humani menopauzalni gonadotropini i rekombinantni FSH i LH. Urinarni preparat je dobiven iz urina žena u postmenopauzi, dok je rekombinantni pripravak čisti sintetski lijek dobiven genetskim inženjersvom. Veliki je broj studija koje uspoređuju uspješnost ovih preparata i za sada nema konačnog zaključka koji je preparat bolji ili učinkovitiji. Rekombinantni pripravak je po ampuli ~30% skuplji, no po ukupnom broju ampula za jednu stimulaciju su cijene slične (s obzirom na to da se uglavnom troši manje ampula rekombinantnog pripravka) (Schoffski O, 2007 Leher P2010). Smatra se da su svi gonadotropini podjednako učinkoviti i sigurni te da su dalje usporedne studije nepotrebne (van Wely i sur., 2011).

Na tržištu je prisutan uHP-hMG preparat tvorničkog naziva Menopur[®] od kojih svaka ampula

sadrži 75 i.j. pripravka. Isto doziranje ima i jedna ampula lijeka Gonal-F® koji je rekombinantni FSH, a dolazi u pojedinačnom pakiranju. Navedena dva preparata su na listi lijekova HZZO i za bolničke pacijente su besplatna.

Najčešće se koristi stimulacijski protokol koji počinje 2. dana ciklusa s 225 i.j. uHP-hMG (3 ampule) u trajanju 6 dana. Prvu folikulometriju s mogućim mjerenjem estradiola treba učiniti 7. dana ciklusa te se nadalje terapija modificira prema nalazu folikulometrije. Terapija se nastavlja istom dozom još par dana, uz svakodnevne folikulometrije, sve dok bar tri folikula ne dosegnu promjer od 18 mm što se smatra primjerenim za prekid terapije gonadotropinima i ordiniranje hCG (“štoperice”) koji će tempirati postupak aspiracije jajnih stanica. Terapija se daje jednom dnevno, a izostanak davanja terapije ili pauza u davanju imat će za posljedicu slabiji odgovor jajnika.

Najstariji lijek za stimulaciju jajnika je klomifen citrat (CC). Ima slabiji učinak na stimulaciju jajnika u odnosu na gonadotropine, a također ima i neželjen učinak na maturaciju endometrija što u konačnici ima utjecaj i na (slabiju) implantaciju zametka. Klomifen stoga nije prvi lijek izbora za stimulaciju jajnika u postupcima izvantjelesne oplodnje. Danas se češće koristi za stimulaciju jajnika u postupcima inseminacije te za blaže stimulirane cikluse kod pacijentica koje su neadekvatno reagirale na stimulaciju gonadotropinima u prethodnim postupcima izvantjelesne oplodnje. Klomifen citrat je lijek izbora za stimulaciju pacijentica s policističnim jajnicima upravo zbog slabijeg učinka, jer kod njih stimulacija jajnika s gonadotropinima nerijetko ima za posljedicu hiperstimulacijski sindrom koji je jedna od ozbiljnih komplikacija stimulacije jajnika. Sindrom odlikuju povećani jajnici, preko 10 cm u promjeru, s brojnim lutealnim cistama te hiperestrogenemija koja izazvava poremećaje koagulacije, promjene permeabilnosti membrana, ascites, hidrotoraks, a u rijetkim i nepovoljnim uvjetima moguće je i zatajenje disanja i smrtni ishod (Binder i sur., 2007). Stoga je izbjegavanje hiperstimulacijskog sindroma najvažniji zadatak liječnika koji vodi postupak stimulacije jajnika.

Klomifenu sličan lijek jednostavne, peroralne primjene je letrozol (tvorničkog naziva Femara®). Ima sličan učinak na jajnike kao klomifen, ali bez negativnog učinka na maturaciju endometrija.

1.2.3.2 Lijekovi koji povećavaju uspješnost dobivanja oocita (lijekovi za supresiju LH)

Analozi GnRH su lijekovi koji služe za prevenciju prijevremenog porasta endogenog LH. Dvije su vrste analoga koji imaju isti krajnji učinak, odnosno blokadu hipofize pacijentice u postupku stimulacije jajnika za izvantjelesnu oplodnju; antagonisti i agonisti GnRH.

Antagonisti sprječavaju porast LH kompetitivnom blokadom receptora za GnRH. Primjenjuju se od kasne folikularne faze do primjene hCG i izravno onemogućavaju prijevremeni skok LH. U Republici Hrvatskoj uobičajeno je kontinuirano davanje lijeka uz gonadotropine od 7. dana ciklusa ili od trenutka kad folikuli dosegnu promjer od 12 mm. Antagonist se uobičajeno koristi u dozi 0,25 mg svakodnevno sve do najkasnije 12 sati prije primjene hCG. Generičko ime lijeka je cetoreliks acetat (tvornički naziv Cetrotide[®]), a u RH je besplatan za bolničke pacijente. Antagonisti su lijekovi novije generacije i ušli su u kliničku praksu posljednjih desetak godina. Dotadašnji standard za prevenciju LH skoka su bili jedino agonisti, a koji su uvedeni u kliničku praksu 80-ih godina prošlog stoljeća.

Agonisti također sprječavaju endogeni porast LH, no kako bi se ostvario taj učinak moraju se početi davati najmanje 7 dana (uobičajeno 10-14 dana) prije početka terapije gonadotropinima. Njihov početni učinak na lučenje FSH i LH je stimulirajući, no s obzirom na svakodnevnu primjenu njihov učinak ubrzo postaje supresivan te sve dok pacijentica prima agonist neće doći do prijevremenog endogenog lučenja LH. Lijek koji se ordinira u bolnici je triptorelin (Decapeptyl[®] 0,1), a pacijentica ga dobiva do najkasnije 12 sati prije primjene hCG.

Primjena antagonista je kratkotrajnija i sa znakovito manje sindroma hiperstimulacije u odnosu na agoniste uz uporedivo sličnu uspješnost po pitanju ostvarenih trudnoća i poroda.

U svijetu se još uvijek više koriste agonisti za prevenciju skoka LH, no s obzirom na učinkovitost, sigurnost, manje nuspojave i toleranciju antagonisti bi trebali postati prvi izbor lijeka za prevenciju prijevremenog endogenog porasta LH.

1.2.3.3 Lijekovi za tempiranje postupka

Daleko najčešće korišten preparat za tempiranje postupka pomognute oplodnje je hCG. U Republici Hrvatskoj je registriran rekombinantni hCG (Ovitrelle[®]) koji sadrži 125 µg rhCG, a jedna je injekcija dovoljna za tempiranje postupka pomognute oplodnje neovisno o broju folikula. Drugi registrirani lijek je urinarni preparat, uhCG (Brevactid[®]), a dostupan je u dozaži od 5000 i.j. i 1500 i.j. Ukoliko pacijentica ima jedan do dva folikula tada će primjena jedne ampule od 5000 i.j. biti dostatna za maturaciju oocite i za adekvatno tempiranje postupka. U svim ostalim slučajevima (veći broj folikula) standard doziranja je 10000 i.j.

Alternativno se za tempiranje postupka mogu davati i rekombinantni LH (Luveris[®], 75 i.j.) i agonist GnRH (triptorelin, Decapeptyl[®] 0,1). Agonist se za tempiranje postupka ordinira jedino ukoliko je pacijentica koristila antagoniste za supresiju endogenog skoka LH, a može

se ordinirati kako bi se smanjila mogućnost hiperstimulacijskog sindroma nakon punkcije folikula.

1.2.3.4 Lijekovi za podršku žutom tijelu

Klasični dugi protokol stimulacije jajnika za postupak izvantjelesne oplodnje koristi duže davanje agonista GnRH i potom uz agonist i gonadotropine u različitim dozama. Dugo davanje agonista može izazvati neadekvatni hormonski odgovor žutog tijela nakon postupka aspiracije te je stoga neophodna primjena lijekova koji će nadomjestiti moguću insuficijentnu ulogu žutog tijela kod pacijentice stimulirane dugim protokolom. Razlog za nedostatnu funkciju žutog tijela može se naći u činjenici da razvoj više folikula u jajniku do kojeg dolazi kao posljedica stimulacije gonadotropinima izaziva nefiziološke više koncentracije spolnih steroidnih hormona koje posljedično mehanizmom negativne povratne sprege na razini hipotalamičko-hipofizane osovine inhibiraju sekreciju LH iz hipofize. Primjena lijekova nakon postupka aspiracije oocita i prijenosa zametaka naziva se "podrška žutom tijelu". Ovaj se postupak također uobičajeno koristi i kod pacijentica koje su stimulirane gonadotropinima u kratkom protokolu uz antagoniste ili nakon stimulacije jajnika klomifenom. U postupcima pomognute oplodnje u prirodnom ciklusu potreba za "podrškom žutom tijelu" vjerovatno nije potrebna, no liječnici se ipak često odlučuju na davanje terapije.

Standard podrške žutom tijelu je vaginalna primjena mikroniziranog progesterona. Mikronizirani progesteron primjenjen oralnim putem nije adekvatno učinkovit, a često izaziva i nuspojave, primjerice pospanost. Stoga, ukoliko vaginalna primjena iz bilo kojeg razloga nije moguća tada je bolje primjeniti didrogesteron. U zemljama sjeverne Amerike više se koristi progesteron u vidu intramuskularnih injekcija, no randomiziranim studijama nije uočena superiornost intramuskularne primjene. S "podrškom žutom tijelu" uobičajeno se započinje nakon postupka aspiracije jajnih stanica, a nastavlja se do 11.-12. dana poslije prijenosa zametaka kada se pacijenticu uputi na vađenje krvi radi određivanja serumskog β -hCG. Ukoliko je nalaz β -hCG negativan, pacijentica nije trudna i treba prekinuti svu terapiju. Ukoliko je postupkom ostvarena trudnoća primjenu progesterona treba nastaviti bar do 7. tjedna trudnoće. Premda teorijski trofoblast preuzima ulogu stvaranja hormona u 7. tjednu trudnoće, većina liječnika nastavlja s "podrškom žutom tijelu" do 10. tjedna, pa i duže.

Umjesto svakodnevne primjene progesterona jednako kvalitetni učinak možemo postići primjenom hCG u injekcijama. Primjena hCG u dozi od 1500 i.j. intramuskularno prvi dan i četvrti dan poslije prijenosa zametaka jednako je kvalitetna "podrška žutom tijelu" kao i gore opisana primjena mikroniziranog progesterona, no primjena hCG nakon prijenosa zametaka

povećava mogućnost razvoja hiperstimulacijskog sindroma te se najčešće izbjegava u kliničkom radu.

Rezultati randomiziranih studija su pokazali da uloga primjene estrogena u "podrsci žutom tijelu" nije značajna te se uglavnom ne propisuje. Moguća dobrobit primjene estrogena je zadebljavanje endometrija u slučaju neadekvatne debljine te se može primjeniti uobičajeno estradiol. Jednokratna primjena agonista GnRH (1 amp Decapeptyl[®] 0,1 s.c.) i to 6. dan nakon postupka izvantjelesne oplodnje čini se da ima pozitivan učinak na uspješnost postupka i sve će ulazi u algoritam "podrške žutom tijelu" mada mehanizam učinka nije sasvim jasan (Tesarik i sur., 2006).

1.2.3.5 Ostali lijekovi koji mogu biti prepisani tijekom postupka pomognute oplodnje

Kod pacijentica sa sindromom policističnih jajnika koje se stimuliraju klomifenom može se dodati od 1. dana ciklusa kortikosteroid. Kortikosteroidi bi mogli imati utjecaj i na implantaciju, odnosno na supresiju mogućih neprimjerenih imunosnih zbivanja koja bi mogla dovesti do odbacivanja zametaka prenešenih u materičnu šupljinu. Stoga se kortikosteroidi mogu prepisivati pacijenticama nakon postupka punkcije, pa sve do ultrazvučno potvrđene intrauterine trudnoće.

Rektalno primjenjen indometacin dva puta dnevno od davanja hCG do postupka punkcije može imati utjecaja na stabilnost membrane folikula i time moguće spriječiti prijevremenu ovulaciju u pacijentica koje nisu stimulirane, već pokušavaju postupak IVF u prirodnom ciklusu.

Prije postupka punkcije jajnika pacijentici se može preporučiti uzimanje sedativa i analgetika. Postoji mogućnost pozitivnog djelovanja nesteroidnog antireumatika (piroksikam) danog prije postupka prijenosa zametaka na krajnji ishod postupka, odnosno bolju implantaciju prenešenih zametaka. Smatra se da bi niske doze acetilsalicilne kiseline (1 mg/kg tjelesne težine) nakon aspiracije oocita mogle djelovati na mogućnost implantacije. Randomiziranim studijama učinkovitost acetilsalicilata u niskim dozama nije dokazana kao ni primjena terapije niskomolekularnim heparinom.

Pacijentice s dokazanom trombofilijom su međutim svakako kandidati za ordiniranje acetilsalicilne kiseline do dana prijenosa zametaka, a poslije prijenosa zametaka i za svakodnevnu primjenu niskomolekularnog heparina.

Klinički ishod potpomognute oplodnje (*eng.* Assisted Reproductive Technology, ART) ovisi o kontroliranoj stimulaciji jajnika (*eng.* controled ovarian stimulation, COS), koja se provodi gonadotropinima, najčešće egzogenim folikul stimulirajućim hormonom, što osigurava

sazrijevanje više jajnih stanica te uspješniji postupak *in vitro* fertilizacije (*eng. in vitro fertilization, IVF*). Uspješnost COS je individualna (Loutradis i sur., 2008), odnosno pacijenti različito reagiraju na dozu te se dijele na one s prikladnim odgovorom (*eng. good responders*), slabim odgovorom (*eng. poor responders*) ili pojačanim odgovorom (*eng. hyperresponders*) jajnika na COS (Kligman i Rosenwaks, 2001). Posljedica različitosti u odgovoru na COS može biti nedovoljan odgovor jajnika ili pak hiperstimulacijski sindrom jajnika (Kligman i Rosenwaks, 2001; Perez Mayorga i sur., 2000).

1.5 Svrha i ciljevi rada

Pretpostavlja se da SNP 2039G>A u genu FSHR koji dovodi do zamjene asparagina za serin na položaju 680 u receptoru za FSH utječe na funkcionalnost tog receptora te da bi mogao biti presudan za odgovor jajnika na hormonsku stimulaciju u postupku potpomognute oplodnje. Stoga bi poznavanje genotipa ispitanice za taj SNP (Asn680/Ser680) moglo pridonijeti predikciji odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju te bi se moguće osigurao odabir odgovarajuće terapije kao i njezino doziranje, čime bi se pridonijelo uspješnosti postupka. Smatra se da biokemijski parametri, kao što su koncentracije FSH, LH, E2, prolaktina i TSH te broj antralnih folikula imaju veliki potencijal predikcije odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, al dosadašnje su studije dale oprečne odgovore.

Cilj je ovog rada bio ustanoviti je li svrsishodno provoditi genotipizaciju SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u svrhu što uspješnijeg otkrivanja ispitanica koje bi u prvom postupku potpomognute oplodnje mogle reagirati sa slabim ili jakim odgovorom na terapiju te procijeniti koji biokemijski parametri imaju prediktivnu vrijednost u probiru ispitanica na loš odgovor na kontroliranu stimulaciju jajnika, a na temelju čega bi se mogla adekvatnije prilagoditi terapija i time pridonijeti uspješnosti ishoda potpomognute oplodnje.

2 MATERI JAL I METODE

2.1 Ispitanice

U ispitivanje su bilo uključeno 211 ispitanica koje su bile podvrgnute postupku medicinski potpomognute oplodnje, bilo postupku *in vitro* fertilizacije (*eng.* in vitro fertilisation, IVF), bilo postupku intracitoplazmatskog injiciranja spermija (*eng.* intracytoplasmatic sperm injection, ICSI) na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice “Sveti Duh” u Zagrebu tijekom 2009., 2010. i 2011. godine.

Predloženu studiju odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice “Sveti Duh” u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kriteriji prema kojima su ispitanice obuhvaćene ovom studijom odabrane su sljedeći:

- dob: od 26 do 46 godina
- prisutna oba jajnika
- isključene akutne upalne promjene male zdjelice
- najmanje 6 mjeseci bez hormonske terapije

Nakon upoznavanja sa znanstvenom pozadinom ove studije i potpisivanja informiranog pristanka od svake ispitanice su uzeti sljedeći podaci:

- dob
- tjelesna težina i visina na temelju kojih se izračunava indeks tjelesne mase (*eng.* body mass index, BMI) kao omjer težine (kg) i kvadrata visine (m²)
- trajanje menstruacijskog ciklusa
- anamneza (opća i ginekološka)
- krvna grupa (ukoliko je poznato)
- pušač da/ne
- druge vrste terapija (osim terapije vezane za IVF postupak)

Na temelju anamneze definirani su uzroci neplodnosti (muški čimbenik, tubarni čimbenik, udruženi čimbenici, nepoznati uzrok) koju objašnjava prisupanje ispitanica postupku izvantjelesne oplodnje.

Sve ispitanice su bile u prvom stimulacijskom postupku izvantjelesne oplodnje, u dobi između 26 i 46 godina, a prethodno nikad nisu ostvarile trudnoću.

Svim je ispitanicama 3. dana ciklusa koji prethodi kontroliranoj stimulaciji jajnika (*eng.* controlled ovary stimulation, COS) određena bazalna koncentracija hormona FSH, LH, TSH, estradiola i prolaktina u serumu. Za potrebe utvrđivanja genotipa za polimorfizam jedne baze

(eng. single nucleotide polymorphism, SNP) 2039A>G (rs6166) u genu *FSHR*, a koji za posljedicu ima zamjenu asparagina na položaju 680 u serin (p.Asn680Ser) uzet je uzorak pune krvi koji je korišten za izolaciju genomske DNA.

Broj, kao i veličina antralnih folikula (eng. antral follicle, AF) određeni su transvaginalnim ultrazvukom između 3. i 5. dana ciklusa koji je prethodio stimuliranom ciklusu. Antralnim folikulima smatraju se svi folikuli promjera 2-8 mm, a koji se mogu vizualizirati ultrazvučnom pretragom oba jajnika. Zbroj svih antralnih folikula (eng. antral follicle count, AFC) predstavlja jedan od mogućih prediktora odgovora jajnika na stimulaciju gonadotropinima.

Ispitanice su na temelju primijenjene terapije za stimulaciju jajnika podijeljene u 3 skupine.

Skupina T1 stimulirana je "dugim protokolom", svakodnevnim korištenjem agonista gonadotropin-otpuštajućeg hormona (eng. gonadotropin-releasing hormone, GnRH) od 21. dana ciklusa koji prethodi COS te s 225 IU rekombinantnog FSH (rFSH) od 2. dana menstruacijskog ciklusa svakodnevno do primjene hCG.

Skupina T2 stimulirana je "dugim protokolom" svakodnevnim korištenjem agonista GnRH od 21. dana ciklusa koji prethodi COS te s 225 IU visokopročišćenog ljudskog menopauzalnog gonadotropina (eng. highly purified human menopausal gonadotropin, HP-hMG) (Menopur[®]) od 2. dana menstruacijskog ciklusa svakodnevno do primjene hCG.

Skupina T3 stimulirana je "kratkim protokolom" s 225 IU rFSH ili HP-hMG od 2. dana menstruacijskog ciklusa svakodnevno do primjene hCG uz istodobno korištenje antagonista GnRH od 7. dana stimulacije, a radi prevencije endogenog skoka LH.

Sedmog dana stimuliranog ciklusa te na dan primjene hCG, ispitanicama su određene koncentracije estradiola i prolaktina u serumu.

2.2 Metode

2.2.1 Sakupljanje uzoraka

2.2.1.1 Sakupljanje uzoraka seruma

Za potrebe definiranja hormonskog statusa (određivanja koncentracije FSH, LH, estradiola, LH i prolaktina), svim je ispitanicama venepunkcijom izvađeno 5 mL pune krvi u epruvete bez antikoagulanasa. Nakon potpunog zgrušavanja serum je odvojen centrifugiranjem 10 minuta pri 3600 okr/min.

2.2.1.2 Sakupljanje uzoraka pune krvi

Za potrebe izolacije genomske DNA, svim je ispitanicima venepunkcijom izvađeno 5 mL pune krvi u epruvete u kojoj se nalazio antikoagulans kalijeva EDTA. Krv je do daljnje analize pohranjena na -70°C .

2.2.2 Određivanje hormonskog statusa

Određivanje koncentracija FSH, LH, estradiola, TSH i prolaktina u serumu korišten je uređaj Vitros[®] 3600 (Ortho Clinical Diagnostic, Johnson&Johnson) uz uporabu komercijalnih paketa za pojedini analit (Ortho Clinical Diagnostic, Johnson&Johnson).

Princip ove imunokemiluminiscencijske metode temelji se na vezanju analita od strane 2 monoklonska protutijela (*eng.* monoclonal antibody, mAb) koja specifično prepoznaju različite epitope, od kojih je jedno obilježeno je biotinom, a drugo peroksidazom iz hrena (*eng.* horse radish peroxidase, HRP). Kompleks mAb1-analit-mAb2 se zatim preko biotina veže na spreptavidin kojim je obložena čvrsta faza, a nevezani se materijal uklanja ispiranjem. Količina vezanog kompleksa obilježenog HRP-om određuje se kemiluminiscencijskom metodom uz peroksid i luminol, pri čemu supstituirani acetanilid produžava emisiju kemiluminiscencijskog zračenja, koje se mjeri otičkim sustavom. Intenzitet zračenja izravno je proporcionalan količini analita u uzorku.

Referentne vrijednosti za pojedine hormone u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa navedene su u tablici 2.1.

Tablica 2.1 Referentne vrijednosti za određivane hormone u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa

Analit	Referentne vrijednosti
Folikul stimulirajući hormon (FSH), folitropin	3,5 – 12,5 IU/L
Luteinizirajući hormon (LH), lutropin	2,4 – 12,6 IU/L
Estradiol (E2)	80 – 790 pmol/L
Prolaktin	27 – 637 mIU/L
Tireotropni hormon (TSH), tireotropin	0,4 – 4,0 mIU/L

2.2.3 Folikulometrija

Folikulometrija je transvaginalna ultrazvučna pretraga kojom se mjere svi folikuli na oba jajnika te debljina endometrija u maternici. Ultrazvukom je potrebno vizualizirati jajnike i

izmjeriti promjer vodećeg folikula (mjerenje se izvodi dva puta, a srednja vrijednost mjerenja bilježi se kao promjer vodećeg folikula). U ovoj je studiji prva folikulometrija izvedena između 21. i 23. dana ciklusa koji prethodi COS, a radi uočavanja mogućih funkcionalnih cista koje negativno utječu na sam postupak stimulacije. Ukoliko cista nije bila dijagnosticirana, ušlo se u program stimulacije i to primjenom agonista GnRH (terapije 1 i 2) ili primjenom gonadotropina od 2. dana ciklusa koji je predstojio (terapija 3). U slučajevima kad je dijagnosticirana funkcionalna cista, kontrolirana stimulacija jajnika i postupak izvantjelesne oplodnje se odgodio za jedan menstruacijski ciklus. Folikulometrija se provodila svaki dan od 7. dana stimuliranog ciklusa sve dok vrijednost vodećeg folikula nije dosegla 18 mm u promjeru, kada se ordinirao hCG i tempirao postupak aspiracije folikula.

Za folikulometriju korištena je transvaginalna sonda frekvencije 5 MHz koja je priključena na ultrazvučni aparat Aloka CDSSD 1100 (Aloka, Japan), a koji je korišten i prilikom izvođenja punkcije i aspiracije folikula.

2.2.4 Postupak aspiracije folikula

Ispitanice su 30 minuta prije postupka aspiracije folikula dobile premedikaciju, sedativ i nesteroidni anti-reumatik kako bi se smanjila neugoda tijekom postupka. Ispitanica se nakon pražnjenja mokraćnog mjehura postavlja u klasični ginekološki položaj na ginekološkom stolu. Rodnica se priprema ispiranjem s tri sterilna tampona navlažena sterilnom fiziološkom otopinom. Izvođač zahvata ima sterilno kirurško odijelo i sterilne rukavice, a dalja priprema operacijskog polja podrazumijeva pokrivanje nogu, stražnjice i suprapubičnog dijela tijela sterilnim kompresama. Izvođač zahvata postavlja ultrazvučni gel na vrh ultrazvučne vaginalne sonde i navlači na vaginalnu ultrazvučnu sondu čisti prezervativ preko kojeg se postavlja adapter (vodilica) za vaginalnu sondu. Vodilica punkcijske igle omogućava pravilno pozicioniranje uboda igle kroz rodnicu i omogućava sigurnost pravilnog slijeda punkcijske igle prilikom izvođenja zahvata. Iznimna se pozornost pridaje sterilnosti. Iгла za punkciju (Kitazato, Japan) se postavlja u lumen adaptera i pristupa se zahvatu. Ultrazvučni aparat (Aloka, Japan) koji služi za kontrolu postupka punkcije mora imati mogućnost kontrole punkcije na ekranu, tj. niz točkica kojim se obilježava teorijsko mjesto prvog uboda i kasnijeg tijeka prolaska punkcijske igle. Punkcija se najčešće obavlja kroz stražnji forniks, no važnija je dobra vizualizacija jajnika s folikulima koji se žele aspirirati. Po vizualizaciji jajnika s folikulima čvrsto se sondom pritisne svod rodnice tako da se zid rodnice rastegne kako bi punkcijska igla prošla brže i lakše kroz rodnicu. Ukoliko su postignuti uvjeti da pod ultrazvučnom kontrolom imamo folikul koji želimo punktirati i da nam se taj folikul pokazuje

u središtu slijeda točkica na ekranu ultrazvučnog aparata, a što znači da bi nam se igla za punkciju trebala prikazati u centru tog folikula kad probijemo rodnicu, pristupamo punkciji. Nakon što smo solidno pritisnuli rodnicu punkcijsku iglu treba potisnuti u željeni folikul, odmjerenom snagom uz neprekidnu pozornost s obzirom na to da je prilikom zahvata lako otići predaleko i povrijediti crijeva ili krvne žile koje se nalaze uz jajnik.

Aspiracija folikula se obavlja pomoću aspiracijske pumpe kojom manipulira izvođač punkcije putem nožne pedale, a medicinska sestra mijenja epruvete u koje se aspiriraju folikuli. Aspiracijska pumpa (Cook) ima mogućnost određivanja podpritiska, a korišten je podpritisk od 220 kPa. Kontrola aspiracije je vizualna, na ultrazvučnom ekranu se prati smanjenje punktiranog folikula, a istovremeno u epruvetu se aspirira njegov sadržaj. Po aspiraciji folikula uputno je vrhom igle nježno proći („pogrebat“) uzduž zidova aspiriranog folikula uz stalni aspiracijski pritisak kako bi se što sigurnije aspirirale i stanice granulose s mogućom jajnom stanicom. Po aspiraciji folikula dobiveni materijal se odmah predaje u laboratorij za izvantjelesnu oplodnju. Potrebno je aspirirati sve folikule, a idealno ih je aspirirati jednim prolaskom kroz zid rodnice, što je moguće jedino kad su folikuli idealno poredani. Nakon što su svi folikuli u jednom jajniku aspirirani prelazi se na punkciju i aspiraciju drugog jajnika.

Po završetku aspiracije ultrazvukom se pregleda mala zdjelica i kontrolira moguće krvarenje. Nakon zahvata rodnicu se isperu jednom otopinom kako bi se smanjio rizik za infekciju i postpunkcijsko krvarenje.

Po obavljenom postupku ispitanice se otpuštaju iz bolnice, no u slučaju kada je postupak punkcije trajao duže od 10-15 minuta ili je bila primijenjena opća anestezija, ispitanice ostaju pod nadzorom do 2 sata nakon završetka zahvata. Ispitanice su upućene u broj dobivenih oocita te im je preporučena uobičajena terapija za potporu žutog tijela u obliku vaginalnih kapsula mikroniziranog progesterona u dozi 3 x 200 mg/dan.

2.2.5 Određivanje broja oocita i uspješnosti oplodnje

Iz folikularnog aspirata izolirane su oocite, a višak granulosa stanica odstranjen je mehaničkim putem. Prema broju dobivenih oocita ispitanice su podijeljene u tri skupine:

Skupina O1 – ispitanice kod kojih je dobiveno do 3 oocite (*eng.* low-responders)

Skupina O2 – ispitanice kod kojih je dobiveno 4 – 9 oocita (*eng.* normal responders)

Skupina O3 – ispitanice kod kojih je dobiveno više od 10 oocita (*eng.* hyper-responders)

Na temelju morfologije granulosa stanica i zrelosti oocite, oocite su opisane kao zrele, nezrele ili atretične. Četiri sata od punkcije i aspiracije folikula oocite su inseminirane pripremljenim pokretnim spermijima (klasičnim postupkom izvantjelesne oplodnje ili postupkom










intracitoplazmatskog injiciranja spermija). Dvadeset i četiri sata nakon inseminacije provjerava se uspješnost oplodnje, a zigote su opisane prema morfologiji projezgre. Uspješnost oplodnje izražena je kao omjer broja oocita s dvije projezgre nakon inseminacije i broja inseminiranih oocita (uz ograničenje na slučajeve kada je najmanje jedna oocita bila inseminirana). Tijekom drugog i trećeg dana od aspiracije folikula prati se i opisuje dinamika razvoja ranih zametaka te se odlučuje o prijenosu zametaka ili kulturi blastociste.

Kod ispitanica je 3. dana nakon aspiracije učinjen prijenos zametaka ili je 5. dana nakon aspiracije oocita učinjen intrauterini prijenos blastociste.

Dvanaestog dana nakon prijenosa zametaka određena je serumska koncentracije β -hCG radi određivanja uspjeha samog postupka, odnosno ostvarene trudnoće.

2.2.6 Izolacija genomske DNA

Humana genomska DNA izolirana je iz pune krvi uporabom komercijalno dostupnog kompleta za izolaciju DNA QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača. Podrobnije, krv je otopljena i promiješana, 200 μ L pune krvi pomiješano je s 20 μ L otopine proteinaze K i 200 μ L pufera AL te je cjelokupna smjesa inkubirana 10 minuta pri 56°C. Potom je u nju dodano 200 μ L apsolutnog etanola i smjesa je nanijeta na QIAamp Mini spin kolonu. Nakon centrifugiranja 1 minutu pri 6000g filtrat je bačen, a pranje vezane DNA odvijalo se u dva koraka: nakon dodavanja 500 μ L pufera AW1 i centrifugiranja 60 sekundi pri 6000g filtrat je bačen te je na kolonu nanijeto 500 μ L pufera AW2. Filtrat je odijeljen nakon centrifugiranja 3 minute pri 6000g te je kolona dodatno centrifugirana (1 min pri 16000g) kako bi se u potpunosti uklonili ostaci pufera. Potom je kolona na koju je nanijeto 200 μ L destilirane vode inkubirana 5 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega je centrifugirana 1 minutu pri 6000g. Tako dobiveni eluat koji sadrži DNA koncentracija 20-60 ng/ μ L pohranjen je na -20°C do daljnje uporabe (slika 2.1).

1. Liza uzoraka krvi	2. Prilagodavanje veznih uvjeta	3. Vežanje DNA
 200 µL krvi 20 µL proteinaze K 200 µL AL miješanje 56°C 10 min.	+ 200 µL etanola	 Nanošenje na kolonu  1 min. 6000g
4. Ispiranje membrane	5. Sušenje membrane	6. Otapanje DNA
 500 µL AW1  1 min. 6000g 500 µL AW2  1 min. 6000g	 1 min. 16000g	 200 µL H ₂ O sobna temp. 5 min  1 min. 6000g

Slika 2.1 Shematski prikaz postupka izolacije DNA primjenom komercijalnog kompleta QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit

2.2.7 Određivanje polimorfizma jedne baze lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu

Prisutnost polimorfizma jedne baze (*eng.* single-nucleotide polymorphism, SNP) 2039G>A u egzonu 10 gena *FSHR* (db SNP cluster ID rs6166) određena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (*eng.* real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) - metodom alelne diskriminacije (*eng.* TaqMan allelic discrimination assay). S obzirom na to da se navedeni SNP nalazi u kodonu 680 gena *FSHR*, zamjena baze A bazom G u genu *FSHR* uzrokuje u proteinu zamjenu aminokiseline asparagin sa serinom na položaju 680 (p.Asn 680Ser).

Pojedina reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu, konačnog volumena 20 μ L, sadržavala je ishodnice konačne koncentracije 900 nM, probe konačne koncentracije 200 nM, 1 x TaqMan[®] Universal PCR Master Mix No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) te 5 μ L izolata DNA. Primijenjene su ishodnice slijeda: 5'-AAGGAATGGCCACTGCTCTTC-3' (*forward*) i 5'-GGGCTAAATGACTTAGAGGGACAA-3' (*reverse*), te nukleotidne probe (položaj SNP je označen podebljanim malim slovom): 5'-AGAGTCACCA**g**TGGTT-3' (obilježena fluorescentnom bojom FAM) i 5'-AGTCACCA**a**TGGTTC-3' (obilježene fluorescentnom bojom VIC).

Korištenjem uređaja ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) lančana reakcija polimerazom za potrebe apsolutne kvantifikacije i alelne diskriminacije provedena je uz sljedeće reakcijske uvjete: početna denaturacija tijekom 10 minuta pri 95° C praćena je s 40 ciklusa denaturacije tijekom 15 sekundi pri 95° C i spajanja ishodnica i sondi te elongacije tijekom 1 minute pri 60° C.

2.2.8 Statistička analiza

Statistička analiza provedena je primjenom odgovarajućih statističkih testova: kako bi se utvrdilo jesu li podaci distribuirani po normalnoj razdiobi korišten je Kolmogorov-Smirnov test. Za analizu rezultata distribuiranih po normalnoj razdiobi upotrebljena je analiza varijance (ANOVA) i Tucky post-hoc test. Kod parametara s logaritamskom normalnom razdiobom prije analize podaci su logaritamski transformirani, dok su podaci koji nisu distribuirani po normalnoj razdiobi analizirani primjenom neparametrijskog Kruskall-Wallis testa za analizu razlike između većeg broja skupina. Za usporedbu rezultata između dvije skupine primjenjen Mann-Whitney test.

Kako bi se eliminirao utjecaj "*confounder*" varijabli (utjecajne varijable) na koncentracije ispitivanih analita, upotrebljena je analiza kovarijance (ANCOVA). Kao zavisna varijabla korišten je marker čija se razlika u koncentracijama između grupa testira, a kao "*confounder*" varijable korištene su bazalne vrijednosti istih parametara. Za procjenu utjecaja dva faktora na koncentraciju ispitivanih parametara kao i njihova interakcija korištena je dvofaktorska ANOVA analiza.

Za procjenu razlike između kategoričkih varijabli korišten je chi kvadrat (χ^2) test homogenosti.

Korelacija između dva markera provjeravana je pomoću linearne regresijske analize, a istovremeni utjecaj dvije ili više varijabli na varijaciju u koncentraciji zavisne varijable, testiran je upotrebom multiple linearne regresije po forward principu selekcije.

Za procjenu prediktivne vrijednosti ispitivanih parametara korištena je univarijantna i multivarijantna logistička regresija.

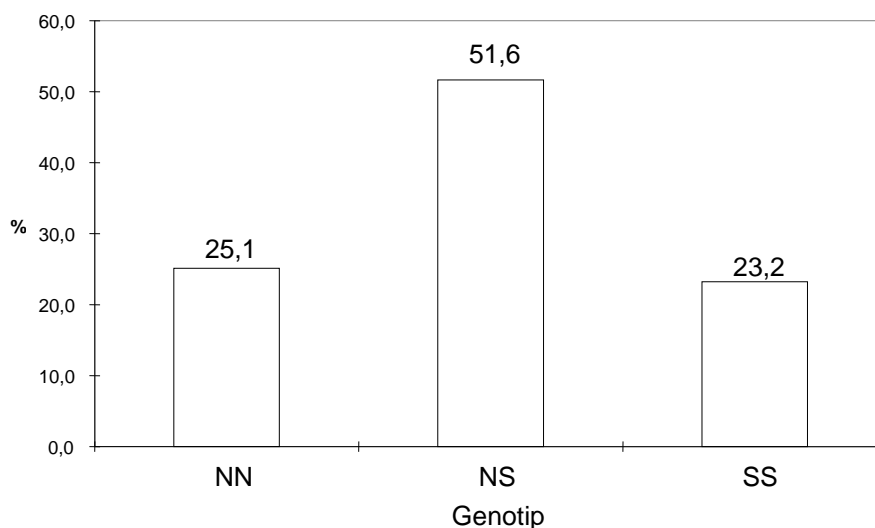
Dijagnostička točnost ispitivanih parametara provjeravana je pomoću ROC analize. Vrijednosti na osnovi kojih je dobiven optimalan broj lažno pozitivnih i pravih pozitivnih rezultata označene su kao optimalne granične ("*cut-off*") vrijednosti. Za modele dobivene pomoću logističke regresijske analize po forward principu selekcije konstruirana je ROC krivulja, a AUC je izračunata pomoću "C" analize.

Sve vrijednosti u tablicama prikazane su kao aritmetička sredina (\bar{x}) \pm standardna devijacija (SD) za normalno distribuirane parametre i kao geometrijska srednja vrednost i 95%CI za geometrijsku sredinu za log-normalno distribuirane parametre. Parametri čija razdioba nije normalna predstavljeni su kao medijan i interkvartilno odstupanje. Statistički značajni rezultati smatrani su oni čija je $p \leq 0,05$ (dvostrani test). Svi izračuni obavljani su pomoću Med Calc (verzija 9.3.8.0) i SPSS (verzija 17) programa.

3 REZULTATI

3.1 Učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u ispitivanoj populaciji

Sa svrhom rasvjetljavanja utjecaja SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u receptoru za folikul stimulirajući hormon na odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju u ovom je radu kao prvi korak ispitana učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u ispitivanoj skupini od 211 ispitanica koje su ušle u postupak potpomognute oplodnje. Uočeno je da raspodjela genotipova nije jednaka: najzastupljeniji je bio NS genotip; 109 od ukupno 211 ispitanica su bile heterozigoti (51,66%), dok su genotipovi NN i SS bili zastupljeni u približno istim postocima ($p < 0,001$); 53 ispitanice su bile homozigoti – divlji tip (NN) (25,12%), a 49 ispitanica su bile homozigoti (SS) (23,22%) (slika 3.1). Zastupljenost alela N iznosila je 76,8%, a alela S 74,9%.



Slika 3.1 Učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR*.

3.2 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji

U ovom su radu ispitanicama koje ulaze u postupak potpomognute oplodnje 3. dan ciklusa koji prethodi kontroliranoj stimulaciji jajnika određene bazalne koncentracije FSH, LH, estradiola (E2), TSH, prolaktina te je ultrazvučno određen broj antralnih folikula. Na temelju anamnestičkih podataka određena je starosna dob ispitanica kao i indeks tjelesne mase (*eng.* body mass index, BMI), izračunat kao omjer tjelesne mase (kg) i kvadrata visine (m²). Sedmog dana ciklusa u kojem su ispitanice potvrđene kontroliranoj stimulaciji jajnika te na dan aplikacije hCG određene su koncentracije E2 i prolaktina. Po izolaciji je određen broj dobivenih oocita. Za svaki je parametar, ovisno o tome je li razdioba unutar skupine bila

normalna, izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija ili geometrijska sredina i 95%-tni interval pouzdanosti, odnosno medijan i 25 i 75 percentil (kad raspodjela nije bila normalna) (tablica 3.1).

Tablica 3.1. Demografski i biokemijskih parametri te broj antralnih folikula i oocita u ispitivanoj populaciji

Godine	34,04 ± 4,20		
BMI	22,70 ± 3,22		
Broj antralnih folikula	19,47 ± 6,63		
Broj oocita	6,64 ± 4,75		
	Bazalni	7. dan	hCG
FSH (IU/L)	7.11 ± 1,78		
LH (IU/L)	6,67 ± 2,32		
bFSH/bLH	1,21 ± 0,62		
TSH (mIU/L)	2,3 ± 0,76		
E2 (pmol/L)	160,48 ± 46,08	1751,43* (1525,29 - 2011,10)	3436,05* (3037,39 - 3887,03)
Prolaktin (mIU/L)	330,0 ^f (255,00 - 401,00)	343,0* (275,75 - 440,00)	557,22 ± 197,44

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD.

* Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI.

^f Bazalni prolaktin prikazan je kao medijan, 25 i 75 percentil

3.2.1 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na genotip za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰

Rezultati analize kojoj je cilj bio utvrditi postoji li povezanost genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i vrijednosti praćenih parametara (tablica 3.2) pokazali su da osim u dobi ispitanica (p = 0,033) ne postoji statistički značajna razlika između skupina s različitim genotipom i izmjerenih biokemijskih parametara, kao ni broja antralnih stanica niti broja dobivenih oocita.

Utvrđeno je da je srednja vrijednost dobi ispitanica s genotipom NS statistički značajno veća od srednje vrijednosti dobi ispitanica s genotipom NN, kao i genotipom SS.

Tablica 3.2 Ispitivani parametri u odnosu na genotip za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰

	Genotip NN n = 53	Genotip NS n = 109	Genotip SS n = 49	p
Dob (godine)	33,28 ± 4,3	34,77 ± 4,17^{a*}	33,24 ± 3,83^{b*}	0,033
BMI	22,64 ± 2,82	22,37 ± 2,78	23,48 ± 4,29	0,136
Bazalni FSH (IU/L)	7,13 ± 1,96	7,19 ± 1,73	6,90 ± 1,96	0,672
Bazalni LH (IU/L)	6,33 ± 2,23	6,63 ± 2,26	7,13 ± 2,43	0,216
bFSH/bLH	1,34 ± 0,95	1,20 ± 0,45	1,08 ± 0,46	0,116
Bazalni E2 (pmol/L)	161,48 ± 44,42	160,35 ± 48,69	161,84 ± 42,62	0,979
Bazalni prolaktin* (mIU/L)	330,0 (255,00 - 401,00)	343,0 (275,75 - 440,00)	365,0 (284,75 - 471,47)	0,622
Bazalni TSH (mIU/L)	2,37 ± 0,69	2,32 ± 0,83	2,33 ± 0,67	0,931
E2 7. dan ^f (pmol/L)	1678,665 (1282,88 - 2196,55)	1651,440 (1349,97 - 2020,24)	2063,78 (1543,99 - 2758,56)	0,430
Prolaktin 7. dan ^f (mIU/L)	455,33 (400,02 - 518,29)	451,48 (415,28 - 487,69)	410,64 (360,80 - 467,36)	0,900
E2-hCG ^f (pmol/L)	3212,93 (2531,73-4077,43)	3330,72 (2796,21-3967,40)	3824,04 (2892,40-5055,78)	0,734
Prolaktin-hCG (mIU/L)	573,73 ± 215,11	550,66 ± 183,29	553,94 ± 210,79	0,779
Broj antralnih folikula	18,72 ± 5,99	19,38 ± 6,17	20,49 ± 8,18	0,396
Broj oocita	6,43 ± 3,98	7,55 ± 6,75	6,64 ± 4,75	0,306

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD, a usporedba je obavljena ANOVA testom.

^f Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI. Prije statističke analize varijable su logaritamski transformirane.

* Varijable nemaju normalnu raspodjelu i predstavljene su kao medijan, 25 i 75 percentil, a za usporedbu je korišten Kruskal Wallis test.

a – razlika u odnosu na genotip NN, b – razlika u odnosu na genotip NS, dokazana primjenom post hoc Tucky testa

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Kako bi se ispitalo razlikuju li se koncentracije E2 i prolaktina izmjerene 7. dana između ispitanica s različitim genotipovima za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ukoliko se uzmu u obzir njihove bazalne vrijednosti primjenjena je analiza ANCOVA. Koncentracije E2 i prolaktina izmjerene 7. dana korigirane su bazalnim vrijednostima. Ni nakon korekcije nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama E2 i prolaktina 7. dana između ispitivanih skupina. Isti je postupak primijenjen i za vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina izmjerene na dan primjene hCG, koje su korigirane vrijednostima koncentracija izmjerenim 7. dana (tablica 3.3).

Tablica 3.3 Korigirane vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina, izmjerene 7. dan i na dan primjene hCG u odnosu na genotip

	Genotip NN n = 53	Genotip NS n = 109	Genotip SS n = 49	p
E2, 7. dan ^f (pmol/L)	2623,95 ± 508,36	2776,20 ± 357,81	3587,51 ± 528,68	0,353
Prolaktin 7. dan, ^f (mIU/L)	514,71 ± 31,73	456,78 ± 22,12	450,32 ± 32,99	0,262
E2-hCG* (pmol/L)	4816,24 ± 295,57	5061,34 ± 203,06	5191,05 ± 302,45	0,661
Prolaktin hCG* (mIU/L)	546,46 ± 24,71	557,27 ± 167,00	560,20 ± 25,33	0,915

Prikazane su srednje vrijednosti ± SE, a usporedba je obavljena ANCOVA testom.

^f korekcija bazalnim vrijednostima

* korekcija vrijednostima izmjerenim 7. dana

3.2.2 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na primijenjenu terapiju

Za kontroliranu stimulaciju jajnika primijenjen je jedan od 3 protokola. Prema tom kriteriju ispitanice su podijeljene u 3 skupine (poglavlje 2.1): skupina T1 (n = 109), skupina T2 (n = 64) i skupina T3 (n = 38). Kako bi se ispitalo postoje li razlike u vrijednostima demografskih, biokemijskih parametara, kao i broja antralnih folikula i dobivenog broja oocita u skupinama ispitanica koje su primale različitu hormonsku terapiju za COS, primijenjeni su odgovarajući statistički testovi te je utvrđeno da je srednja vrijednost koncentracije bazalnog LH u skupini T3 statistički značajno veća od srednje vrijednosti koncentracije bazalnog LH u skupini T1 (p = 0,003) kao i u skupini T2 (p = 0,028). Slični su rezultati dobiveni i za koncentracije bazalnog FSH, ali su razlike na granici statističke značajnosti (p = 0,057) (tablica 3.4).

Tablica 3.4 Ispitivani parametri u odnosu na terapiju za COS

	Skupina T1 n = 109	Skupina T2 n = 64	Skupina T3 n = 38	p
Dob (godine)	33,64 ± 4,00	34,03 ± 4,00	35,24 ± 4,87	0,130
BMI	22,80 ± 3,37	22,21 ± 2,46	23,28 ± 3,82	0,244
Bazalni FSH (IU/L)	6,8106 ± 1,7293	7,4075 ± 1,5496	7,377 ± 2,19	0,057
Bazalni LH (IU/L)	6,37 ± 2,52	6,56 ± 1,75	7,75 ± 2,28^{a**b*}	0,005
bFSH/bLH	1,28 ± 0,78	1,18 ± 0,29	1,04 ± 0,46	0,110
Bazalni E2 (pmol/L)	162,32 ± 50,07	161,29 ± 41,31	155,22 ± 42,66	0,713
Bazalni prolaktin [*] (mIU/L)	369,00 (258,50 - 442,74)	330,80 (287,75 - 445,00)	316,50 (214,00 - 386,00)	0,221
Bazalni TSH (mIU/L)	2,34 ± 0,82	2,24 ± 0,68	2,50 ± 0,70	0,249
E2 7. dan ^f (pmol/L)	1916,39 (1544,14 - 2378,36)	1571,99 (1283,49 - 1925,32)	1622,86 (1165,18 - 2260,30)	0,414
Prolaktin 7. dan ^f (mIU/L)	413,27 (373,76 - 456,96)	432,65 (392,27 - 477,20)	422,88 (361,82 - 494,25)	0,834
E2-hCG ^f (pmol/L)	3866,51 (3202,19 - 4668,66)	3017,94 (2499,50 - 3643,90)	2944,33 (2184,72 - 3968,05)	0,124
Prolaktin-hCG (mIU/L)	551,35 ± 180,48	558,54 ± 217,26	572,30 ± 210,26	0,852
Broj antralnih folikula	20,01 ± 6,84	18,55 ± 5,37	19,32 ± 7,87	0,374
Broj oocita	6,98 ± 4,95	6,03 ± 3,58	6,71 ± 5,79	0,441

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD, a usporedba je obavljena ANOVA testom.

^f Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI. Prije statističke analize varijable su logaritamski transformirane.

^{*} Varijable nemaju normalnu raspodjelu i predstavljene su kao medijan, 25 i 75 percentil, a za usporedbu je korišten Kruskall Wallis test.

a – razlika u odnosu na terapiju 1, b – razlika u odnosu na terapiju 2, dokazana primjenom post hoc Tucky testa

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

I u ovoj su analizi koncentracije E2 i prolaktina izmjerene 7. dana korigirane bazalnim vrijednostima, odnosno one izmjerene na dan primjene hCG korigirane su vrijednostima koncentracijama izmjerenim 7. dana COS (tablica 3.5). Osim razlika u geometrijskim

sredinama koncentracija E2 7. dana ciklusa sa COS koje su na granici statističke značajnosti ($p = 0,062$), za ostale parametre nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina koje su primale različitu terapiju. Geometrijske sredine koncentracije E2 7. dana ciklusa sa COS najviše su u skupini T1, nešto niže u skupini T3, a najniže u skupini T2.

Tablica 3.5 Korigirane vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina, izmjerene 7. dan i na dan primjene hCG u odnosu na terapiju

	Skupina T1 n = 109	Skupina T2 n = 64	Skupina T3 n = 38	p
E2 7. dan^f (pmol/L)	3493,63 ± 350,71	2186,66 ± 457,57	2543,43 ± 602,37	0,062
Prolaktin 7. dan, ^f (mIU/L)	462,23 ± 22,18	462,05 ± 28,70	504,47 ± 37,72	0,598
E2-hCG [*] (pmol/L)	5196,02 ± 203,61	4831,1 ± 262,49	4875,8 ± 350,69	0,495
Prolaktin-hCG [*] (mIU/L)	547,26 ± 17,00	559,35 ± 21,91	571,68 ± 28,66	0,747

Prikazane su srednje vrijednosti ± SE, a usporedba je obavljena ANCOVA testom

^f korekcija bazalnim vrijednostima

^{*} korekcija vrijednostima izmjerenim 7. dana

Korištenjem χ^2 testa uspoređena je učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica s različitom terapijom za COS te je utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipa NN između skupina ($p = 0,043$), dok je razlika učestalosti genotipa NS na granici statističke značajnosti ($p = 0,052$) (tablica 3.6). Ispitanica s genotipom NN najmanje je bilo u skupini T3, a najviše u skupini T2. Ispitanica s genotipom NS najmanje je bilo u skupini T2, dok ih je podjednako bilo u skupinama T1 i T3. Ispitanica s genotipom SS bilo je podjednako u sve tri skupine.

Tablica 3.6 Učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica s različitim terapijom za COS

	Skupina T1 n = 109	Skupina T2 n = 64	Skupina T3 n = 38	p
Genotip NN, %	22,0	35,9	15,8	0,043
Genotip NS, %	57,8	39,1	55,3	0,052
Genotip SS, %	20,2	25,0	28,9	0,502

Za usporedbu je korišten χ^2 test.

3.2.3 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu dob

Ispitanice su na temelju dobi podijeljene u 3 skupine: skupina D1 obuhvatila je ispitanice mlađe od 32 godine (n = 63), skupina D2 ispitanice stare 32 – 36 godina (n = 86) i skupina D3 ispitanice starije od 36 godina (n = 62) te su vrijednosti ispitivanih parametara uspoređene između dobnih skupina (tablica 3.7).

Statističkim je analizama utvrđeno da se bazalna koncentracija FSH, koncentracija prolaktina 7. dana terapije, koncentracija estradiola na dan primjene hCG te broj antralnih folikula kao i broj dobivenih oocita značajno razlikuju između definiranih dobnih skupina.

Ustanovljeno je da je srednja vrijednost bazalne koncentracija FSH u dobnoj skupini D2 (32 – 36 god.) statistički značajno veća od srednje vrijednosti u dobnoj skupini D1 (< 32 god.) (p = 0,016), dok je ta razlika između skupina D3 (< 36 god.) i D1 još značajnija (p < 0,001).

Broj antralnih folikula također se značajno razlikuje između dobnih skupina (p < 0,001); najveći je kod mlađih ispitanica, a najmanji kod ispitanica starijih od 36 godina. Statistički značajna razlika utvrđena je između dobne skupine D2 i skupine D1 (p = 0,019) kao i skupine D3 i skupine D1 (p < 0,001), a uočena je i razlika između skupine D3 u odnosu na skupinu D2 (p = 0,04).

Broj dobivenih oocita najmanji je u dobnoj skupini D3, a najveći kod ispitanica mlađih od 32 godine. Statistički značajna razlika utvrđena je između dobne skupine D3 (< 36 god.) i dobne skupine D1 (< 32 god.) (p = 0,002).

Utvrđeno je također da se srednje vrijednosti koncentracija prolaktina izmjerenog 7. dana ciklusa uz kontroliranu stimulaciju jajnika, kao i estradiola na dan primjene hCG kod ispitanica u dobnoj skupini D3 statistički značajno razlikuju od srednjih vrijednosti tih

parametara dobivenih za ispitanice u dobnim skupinama D1 ($p < 0,05$) i D2 ($p < 0,05$) za oba parametra.

Tablica 3.7 Ispitivani parametri u odnosu na dob ispitanica

	Skupina D1 (< 32 god.) n = 63	Skupina D2 ($32 - 36$ god.) n = 86	Skupina D3 (> 36 god.) n = 62	P
BMI	22,69 ± 3,69	22,48 ± 3,05	23,04 ± 2,95	0,580
Bazalni FSH (IU/L)	6,39 ± 1,61	7,17 ± 1,57^{a*}	7,71 ± 1,99^{a***}	<0,001
Bazalni LH (IU/L)	6,30 ± 2,61	6,61 ± 2,20	7,1539 ± 2,1015	0,111
bFSH/bLH	1,26 ± 0,92	1,20 ± 0,46	1,17 ± 0,42	0,674
Bazalni E2 (pmol /L)	150,92 ± 45,14	164,60 ± 46,08	165,27 ± 46,38	0,131
Bazalni prolaktin* (mIU/L)	349,00 (257,75 - 440,00)	338,00 (274,75 - 440,00)	338,00 (255,00 - 440,00)	0,982
Bazalni TSH (mIU/L)	2,25 ± 0,79	2,34 ± 0,77	2,43 ± 0,73	0,437
E2 7. dan ^f (pmol/L)	3176,13 (2199,43 - 4152,83)	3016,19 (2187,91 - 3844,46)	2507,64 (1715,30 - 3299,98)	0,141
Prolaktin 7. dan^f (mIU/L)	515,12 (420,71 - 609,52)	477,33 (430,22 - 524,44)	413,01^{a* b*} (366,61 - 459,37)	0,015
E2-hCG^f (pmol /L)	5761,59 (4420,97 - 7102,21)	5261,71 (4214,81 - 6308,60)	4008,44^{a* b*} (2979,47 - 5037,42)	0,006
Prolaktin-hCG (mIU/L)	573,39 ± 181,60	574,01 ± 210,77	517,54 ± 189,20	0,168
Broj antralnih folikula	22,17 ± 7,45	19,35 ± 5,57^{a*}	16,79 ± 6,09^{a*** b*}	<0,001
Broj oocita	8,19 ± 6,14	6,54 ± 4,07	5,21 ± 3,40^{a***}	0,002

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD, a usporedba je obavljena ANOVA testom.

^f Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI. Prije statističke analize varijable su logaritamski transformirane.

* Varijable nemaju normalnu raspodjelu i predstavljene su kao medijan, 25 i 75 percentil, a za usporedbu je korišten Kruskal Wallis test.

a – razlika u odnosu na skupinu 1 (< 32 god.), b – razlika u odnosu na skupinu 2 ($32 - 36$ god.), dokazana primjenom post hoc Tucky testa

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

I za ovu su analizu vrijednosti koncentracije E2 i prolaktina izmjerene 7. dana korigirane bazalnim vrijednostima, odnosno one izmjerene na dan primjene hCG korigirane su vrijednostima koncentracijama izmjerenim 7. dana COS (tablica 3.8).

Tablica 3.8 Korigirane vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina, izmjerene 7. dan i na dan primjene hCG u odnosu na dob ispitanica

	Skupina D1 (< 32 god.) n = 63	Skupina D2 (32 – 36 god.) n = 86	Skupina D3 (> 36 god.) n = 62	P
E2 7. dan ^f (pmol /L)	3202,50 ± 467,24	3005,78 ± 395,48	2495,45 ± 468,46	0,542
Prolaktin 7. dan, ^f (mIU/L)	503,53 ± 28,92	482,12 ± 24,59	418,06 ± 29,13	0,095
E2-hCG* (pmol /L)	5454,06 ± 264,47	5142,53 ± 224,92	4488,16 ± 266,88^{a*}	0,033
Prolaktin-hCG* (mIU/L)	555,08 ± 20,79	570,95 ± 17,62	540,43 ± 21,00	0,535

Prikazane su srednje vrijednosti ± SE, a usporedba je obavljena ANCOVA testom

^f korekcija bazalnim vrijednostima

* korekcija vrijednostima izmjerenim 7. dana

a – razlika u odnosu na skupinu 1 (< 32 god.), dokazana primjenom post hoc Tucky testa

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Nakon korekcije statistički značajna razlika između skupina uočena je samo za srednje vrijednosti koncentracije estradiola na dan primjene hCG između dobne skupine D3 (> 36 god.) i skupine D1 (< 32 god.), dok razlike u koncentracijama prolaktina izmjerenog 7. dana između skupina više nisu bile statistički značajne.

Kako bi se ispitala učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica različite dobi, korišten je χ^2 test (tablica 3.9). Premda nije utvrđena statistički značajna razlika po genotipovima za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica podijeljenim prema dobi, uočeno je da je razlika učestalosti genotipova NS i SS u skupini D3, u odnosu na skupinu D1 na granici statističke značajnosti (p = 0,053 i 0,063).

Ispitanica s genotipom NN najmanje je bilo u skupini D2, a najviše u skupini T1(D1?). Ispitanica s genotipom NS najmanje je bilo u skupini D1, a najviše u skupini D3. Ispitanica s genotipom SS bilo je podjednako u skupinama D1 i D2, a upola manje u skupini D3.

Tablica 3.9 Učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica različite dobi

	Skupina D1 (< 32 god.) n = 63	Skupina D2 (32 – 36 god.) n = 86	Skupina D3 (> 36 god.) n = 62	P
Genotip NN, %	33,3	19,8	24,2	0,165
Genotip NS, %	41,3	51,2	62,9	0,053
Genotip SS, %	25,4	29,0	12,9	0,063

Za usporedbu je korišten χ^2 test.

3.2.4 Vrijednosti demografskih i biokemijskih parametara u ispitivanoj populaciji u odnosu na broj dobivenih oocita

Broj dobivenih oocita glavni je kriterij uspješnosti postupka kontrolirane stimulacije jajnika, pa je provedena analiza vrijednosti ispitivanih parametara u skupinama ispitanica koje su definirane na temelju broja dobivenih oocita: skupina O1 0 - 3 oocite, skupina O2 4-9 oocita i skupina O3 ≥ 10 dobivenih oocita (tablica 3.10).

Rezultati statističkih analiza pokazali su da značajne razlike između skupina postoje u dobi ispitanica, indeksu tjelesne mase, bazalnoj koncentraciji FSH, estradiola, prolaktina i THS, broju antralnih folikula te koncentraciji prolaktina i estradiola 7. dana kontrolirane stimulacije jajnika, kao i na dan primjene hCG.

Srednja vrijednost dobi ispitanica statistički je značajno niža u skupini O2 ($p < 0,001$) i skupini O3 ($p < 0,001$) u odnosu na skupinu O1, koja ima najvišu srednju vrijednost godina ($36,27 \pm 4,38$). Niže srednje vrijednosti bazalne koncentracije FSH utvrđene su također u skupinama O2 i O3 u odnosu na skupinu O1 (O2 : O1, $p = 0,014$; O3 : O1, $p = 0,008$). Također, srednja vrijednost indeksa tjelesne mase u skupini O2 statistički je značajno niža u odnosu na srednju vrijednost BMI u skupini O1 ($p = 0,018$). Slični su rezultati dobiveni i za bazalnu koncentraciju estradiola ($p = 0,01$) i THS ($p = 0,006$). Iznimno značajna statistička razlika ($p < 0,001$) između skupina O2 i O3 u odnosu na skupinu O1, kao i u skupini O3 u odnosu na skupinu O2 utvrđena je analizom broj antralnih folikula te je uočeno da je broj antralnih folikula najmanji u skupini O1, a najveći u skupini O3. Srednje vrijednosti koncentracija estradiola i prolaktina izmjerene 7. dana kontrolirane stimulacije jajnika kao i one na dan primjene hCG statistički se značajno razlikuju između skupina ($p < 0,001$); najniže su u skupini O1, a najviše u skupini O3.

Tablica 3.10 Vrijednosti ispitivanih parametara u odnosu na broj dobivenih oocita

	Skupina O1 (0 - 3 oocite) n = 47	Skupina O2 (4 - 9 oocita) n = 114	Skupina O3 (≥ 10 oocita) n = 50	P
Dob (godine)	36,27 ± 4,38	33,77 ± 4,07^{a***}	32,58 ± 3,44^{a***}	<0,001
BMI	23,87 ± 4,34	22,33 ± 2,58^{a*}	22,47 ± 3,13	0,018
Bazalni FSH (IU/L)	7,71 ± 2,19	7,04 ± 1,59	6,65 ± 1,67^{a**}	0,011
Bazalni LH (IU/L)	7,02 ± 2,38	6,42 ± 2,09	6,9638 ± 2,68	0,197
bFSH/bLH	1,33 ± 1,02	1,21 ± 0,44	1,0973 ± 0,45	0,190
Bazalni E2 (pmol /L)	180,23 ± 46,77	151,95 ± 38,56^{a***}	162,60 ± 55,67	0,002
Bazalni prolaktin[•] (mIU/L)	391,60 (292,64 - 461,46)	320,00^{a*} (257,50 - 398,50)	372,80 (88,000 – 452,00)	0,048
Bazalni TSH (mIU/L)	2,62 ± 0,69	2,22 ± 0,73^{a**}	2,35 ± 0,84	0,009
E2 7. dan^f (pmol/L)	723,61 (572,60 - 914,44)	1791,22^{a*} (1534,53 - 2090,84)	3817,82^{a*** b***} (2919,02 - 4993,37)	<0,001
Prolaktin 7. dan^f (mIU/L)	348,56 (284,37 - 427,23)	417,914 (391,131 - 446,53)	510,582^{a** b*} (453,941 - 574,29)	<0,001
E2-hCG^f (pmol /L)	1180,81 (955,76 - 1458,85)	3587,43^{a***} (3213,44 - 4004,94)	8492,66^{a*** b***} (7221,50 - 9987,57)	<0,001
Prolaktin-hCG (mIU/L)	492,30 ± 206,11	534,21 ± 164,61	671,55 ± 213,41^{a*** b***}	<0,001
Broj antralnih folikula	13,79 ± 5,63	19,53 ± 4,95^{a***}	24,54 ± 6,74^{a*** b***}	<0,001

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD, a usporedba je obavljena ANOVA testom.

^f Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI. Prije statističke analize varijable su logaritamski transformirane.

[•] Varijable nemaju normalnu raspodjelu i predstavljene su kao medijan, 25 i 75 percentil, a za usporedbu je korišten Kruskall Wallis test.

a – razlika u odnosu na skupinu O1 (0 – 3 oocite), b – razlika u odnosu na skupinu O2 (4 – 9 god.), dokazana primjenom post hoc Tucky testa ili Mann Whitney tets za bazalni prolaktin.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

I za ovu su analizu vrijednosti koncentracije E2 i prolaktina izmjerene 7. dana korigirane bazalnim vrijednostima, odnosno one izmjerene na dan primjene hCG korigirane su vrijednostima koncentracijama izmjerenim 7. dana COS (tablica 3.11).

Tablica 3.11 Korigirane vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina, izmjerene 7. dan i na dan primjene hCG u odnosu na dob ispitanica

	Skupina O1 (0 - 3 oocite) n = 47	Skupina O2 (4 - 9 oocita) n = 114	Skupina O3 (≥ 10 oocita) n = 50	P
E2, 7. dan^f (pmol/L)	883,23 ± 493,58	2592,63 ± 312,29^{a*}	5566,26 ± 468,82^{a*** b***}	<0,001
Prolaktin 7. dan,^f (mIU/L)	400,97 ± 33,19	459,55 ± 21,09	557,84 ± 31,88^{a** b*}	0,003
E2-hCG[*] (pmol/L)	3543,23 ± 269,54	4713,56 ± 166,62^{a***}	7213,61 ± 270,58^{a*** b***}	<0,001
Prolaktin-hCG[*] (mIU/L)	502,67 ± 23,02	544,12 ± 14,74	639,02 ± 22,5782^{a*** b**}	<0,001

Prikazane su srednje vrijednosti ± SE, a usporedba je obavljena ANCOVA testom

^f korekcija bazalnim vrijednostima

^{*} korekcija vrijednostima izmjerenim 7. dana

a – razlika u odnosu na skupinu 1 (< 32 god.), dokazana primjenom post hoc Tucky testa

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Nakon korekcije uočene su statistički značajne razlike srednjih vrijednosti koncentracija svih parametara ($p < 0,001$). Srednje vrijednosti E2 izmjerene 7. dana korigirane bazalnim vrijednostima statistički su značajno više kod ispitanica u skupini O3 ($p < 0,001$) i skupini O2 ($p = 0,012$) u odnosu na skupinu O1, koja ima najnižu srednju vrijednost koncentracije E2 izmjerene 7. dana. Dokazana je statistički značajna razlika i između skupina O3 i O2 ($p < 0,001$). Koncentracija E2 na dan primjene hCG korigirana vrijednostima izmjerenim 7. dana značajno je različita između svih skupina ($p < 0,001$). Srednja vrijednost koncentracija prolaktina 7. dana korigiranih bazalnim vrijednostima značajno je viša u skupini O3 u odnosu na skupinu O1 ($p = 0,002$) i O2 ($p = 0,032$), dok je srednja vrijednost koncentracija prolaktina izmjerena na dan primjene hCG korigiranih koncentracijama prolaktina 7. dana također značajno veća u skupini O3 u odnosu na skupine O1 ($p < 0,001$) i O2 ($p = 0,002$).

Za usporedbu učestalosti genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica s različitim brojem dobivenih oocita, korišten je χ^2 test (tablica 3.12), ali nije uočena statistički značajna razlika između skupina, odnosno sva tri genotipa podjednako su zastupljena u sve 3 skupine.

Tablica 3.12 Učestalost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u skupinama ispitanica s različitim brojem dobivenih oocita

	Skupina O1 (0 - 3 oocite) n = 47	Skupina O2 (4 - 9 oocita) n = 114	Skupina O3 (≥ 10 oocita) n = 50	P
Genotip NN, %	21,3	26,3	26,0	0,788
Genotip NS, %	48,9	52,6	52,0	0,912
Genotip SS, %	29,8	21,1	22,0	0,477

Za usporedbu je korišten χ^2 test.

Kako bi se ispitalo postoji li razlika u broju oocita između ispitanica s različitim genotipom za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ukoliko se u obzir uzme i utjecaj dobi, indeksa tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, omjera bFSH/bLH i terapije učinjena je dvofaktorska ANOVA analiza te je ispitanost postoji li interakcija dva faktora od nabrojanih na broj dobivenih oocita.

U prvom je koraku ispitan utjecaj genotipa i dobi ispitanica na broj oocita te je dokazana interakcija ova dva faktora ($p = 0,004$). Utvrđeno je da ispitanice starije životne dobi (< 36 god) neovisno o genotipu imaju najmanji broj oocita, a da ispitanice iz skupine D1 (< 32 god.) imaju najveći broj oocita ukoliko imaju genotip SS (11,6) (tablica 3.13).

Tablica 3.13 Utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i dobi ispitanica na broj oocita

Genotip	Dob	n	Srednja vrijednost	SE
NN	Skupina D1 (< 32 god.)	21	6,0	0,98
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	17	7,2	1,09
	Skupina D3 (> 36 god.)	15	5,4	1,16
NS	Skupina D1 (< 32 god.)	26	7,7	0,88
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	44	6,9	0,67
	Skupina D3 (> 36 god.)	39	4,9	0,72
SS	Skupina D1 (< 32 god.)	16	11,6	1,12
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	25	5,3	0,90
	Skupina D3 (> 36 god.)	8	6,2	1,59

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Sljedećom je analizom ispitan utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i indeksa tjelesne mase na broj dobivenih oocita. Ispitanice su prema BMI podjeljene u 2 skupine: skupina B1 obuhvatila je ispitanice s BMI \leq 25 (normalna tjelesna masa), a skupina B2 one čiji je BMI $>$ 25 (prekomjerna tjelesna masa). Dokazana je interakcija ova dva faktora ($p = 0,030$) te je utvrđeno je da je u skupinama ispitanica koje su homozigoti, bilo s genotipom NN ili SS broj dobivenih oocita veći kod ispitanica s normalnom tjelesnom masom, dok je kod ispitanica s genotipom NS broj oocita veći kod onih čiji je BMI $>$ 25 (tablica 3.14).

Tablica 3.14 Utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i BMI ispitanica na broj oocita

Genotip	BMI	n	Srednja vrijednost	SE
NN	Skupina B1 (\leq 25)	43	6,4	0,71
	Skupina B2 ($>$ 25)	10	5,2	1,47
NS	Skupina B1 (\leq 25)	95	6,3	0,47
	Skupina B2 ($>$ 25)	14	7,1	1,25
SS	Skupina B1 (\leq 25)	40	8,4	0,73
	Skupina B2 ($>$ 25)	9	3,4	1,55

Ispitan je također utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i bazalne koncentracije FSH na broj dobivenih oocita. Ispitanice su na osnovi bazalne koncentracije FSH podjeljene u 2 skupine: skupinu F1 čija je bazalna koncentracija FSH bila ≤10 IU/L, odnosno skupinu F2 čija je bazalna koncentracija FSH bila >10 IU/L. Dvofaktorskom ANOVA analizom nije utvrđena interakcija između bazalne koncentracije FSH i genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ na broj oocita (p = 0,310) (tablica 3.15).

Vrijednost bazalne koncentracije FSH >10 IU/L kao granična vrijednost (eng. *cutt off*) uzeta je na temelju literaturnih podataka (Caroppo i sur., 2006), što je za posljedicu imalo mali broj ispitanica u toj skupini.

Tablica 3.15 Utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i bazalne koncentracije FSH ispitanica na broj oocita

Genotip	Bazalna konc. FSH	n	Srednja vrijednost	SE
NN	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	50	6,2	0,66
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	3	6,6	2,71
NS	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	101	6,6	0,46
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	8	3,5	1,66
SS	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	46	7,8	0,69
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	3	2,3	2,71

Prikazane su srednje vrijednosti ± SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Ispitan je utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i omjera bazalnih koncentracija FSH i LH (bFSH/bLH) na broj dobivenih oocita. Ispitanice su na osnovi omjera bFSH/bLH podijeljene u dvije skupine: ispitanice kojima je omjer bFSH/bLH ≤1 činile su skupinu FL1, one čiji je omjer bFSH/bLH >1 skupinu FL2. Dvofaktorskom ANOVA analizom nije utvrđena interakcija između bazalne koncentracije FSH i genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ na broj oocita (p = 0,714) (tablica 3.16).

Važno je naglasiti da je broj ispitanica u skupinama F2 u kojima je omjer bFSH/bLH >1, neovisno o genotipu, bio iznimno malen.

Tablica 3.16 Utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i omjera bazalnih koncentracija FSH ispitanica na broj oocita

Genotip	bFSH/bLH	n	Srednja vrijednost	SE
NN	Skupina FL1 (≤ 1)	50	6,2	0,66
	Skupina FL2 (> 1)	3	6,6	2,71
NS	Skupina FL1 (≤ 1)	101	6,6	0,46
	Skupina FL2 (> 1)	8	3,5	1,66
SS	Skupina FL1 (≤ 1)	46	7,8	0,69
	Skupina FL2 (> 1)	3	2,3	2,71

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Kako bi se ispitalo postoji li interakcija genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ispitanica i terapije za kontroliranu stimulaciju jajnika korištena je dvofaktorskom ANOVA analiza. Na temelju primjenjene terapije ispitanice su podijeljene u tri skupine (poglavlje 2.1): skupina T1, skupina T2, a skupina T3. Interakcija između vrste terapije i genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ na broj dobivenih oocita nije utvrđena ($p = 0,148$) (tablica 3.17).

Tablica 3.17 Utjecaj genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ispitanica i terapije na broj oocita

Genotip	Terapija	n	Srednja vrijednost	SE
NN	Skupina T1	24	5,9	0,96
	Skupina T2	23	6,9	0,98
	Skupina T3	6	4,6	1,92
NS	Skupina T1	63	6,8	0,59
	Skupina T2	25	5,6	0,94
	Skupina T3	21	5,9	1,03
SS	Skupina T1	22	8,3	1,00
	Skupina T2	16	5,2	1,18
	Skupina T3	11	9,2	1,42

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Kako bi se ispitala interakcija između primijenjene terapije i pojedinog čimbenika na broj dobivenih oocita, kao i u prethodnim analizama korišten je dvofaktorski ANOVA test.

Utvrđeno je da se, neovisno o dobi ispitanica, broj oocita nije statistički značajno razlikovao u skupinama koje su primale različitu terapiju za kontroliranu stimulaciju jajnika, odnosno nije dokazana interakcija vrste terapije i dobi ispitanica na broj dobivenih oocita ($p = 0,166$). Zapaženo je da je u najmlađoj dobnoj skupini D1 broj oocita bio najveći ukoliko su bile na terapiji 3 (tablica 3.18).

Tablica 3.18 Utjecaj terapije i dobi ispitanica na broj oocita

	Dob	n	Srednja vrijednost	SE
Terapija 1	Skupina D1 (< 32 god.)	37	8,3	0,75
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	42	6,7	0,70
	Skupina D3 (> 36 god.)	30	5,6	0,83
Terapija 2	Skupina D1 (< 32 god.)	17	6,2	1,11
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	32	6,1	0,81
	Skupina D3 (> 36 god.)	16	5,5	1,14
Terapija 3	Skupina D1 (< 32 god.)	9	11,2	1,53
	Skupina D2 (32 - 36 god.)	13	6,6	1,27
	Skupina D3 (> 36 god.)	16	4,1	1,14

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Analizom interakcije vrste terapije i indeksa tjelesne mase ispitanica na broj dobivenih oocita utvrđeno je da se broj oocita nije statistički značajno razlikovao ($p = 0,914$) između skupina ispitanica koje su primale različitu terapiju za COS (tablica 3.19).

Tablica 3.19 Utjecaj terapije i indeksa tjelesne mase ispitanica na broj oocita

	BMI	n	Srednja vrijednost	SE
Terapija 1	Skupina B1 (≤ 25)	89	7,1	0,50
	Skupina B2 (> 25)	20	6,0	1,06
Terapija 2	Skupina B1 (≤ 25)	59	6,2	0,61
	Skupina B2 (> 25)	6	4,1	1,93
Terapija 3	Skupina B1 (≤ 25)	31	7,0	0,85
	Skupina B2 (> 25)	7	5,2	1,79

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Utvrđeno je, također da ne postoji interakcija između vrste terapije i bazalne koncentracije FSH na broj dobivenih oocita ($p = 0,421$), odnosno neovisno o bazalnoj koncentraciji FSH, broj dobivenih oocita se nije statistički značajno razlikovao između skupina u kojima je primjenjena različita terapija za COS (tablica 3.20). I u ovoj je analizi kao granična vrijednost koncentracije bFSH uzeta >10 IU/L (Caroppo i sur., 2006), tako da je u skupinama F2 bio mali broj ispitanica.

Tablica 3.20 Utjecaj terapije i bazalne razine FSH ispitanica na broj oocita

	Bazalna konc. FSH	n	Srednja vrijednost	SE
Terapija 1	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	104	7,1	0,46
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	5	3,6	2,10
Terapija 2	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	61	6,0	0,60
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	4	5,7	2,35
Terapija 3	Skupina F1 (≤ 10 IU/L)	33	7,3	0,81
	Skupina F2 (> 10 IU/L)	5	2,8	2,10

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Također, neovisno o vrijednosti omjera bFSH/bLH ispitanica, broj oocita se nije značajno razlikovao između skupina ispitanica kod kojih je primjenjena različita terapija za COS. Nije dokazana interakcija vrste terapije i omjera bFSH/bLH ($p = 0,156$) (tablica 3.21).

Tablica 3.21 Utjecaj terapije i omjera bazalnih razina FSH i LH na broj oocita

	bFSH/bLH	n	Srednja vrijednost	SE
Terapija 1	Skupina FL1 (≤ 1)	35	7,1	0,79
	Skupina FL2 (> 1)	74	6,9	0,54
Terapija 2	Skupina FL1 (≤ 1)	20	5,8	1,05
	Skupina FL2 (> 1)	45	6,1	0,70
Terapija 3	Skupina FL1 (≤ 1)	19	8,3	1,08
	Skupina FL2 (> 1)	19	5,0	1,08

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

3.3 Korelacija vrijednosti određivanih parametara s brojem oocita

Kako bi se ispitalo postoji li korelacija određivanih parametara i broja dobivenih oocita učinjena je linearna regresijska analiza (tablica 3.22).

Od parametara određivanih u ciklusu koji prethodi COS u korelaciji s brojem oocita i to obrnutoj, su dob, BMI i bazalna koncentracija FSH, dok je broj antralnih folikula u izravnoj korelaciji. Od parametara određivanih 7. dana ciklusa s COS samo je koncentracija E2 u korelaciji s brojem oocita. Uz to, s porastom koncentracija prolaktina i E2 određenih na dan primjene hCG raste i broj oocita. Najjača korelacija između broja oocita i ispitivanih parametara dokazana je za koncentraciju E2 određenu na dan primjene hCG ($r = 0,734$) i broj antralnih folikula ($r = 0,646$), uz statističku značajnost $p < 0,05$.

Tablica 3.22 Korelacija ispitivanih parametara s brojem oocita

	Broj oocita	
	r	p
Dob (godine)	-0,288	<0,001
BMI	-0,151	0,028
Bazalni FSH (IU/L)	-0,164	0,017
Bazalni LH (IU/L)	0,029	0,678
Bazalni E2* (pmol/L)	-0,075	0,275
Bazalni prolaktin (mIU/L)	-0,049	0,478
Bazalni TSH (mIU/L)	-0,035	0,609
E2 7. dan (pmol /L)	0,533	<0,001
Prolaktin 7. dan (mIU/L)	0,109	0,113
E2-hCG* (pmol /L)	0,734	<0,001
Prolaktin-hCG (mIU/L)	0,288	<0,001
Broj antralnih folikula	0,646	<0,001

Jačina veze između varijabli testirana je Pearson korelacijskom analizom. Za svaku skupinu podataka ispitana je raspodjela te su varijable, ukoliko je bilo potrebno, logaritamski transformirane u normalnu raspodjelu. * Vrijednosti su prije statističke analize logaritamski transformirane.

Promatrana je i veza ispitivanih parametara s brojem oocita u skupinama ispitanica podijeljenih na osnovi genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰. Učinjena je također multipla linearna regresija te je promatrano koji su parametri u neovisnoj vezi s brojem oocita unutar svake skupine ispitanica s različitim genotipom. U posebnoj su analizi promatrani parametri koji su određivani u ciklusu prije COS i parametri određivani u ciklusu s COS. U obzir su uzete varijable za koje je univarijantnom analizom utvrđeno da su u korelaciji s brojem oocita (tablica 3.22).

U skupini ispitanica s genotipom NN u korelaciji s brojem dobivenih oocita su broj antralnih folikula te koncentracija E2 7. dana COS, koncentracija E2 i prolaktina na dan primjene hCG (tablica 3.23). Parametri određivani u ciklusu s COS, a koji su u značajnoj korelaciji s brojem oocita u univarijantnoj analizi, zajedno objašnjavaju varijabilnost u broju oocita od 59,8% ($R = 0,773$, $p < 0,001$). Jedini neovisni prediktor visokog broja oocita u ovoj skupini određivanih parametara je koncentracija E2 određena na dan primjene hCG ($\beta = 7,538$, $p < 0,001$, $VIF = 2,701$).

U skupini ispitanica s genotipom NS u korelaciji s brojem dobivenih oocita su dob ispitanica, bazalna koncentracija FSH, broj antralnih folikula, koncentracije E2 i prolaktina određene 7. dana COS, te koncentracije E2 i prolaktina određene na dan primjene hCG. Parametri određivani u ciklusu koji prethodi COS, a koji su u vezi sa brojem oocita zajedno objašnjavaju varijabilnost u broju oocita od 30,5% ($R = 0,553$, $p < 0,001$). Jedini neovisni prediktor visokog broja oocita u ovoj skupini je broj antralnih folikula ($\beta = -0,302$, $p < 0,001$, $VIF = 1,264$). Parametri određivani u ciklusu s COS, a koji su u vezi s brojem oocita zajedno objašnjavaju varijabilnost u broju oocita od 60,9% ($R = 0,780$, $p < 0,001$). Jedini neovisni prediktori broja oocita u ovoj skupini su koncentracija E2 izmjerena 7. dana COS ($\beta = -0,000101$, $p < 0,001$, $VIF = 4,933$) i koncentracija E2 određena na dan primjene hCG ($\beta = 0,00123$, $p < 0,001$, $VIF = 4,902$).

U skupini ispitanica s genotipom SS u korelaciji s brojem dobivenih oocita su dob ispitanica, indeks tjelesne mase, broj antralnih folikula, koncentracija estradiola 7. dana COS te na dan primjene hCG. Parametri koji su u vezi s brojem oocita prije primjene COS zajedno objašnjavaju varijabilnost u broju oocita od 68,9% ($R = 0,830$, $p < 0,001$). Jedini neovisni prediktori visokog broja oocita u ovoj skupini su broj antralnih folikula ($\beta = 0,562$, $p < 0,001$, $VIF = 1,159$) i indeks tjelesne mase ($\beta = -0,435$, $p = 0,002$, $VIF = 1,021$). Parametri koji su u vezi s brojem oocita nakon primjene COS zajedno objašnjavaju varijabilnost u broju oocita od 73% ($R = 0,854$, $p < 0,001$). Oba su neovisni prediktori broja oocita u ovoj skupini. Za koncentraciju E2 izmjerenu 7. dana COS je $\beta = -0,000106$, $p < 0,001$ a za koncentraciju E2 izmjerenu na dan primjene hCG je $\beta = 0,00163$, $p < 0,001$, a $VIF = 6,149$.

Tablica 3.23 Korelacija ispitivanih parametara s brojem oocita u skupinama s različitim genotipom

	Genotip NN (n = 53)		Genotip NS (n = 109)		Genotip SS (n = 49)	
	r	p	r	p	r	p
Dob (godine)	-0,160	0,253	-0,300	0,002	-0,368	0,009
BMI	-0,067	0,631	0,015	0,881	-0,409	0,004
Bazalni FSH (IU/L)	0,049	0,725	-0,295	0,002	-0,200	0,168
Bazalni LH (IU/L)	0,094	0,502	-0,051	0,598	-0,032	0,829
Bazalni E2* (pmol/L)	0,156	0,265	-0,185	0,055	-0,040	0,787
Bazalni prolaktin (mIU/L)	-0,139	0,320	-0,113	0,242	0,179	0,219
Bazalni TSH (mIU/L)	-0,201	0,150	-0,019	0,842	-0,102	0,487
E2 7. dan (pmol /L)	0,595	<0,001	0,436	0,000	0,475	0,001
Prolaktin 7. dan (mIU/L)	0,007	0,962	0,249	0,009	0,107	0,463
E2-hCG* (pmol /L)	0,773	<0,001	0,66	0,000	0,770	0,000
Prolaktin-hCG (mIU/L)	0,401	0,003	0,274	0,004	0,183	0,209
Broj antralnih folikula	0,630	<0,001	0,534	<0,001	0,771	<0,001

Jačina veze između varijabli testirana je Pearson korelacijskom analizom. Za svaku skupinu podataka ispitana je raspodjela te su varijable, ukoliko je bilo potrebno, logaritamski transformirane u normalnu raspodjelu. *Vrijednosti su prije statističke analize logaritamski transformirane.

3.4 Prediktivne vrijednosti ispitivanih parametara za COS

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i identificirati potencijalne parametre na temelju kojih bi bilo moguće predvidjeti odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju hormonskom terapijom prije njezine primjene, odnosno na temelju parametara dobivenih tijekom ciklusa koji prethodi COS. Uz te bazalne parametre, ispitano je jesu li i u kojoj mjeri vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina 7. dana stimulacije, odnosno na dan primjene hCG prediktori broja dobivenih oocita.

U tom je smislu napravljena analiza kojom se pokušalo identificirati prediktore lošeg odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika.

Za potrebe ove analize ispitanice su definirane kao „*poor responders*“ ukoliko je broj dobivenih oocita bio ≤ 3 , dok su ostale definirane kao „*normal responders*“. Učinjena je

univarijntna logistička regresijska analiza, a rezultati su prikazani u tablici 3.24. Dobiveni podaci upućuju na zaključak da s dobi, porastom BMI i porastom bazalnih koncentracija FSH, E2 i TSH raste i vjerojatnost da će ispitanice imati lošiji odgovor na COS u odnosu na mlađe ispitanice, one s manjim BMI i nižim koncentracijama navedenih bazalnih parametara. Također, koncentracija E2 7. dana COS te koncentracije E2 i prolaktina na dan primjene hCG, kao i broj antralnih folikula u obrnutoj su korelaciji s odgovorom jajnika na COS. Svaka jedinica povećanja koncentracije E2 7. dan i koncentracija E2 na dan primjene hCG u vezi su s 1% redukcije u vjerojatnosti za pojavu lošeg odgovora na stimulaciju (OR: 0,999; 95% CI 0,998 – 0,999, $p < 0,001$), dok je koncentracija prolaktina na dan primjene hCG u vezi s 2% (OR: 0,998; 95% CI 0,996 – 0,999, $p < 0,001$), a broj antralnih folikula s 35% (OR: 0,765; 95% CI 0,700 – 0,837, $p < 0,001$) redukcije u vjerojatnosti za pojavu lošeg odgovora na stimulaciju jajnika.

Tablica 3.24 Omjeri vjerojatnosti za loš odgovor na COS

Varijable	OR (95% CI)	p
Dob (godine)	1,184 (1,089 - 1,288)	<0,001
BMI	1,135 (1,035 - 1,246)	0,007
Bazalni FSH (IU/L)	1,285 (1,067 - 1,547)	0,008
Bazalni LH (IU/L)	1,085 (0,943 - 1,249)	0,256
bFSH/bLH	1,406 (0,349- 2,299)	0,174
Bazalni E2 (pmol/L)	1,012 (1,004 - 1,020)	0,002
Bazalni prolaktin (mIU/L)	1,002 (1,000 - 1,003)	0,069
Bazalni TSH (mIU/L)	1,831 (1,190 - 2,818)	0,006
E2 7. dan (pmol /L)	0,999 (0,998 - 0,999)	<0,001
Prolaktin 7. dan (mIU/L)	0,999 (0,998 - 1,001)	0,429
E2-hCG (pmol /L)	0,999 (0,998 - 0,999)	<0,001
Prolaktin-hCG (mIU/L)	0,998 (0,996 - 0,999)	0,011
Broj antralnih folikula	0,765 (0,700 - 0,837)	<0,001
Genotip NN	0,761 (0,349 - 1,660)	0,492
Genotip NS	0,869 (0,454 - 1,663)	0,672
Genotip SS	1,564 (0,755 - 3,239)	0,229

Univarijntna logistička regresijska analiza

Kako bi se utvrdilo koji su od identificiranih prediktora lošeg odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju jajnika istovremeno i neovisni prediktori, učinjena je multipla logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

Prvi je model formiran od varijabli koje su u značajnoj vezi s lošim odgovorom na stimulaciju, a čije su vrijednosti poznate prije primjene terapije. To su dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, estradiola i TSH te broj antralnih folikula. Rezultati upućuju da su neovisni prediktori lošeg odgovora na COS dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, estradiola i broj antralnih folikula (tablica 3.25). Nagelkerke koeficijent determinacije iznosi 0,493 ($R^2 = 0,493$) što znači da ove neovisne varijable zajedno objašnjavaju pojavu lošeg odgovora jajnika na COS od 49,3% (slika 3.6).

Tablica 3.25 Omjeri vjerojatnosti za loš odgovor na COS

Varijable	OR (95% CI)	p
Dob (godine)	1,150 (1,053-1,267)	0,002
BMI	1,198 (1,065-1,347)	0,003
Bazalni FSH	1,293 (1,026-1,630)	0,030
Bazalni E2	1,017 (1,007-1,026)	0,001
Broj antralnih folikula	0,744 (0,672-0,823)	<0,001

Multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije

Za svaki od bazalnih parametara ispitana je dijagnostička sposobnost u razdvajanju žena s lošim odgovorom na stimulaciju jajnika (*poor responder*) i žena s dobrim/normalnim odgovorom na stimulaciju jajnika (tablica 3.25). Samo broj antralnih folikula ima prihvatljivu sposobnost za identifikaciju *poor respondera* jer je dobivena $AUC > 0,7$ tj $AUC = 0,838$. Bazalne koncentracije FSH, E2 i TSH imaju slabu dijagnostičku točnost, dok BMI i bazalni prolaktin nemaju statistički značajnu točnost u razdvajanju žena sa dobrim i lošim odgovorom na stimulaciju jajnika.

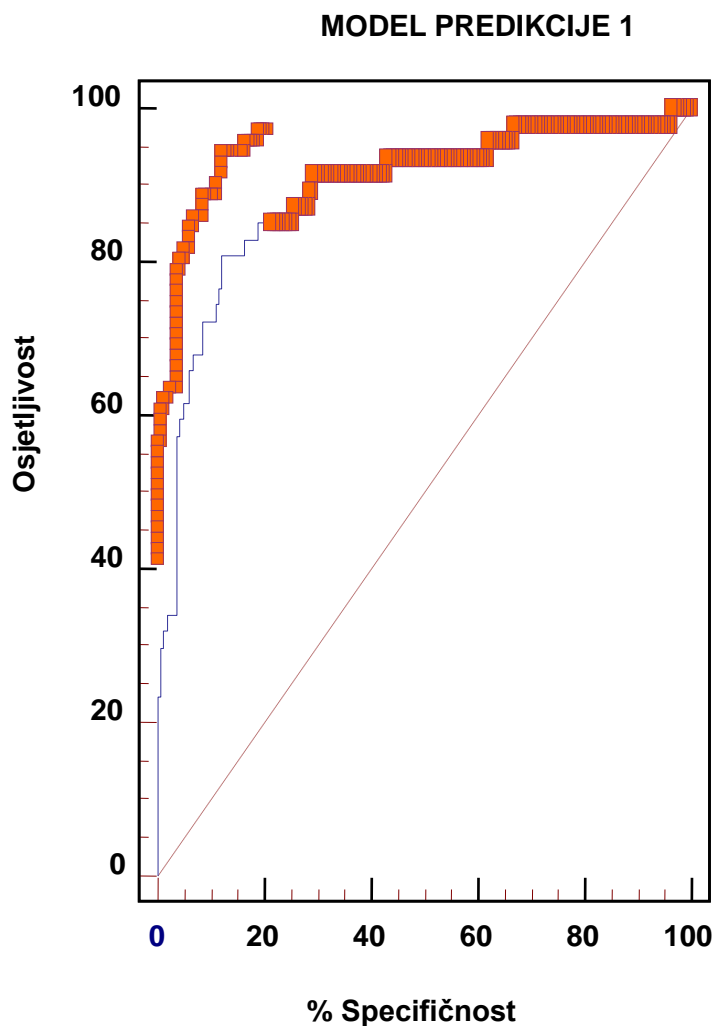
Osjetljivosti i specifičnosti za optimalne "cut off" vrijednosti ispitivanih parametara najbolje su za broj antralnih folikula (tablica 3.24). Premda je specifičnost bazalne koncentracije TSH mala (0,56) njegova osjetljivost je 0,70, dok je obrnuto za bazalnu koncentraciju FSH (0,55 osjetljivost i 0,70 specifičnost). Bazalna koncentracija E2 ima gotovo izjednačene vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti (oko 0,70) (tablica 3.26).

Tablica 3.26 AUC vrijednosti parametara određenih u ciklusu koji prethodi COS za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	<i>cut off</i>	Osjetljivost %	Specifičnost %
Dob (godine)	0,680*	0,0438	0,613 - 0,742	38	38,3	89,09
BMI	0,596	0,0491	0,527 - 0,663	22,57	48,94	73,33
Bazalni FSH	0,620*	0,0511	0,551 - 0,686	7,6	55,32	69,7
Bazalni LH	0,573	0,0484	0,504 - 0,641	8,1	38,3	78,18
Bazalni E2	0,680*	0,0451	0,613 - 0,742	174	71,4	70,30
Bazalni prolaktin	0,588	0,0463	0,519 - 0,655	386	53,19	66,67
Bazalni TSH	0,653*	0,0455	0,585 - 0,717	2,22	70,21	55,76
Broj antralnih folikula	0,838*	0,0372	0,781 - 0,885	17	73,33	85,11

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * $p < 0,05$

S obzirom da dijagnostička točnost pojedinačnih parametara nije velika, ispitivana je i sposobnost različitih modela sastavljenih od više varijabli u razdvajanju žena s dobrim i lošim odgovorom na stimulaciju jajnika. Dijagnostička točnost modela sastavljenog od parametara čije su vrijednosti poznate prije stimulacije, a koji su u nezavisnoj korelaciji s lošim odgovorom (dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, estradiola i TSH te broj antralnih folikula) predstavljena je u tablici 3.24. Utvrđeno je da je zajednička dijagnostička točnost veća od pojedinačne (AUC = 0,889; SE = 0,0306; 95% CI = 0,839 - 0,928; $p < 0,0001$) (slika 3.2).



Slika 3.2 Model predikcije 1 lošeg odgovora na COS kojim su obuhvaćeni parametri koji se određuju prije primjene hormonske terapije. Učinjena je multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

Promatran je neovisan utjecaj koncentracije E2 i prolaktina koji su određivani 7. dana COS. Utvrđeno je da je koncentracija E2 7. dana nakon korekcije s koncentracijom prolaktina 7. dana u nezavisnoj korelaciji s lošim odgovorom na stimulaciju jajnika, tj. svaka jedinica povećanja koncentracije estradiola 7. dan je u vezi s 1% redukcije u vjerojatnosti za pojavu lošeg odgovora na COS. Na isti je način promatran neovisan utjecaj koncentracije E2 i prolaktina na dan primjene hCG te je utvrđeno da je povećanje njihove koncentracije za 1 jedinicu u vezi s 1% redukcije vjerojatnosti za loš COS (tablica 3.27)

Tablica 3.27 Omjeri vjerojatnosti za loš odgovor na COS

Varijabla	OR (95% CI)	p
E2 7. dan	0,999 (0,998 – 0,999)	<0,001
E2-hCG	0,999 (0,998 – 0,999)	<0,001

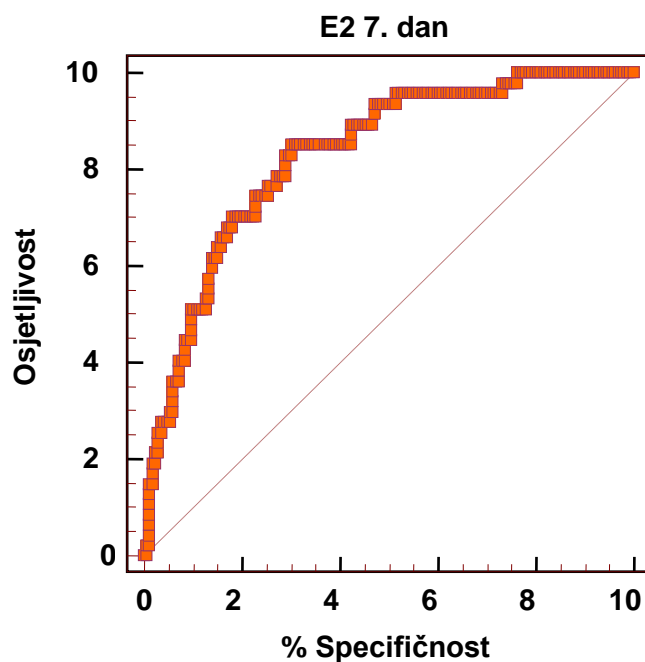
Multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije

U tablici 3.28 prikazane su vrijednosti AUC za koncentracije estradiola i prolaktina izmjerene 7. dana COS. Samo E2 7. dana ima prihvatljivu točnost u identifikaciji *poor responder* (AUC = 0.828, slika 3.3), sa specifičnošću oko 0,70 i osjetljivošću od 0,85 ukoliko se kao optimalna *cut off* uzme koncentracija od 1455,1 IU/L.

Tablica 3.28 AUC vrijednosti parametara određenih 7. dana stimuliranog ciklusa za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	<i>cut off</i>	% Osjetljivost	% Specifičnost
E2 7. dan	0,828*	0,0322	0,770 - 0,876	1455,1	85,11	69,70
Prolaktin 7. dan	0,659*	0,0528	0,591 - 0,723	348,7	61,7	83,03

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * p<0,05



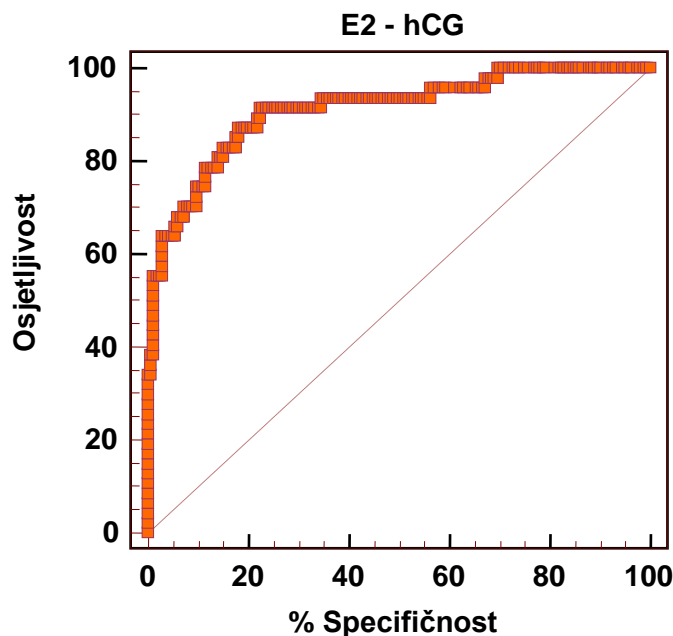
Slika 3.3 Model predikcije lošeg odgovora na COS koncentracijom estradiola 7. dana ciklusa u kojem je primijenjena hormonska terapija. Učinjena je multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

I u slučaju parametara određivanih na dan primjene hCG, koncentracije estradiola i prolaktina, utvrđeno je da koncentracija E2 na dan primjene hCG ima odličnu sposobnost za identifikaciju *poor respondera* jer joj je AUC > 0,90 sa visokom osjetljivošću (0,91) i specifičnošću (0,78) (tablica 3.29, slika 3.4)

Tablica 3.29 AUC vrijednosti parametara određenih na dan primjene hCG za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	cut off	% Osjetljivost	% Specifičnost
E2 hCG	0,910*	0,0259	0,864 to 0,945	2761,8	91,49	77,58
Prolaktin hCG	0,644*	0,0498	0,576 to 0,709	482	59,57	69,09

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * p<0,05



Slika 3.4 Model predikcije lošeg odgovora na COS koncentracijom estradiola na dan primjene hCG. Učinjena je multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

Kako bi se dobio što bolji uvid u mogućnost predikcije lošeg odgovora na kontroliranu stimulaciju kod žena koje ne spadaju u "rizične" skupine (≤ 36 godina, BMI < 25) učinjena je istovrsna analiza, samo što su u obzir uzete ispitanice uz kriterije isključenja koji su prethodno identificirani kao "rizični": dob > 36 godina i indeks tjelesne mase > 25.

Jedina dva parametra za koje je ustanovljeno da se statistički značajno razlikuju između na opisan način definiranih skupina su broj antralnih folikula i koncentracija estradiola na dan primjene hCG (tablica 3.30).

Tablica 3.30 Vrijednosti ispitivanih parametara u odnosu na broj dobivenih oocita uz kriterije isključenja dob > 36 godina i indeks tjelesne mase > 25

	Skupina 1 (0 - 3 oocite) n = 47	Skupina 2 (≥ 4 oocita) n = 114	P
Bazalni FSH (IU/L)	7,74 ± 2,018	7,04 ± 1,746	0,130
Bazalni LH (IU/L)	6,73 ± 2,33	6,07 ± 2,17	0,237
bFSH/bLH	1,19 ± 0,62	1,42 ± 0,61	0,120
Bazalni E2 (pmol/L)	159,29 ± 46,83	178,16 ± 34,05	0,089
Bazalni prolaktin [•] (mIU/L)	388,00 (293,750 - 438,25)	342,00 (267,50 - 440,00)	0,5435
Bazalni TSH (mIU/L)	2,32 ± 0,77	2,50 ± 0,69	0,309
E2 7. dan ^f (pmol /L)	978,096 (698,95 - 1368,72)	1854,82 (1602,20 - 2147,27)	0,009
Prolaktin 7. dan ^f (mIU/L)	365,426 (306,47 - 424,38)	428,798 (399,969 - 459,705)	0,071
E2-hCG^f (pmol /L)	1599,869 (1158,64 - 2209,13)	3704,602 (3261,18 - 4208,32)	<0,001
Prolaktin-hCG (mIU/L)	565,47 ± 199,82	473,80 ± 151,87	0,053
Broj antralnih folikula	19,90 ± 6,60	15,16 ± 5,35	0,003
Genotip NN	31,6%	24,5%	0,463
Genotip NS	36,8%	53,1%	0,175
Genotip SS	31,6%	22,4%	0,366

Za kontinuirane varijable koje su normalno distribuirane prikazane su srednje vrednosti ± SD, a usporedba je obavljena ANOVA testom.

^f Za E2 7. dan, prolaktin 7. dan i E2-hCG prikazane su geometrijske sredine i 95% CI. Prije statističke analize varijable su logaritamski transformirane.

[•] Varijable nemaju normalnu raspodjelu i predstavljene su kao medijan, 25 i 75 percentil, a za usporedbu je korišten Kruskal Wallis test.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Učinjena je univarijntna logistička regresijska analiza, a rezultati su prikazani u tablici 3.31. Dobiveni podaci upućuju na zaključak da je od parametara koji se određuju u ciklusu koji prethodi COS samo broj antralnih folikula prediktor lošeg odgovora jajnika. S povećanjem broja antralnih folikula za jednu jedinicu postoji vjerojatnost od 34% da će se smanjiti loš odgovor na COS.

Oba parametra, koncentracija estradiola i prolaktina koji se određuju 7. dana te na dan primjene hCG mogu pridonijeti predviđanju lošeg odgovora jajnika na COS.

Tablica 3.31 Omjeri vjerojatnosti za loš odgovor na COS

Varijable	OR (95% CI)	p
Bazalni FSH (IU/L)	1,238 (0,957 - 1,603)	0,104
Bazalni LH (IU/L)	0,881 (0,715 - 1,086)	0,237
Bazalni E2 (pmol/L)	1,008 (0,999 - 1,018)	0,090
Bazalni prolaktin (mIU/L)	1,000 (0,998 - 1,002)	0,940
Bazalni TSH (mIU/L)	1,349 (0,758 - 2,400)	0,308
E2 7. dan (pmol /L)	0,999 (0,999 - 1,000)	0,016
Prolaktin 7. dan (mIU/L)	0,996 (0,993 - 1,000)	0,028
E2-hCG (pmol /L)	0,999 (0,998 - 1,000)	0,002
Prolaktin-hCG (mIU/L)	0,997 (0,994 - 1,000)	0,053
Broj antralnih folikula	0,876 (0,801 - 0,957)	0,003
Genotip NN	1,424 (0,513 - 3,955)	0,498
Genotip NS	0,515 (0,194 - 1,364)	0,182
Genotip SS	1,599 (0,574 - 4,458)	0,182

Univarijntna logistička regresijska analiza

U tablici 3.32 prikazane su dijagnostičke točnosti za parametare koji se određuju u ciklusu koji prethodi COS. Jedino broj antralnih folikula posjeduje prihvatljivu točnost u identifikaciji *poor respondera* (AUC = 0,742), dok bazalna koncentracija E2, iako ima slab dijagnostički potencijal, ima statistički značajnu vrijednost za AUC (0,645). Zato je promatrana dijagnostička točnost ukoliko se ova dva parametra određuju zajedno te je utvrđeno da je zajednička dijagnostička točnost veća od pojedinačne (AUC = 0,770; SE = 0,0553; 95% CI = 0,708 - 0,825; p = <0,0001).

Tablica 3.32 AUC vrijednosti parametara određenih u ciklusu koji prethodi COS za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	cut off	% Osjetljivost	% Specifičnost
Bazalni FSH	0,603	0,0753	0,534 - 0,669	7,6	57,89	66,32
Bazalni LH	0,579	0,0668	0,509 - 0,646	6,9	73,68	47,15
Bazalni E2	0,645*	0,0604	0,576 - 0,709	183,5	52,63	76,17
Bazalni prolaktin	0,542	0,0614	0,473 - 0,611	386	52,63	63,73
Bazalni TSH	0,580	0,0665	0,510 - 0,647	2,22	68,42	51,81
Broj antralnih folikula	0,742*	0,0580	0,678 - 0,800	17	84,21	64,77

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * p<0,05

Promatran je neovisan utjecaj koncentracije estradiola i prolaktina koji su određivani 7. dana COS. Multivarijantna logistička regresijska analiza po forward selekciji pokazala je da je u neovisnoj vezi s lošim odgovorom na COS koncentracija E2 7. dana (tablica 3.33). Prikazane su vrijednosti za dijagnostičku točnost ova dva parametra te je utvrđeno da koncentracija E2 7. dana ima prihvatljivu sposobnost u identifikaciji *poor respondera* s AUC = 0,702, dok koncentracija prolaktina 7. dana ima nešto lošiju točnost sa AUC = 0,667 (tablica 3.34).

Tablica 3.33 Omjeri vjerojatnosti za loš odgovor na COS

Varijabla	OR (95% CI)	p
E2 7. dan	0,999 (0,999 – 1,000)	0,016
E2-hCG	0,999 (0,999 – 1,000)	0,002

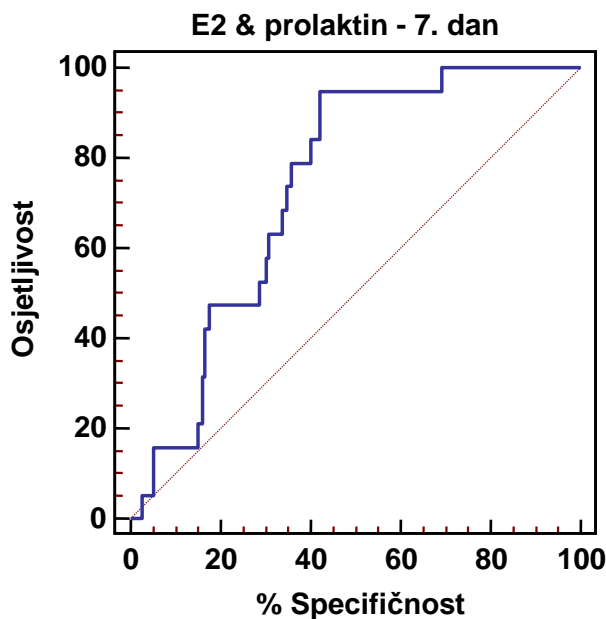
Multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije

Tablica 3.34 Vrijednosti parametara određenih 7. dana stimuliranog ciklusa za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	cut off	Osjetljivost	Specifičnost
E2 7. dan	0,702*	0,0505	0,635 to 0,762	1455,1	78,95	61,14
Prolaktin 7. dan	0,677*	0,0638	0,610 to 0,740	348,7	63,16	77,20

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * p<0,05

Zajednički je učinak ova dva parametra određivana 7. dana veći od pojedinačnog (AUC = 0,738; SE = 0,0444; 95% CI = 0,674 - 0,796; p = <0,001) (slika 3.5).



Slika 3.5 Model predikcije lošeg odgovora na COS koncentracijom estradiola i prolaktina 7. dana ciklusa u kojem je primijenjena hormonska terapija. Učinjena je multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

Na isti je način promatran neovisan utjecaj koncentracija estradiola i prolaktina na dan primjene hCG. Multivarijantnom logističkom regresijskom analizom po forward selekciji ustanovljano je da je statistički značajan neovisan prediktor koncentracija E2 na dan primjene hCG (tablica 3.33) te da se s 1 jedinicom povećanja ovog parametra, neovisno o koncentraciji prolaktina izmjerenog na dan primjene hCG, vjerojatnost za slab odgovor jajnika smanjuje za 1%.

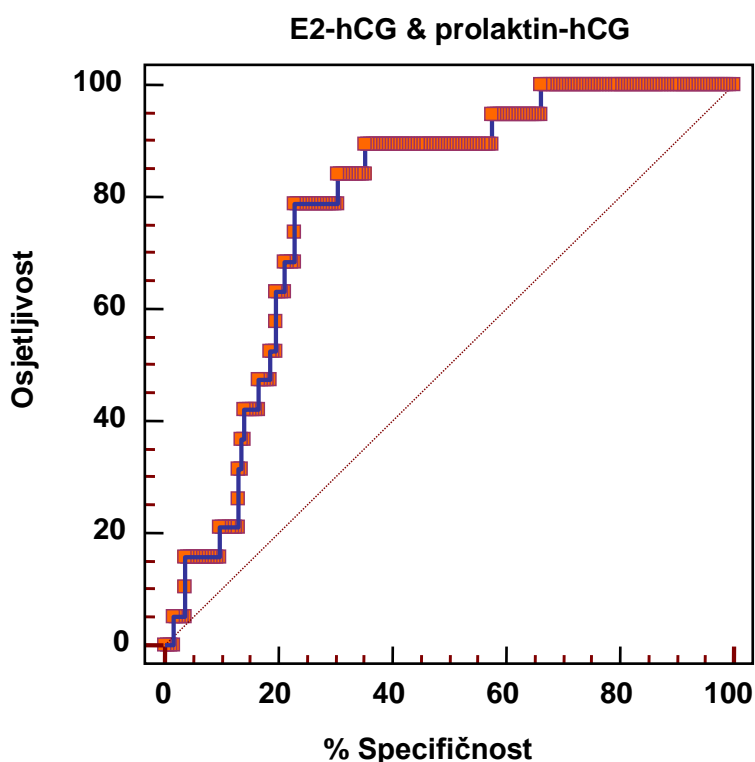
Tablica 3.35 AUC vrijednosti parametara određenih na dan primjene hCG za ROC krivulje

	AUC	SE	95% CI	cut off	% Osjetljivost	% Specifičnost
E2 hCG	0,777*	0,0471	0,715 - 0,832	3829,2	88,64	59,52
Prolaktin hCG	0,648	0,0645	0,580 - 0,713	515	65,91	55,36

AUC – površina ispod ROC krivulje, SE – standardna pogreška, * p<0,05

U tablici 3.35 prikazane su vrijednosti za dijagnostičku točnost ova dva parametra i utvrđeno je da koncentracija E2 na dan primjene hCG ima prihvatljivu sposobnost u identifikaciji *poor*

respondera s $AUC = 0,777$, dok koncentracija prolaktina na dan primjene hCG ima nešto lošiju točnost s $AUC = 0,648$. Kombinacijom koncentracije estradiola i prolaktina određivanih na dan primjene hCG utvrđeno je da je zajednički učinak u identifikaciji lošeg odgovora na COS veći od pojedinačnog ($AUC = 0,788$; $SE = 0,0438$; $95\% \text{ CI} = 0,727 - 0,841$; $p = <0,0001$) (slika 3.6).



Slika 3.6 Model predikcije lošeg odgovora na COS koncentracijom estradiola i prolaktina 7 na dan primjene hCG. Učinjena je multivarijantna logistička regresijska analiza po forward principu selekcije.

3.4.1 Prediktivne vrijednosti ispitivanih parametara za COS u skupini ispitanica s genotipom SS za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰

Ova je studija započeta na temelju literaturnih podataka koji su postavili tezu da žene s genotipom SS za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ imaju veću predispoziciju da u kontroliranoj stimulaciji jajnika budu *poor responders*, no dobiveni je rezultati nisu potvrdili. Štoviše, pretpostavljeno je da bi odgovor ispitanica na COS, koje su nositeljice genotipa SS, ovisno o dobi, odnosno da će te osobe ukoliko su mlađe od 32 godine, biti „hiperresponders“. Kako bi se statistički provjerila postavljena teza detaljnije je analizirana skupina nositeljica genotipa SS ($n = 49$).

U ovoj je skupini srednja vrijednost bazalne koncentracije FSH iznosila $6,9 \pm 1,69$ IU/L uz standardnu pogrešku 0,24; najniža vrijednost je bila 3,68 IU/L, a najviša 11 IU/L, uz 95%-tni interval pouzdanosti 6,41 – 7,38, dok je medijan bio 7,2 IU/L uz varijancu 2,84 i 95% interval pouzdanosti 6,22 – 7,50.

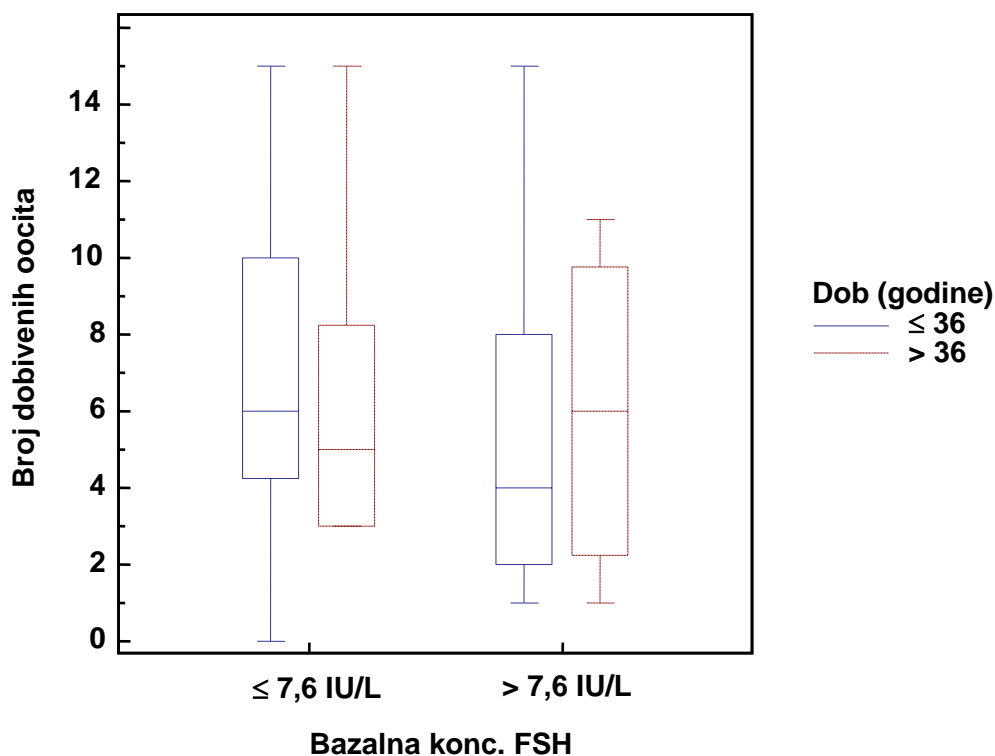
Analiza je započeta provjerom povezanosti genotipa SS, bazalne koncentracije FSH (prema kojoj su ispitanice podijeljene u dvije skupine: skupina BBF1 s bazalnom koncentracijom FSH $\leq 7,6$ IU/L; i skupina BBF2 s bazalnom koncentracijom FSH $> 7,6$ IU/L) i dobi (skupina BBD1 ≤ 36 god. i skupina BBD2 > 36 god.) (tablica 3.36). Vrijednost bFSH 7,6 IU/L izabrana je iz razloga što je u prethodnoj analizi utvrđeno da je to potencijalna *cut off* vrijednost za predikciju lošeg odgovora na COS, pa se željelo ispitati može li taj podatak pridonijeti boljoj distinkciji ispitanica s lošim odgovorom na COS u skupini s genotipom SS.

Tablica 3.36 Utjecaj bazalne koncentracije FSH i dobi ispitanica na broj oocita u skupini ispitanica s genotipom za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ SS

Bazalna konc. FSH	Dob	n	Srednja vrijednost	SE
$\leq 7,6$ IU/L	Skupina BBD1 (≤ 36 god.)	27	8,7	1,32
	Skupina BBD2 (> 36 god.)	5	6,4	3,06
$> 7,6$ IU/L	Skupina BBD1 (≤ 36 god.)	14	6,1	1,33
	Skupina BBD2 (> 36 god.)	3	6,0	3,95

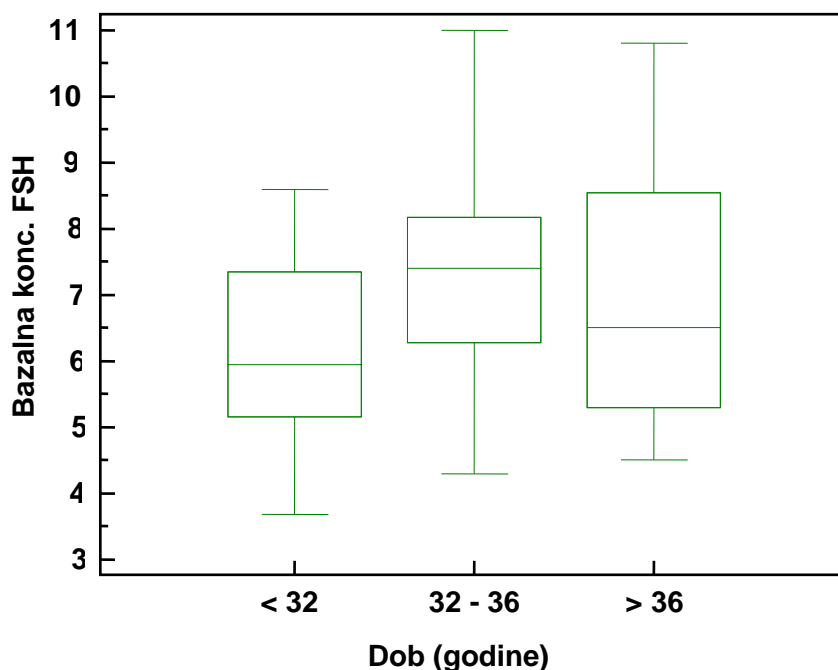
Prikazane su srednje vrijednosti \pm SE, a za usporedbu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Važno je naglasiti da razdioba broja oocita unutar skupina nije normalna ni nakon logaritamske transformacije podataka. Kako bi se dobila normalna raspodjela po skupinama, zanemarene su ekstremno visoke vrijednosti broja oocita, odnosno definirane su kao > 15 , ali ni u ovom slučaju nije dobivena statistički značajna razlika po skupinama ($p = 0,628$) (slika 3.7).



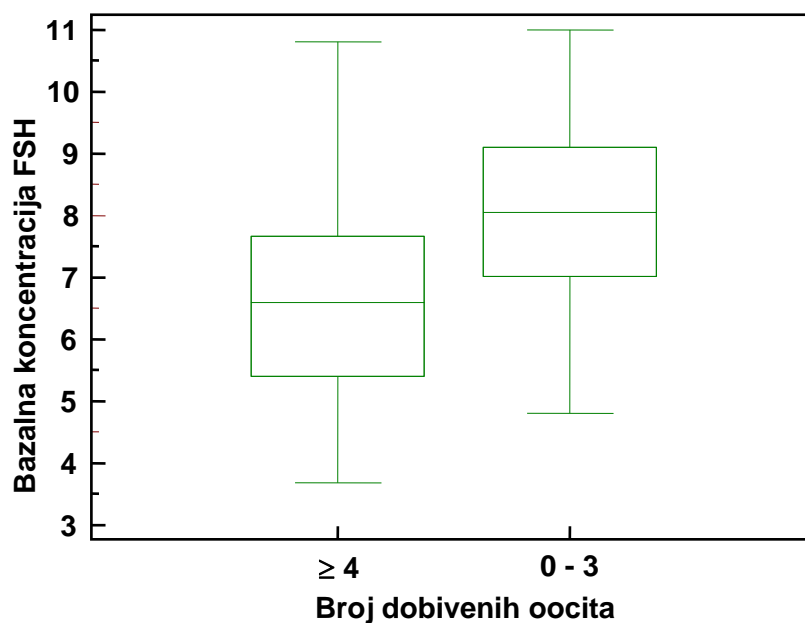
Slika 3.7 Ovisnost broja dobivenih oocita o bazalnoj koncentraciji FSH i dobi u skupini ispitanica s genotipom SS (razdioba broja oocita normalizirana definiranjem ekstremno visokih vrijednosti broj oocita kao > 15). Za analizu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Kako bi se detaljnije ispitala povezanost bazalne koncentracije FSH i dobi ispitanica, ispitanice genotipa SS su prema dobi podijeljene u 3 skupine (skupina BBD1 obuhvatila je ispitanice mlađe od 32 godine ($n = 16$), skupina D2 ispitanice stare 32 – 36 godina ($n = 25$) i skupina D3 ispitanice starije od 36 godina ($n = 8$)) te su uspoređene srednje vrijednosti bazalnih koncentracija FSH po skupinama, ali statistički značajna razlika nije utvrđena ($p = 0,085$) (slika 3.8).

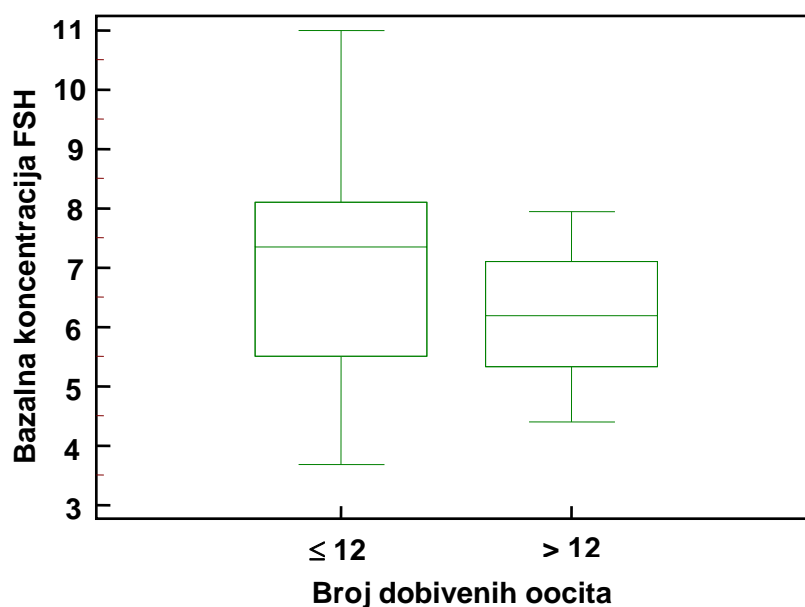


Slika 3.8 Ovisnost vrijednosti bazalne koncentracije FSH i dobi ispitanica u skupini ispitanica s genotipom SS. Za analizu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Kada je analizirana povezanost bazalne koncentracije FSH s odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju definiranog kroz broj dobivenih oocita (ispitanice su podijeljene u skupinu *poor responders* – broj dobivenih oocita 0 – 3 ($n = 10$) i ostale – broj dobivenih oocita ≥ 4 ($n = 39$)) dobivena je statistički značajna razlika između skupina. Bazalna koncentracija FSH bila je statistički značajno viša u skupini ispitanica sa slabim odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju ($p = 0,026$) (slika 3.9). Zanimljivo je što kad je učinjena ista analiza, ali u cilju da se bazalna koncentracija FSH poveže sa „*hiperresponders*“ (ispitanice su podijeljene u skupinu „*hiperresponders*“ – broj dobivenih oocita > 12 ($n = 7$) i ostale – broj dobivenih oocita ≤ 12 ($n = 42$)) statistički značajna razlika nije utvrđena ($p = 0,228$) (slika 3.10).



Slika 3.9 Ovisnost vrijednosti bazalne koncentracije FSH i broja dobivenih oocita u skupini ispitanica s genotipom SS. Za analizu je korišten dvofaktorski ANOVA test.



Slika 3.10 Ovisnost vrijednosti bazalne koncentracije FSH i broja dobivenih oocita u skupini ispitanica s genotipom SS. Za analizu je korišten dvofaktorski ANOVA test.

Kao posljednji korak pokušalo se definirati uz koju se terapiju u pojedinoj skupini ispitanica ovisno o bazalnoj koncentraciji FSH i dobi, postiče najveći broj oocita. Ispitanice su prvo podijeljene u skupine prema bFSH kao \leq i $>$ 7,6 IU/L, zatim prema dobi $<$ 32 god., 32 – 36 god. i $>$ 36 god, a zatim prema primljenoj terapiji (slika 3.11).

			x	SD	Median	p	
bFSH \leq 7,6 IU/L	< 32 god.	T1	8,23	6,74	6,00	0,884	
		T2	7,09	3,42	6,00		
		T3	9,38	7,37	7,50		
	32 - 36 god.	T1	8,07	3,71	8,00	0,041	
		T2	5,55	2,87	5,00		
		T3	6,57	3,55	5,00		
	> 36 god.	T1	6,55	3,94	5,50	0,563	
		T2	4,33	1,37	4,50		
		T3	5,33	2,66	5,00		
	bFSH $>$ 7,6 IU/L	< 32 god.	T1	8,83	3,19	9,00	0,054
			T2	4,83	1,83	4,00	
			T3	26,00			
32 - 36 god..		T1	4,47	3,64	4,00	0,376	
		T2	7,17	5,32	6,00		
		T3	6,83	6,05	4,00		
> 36 god.		T1	4,11	3,06	3,00	0,249	
		T2	6,20	4,05	5,00		
		T3	3,50	1,65	4,00		

Slika 3.11 Usporedba uspješnosti odgovora na COS

Korištenjem Kruskal Wallice testa utvrđeno da se u skupini ispitanica čiji je bFSH $\leq 7,6$ IU/L i stare su između 32 i 36 godina najbolji uspjeh u smislu dobivanja broja jajnih stanica postiže s terapijom 2, dok se u skupini bFSH $> 7,6$ IU/L i koje su mlađe od 32 godine najbolji uspjeh postiže s terapijom 1 (u ovom slučaju rezultate treba uzeti s oprezom jer je terapiju 3 primila samo jedna ispitanica).

4 RASPRAVA

U posljednje vrijeme individualizirani pristup pacijentu postaje temelj uspješnosti suvremene medicine i farmakoterapije, za što su farmakogenetske studije nužan preduvjet. Medicinski pomognuta oplodnja samo je jedno od područja za koje je nedvojbeno pokazano da se individualiziranim pristupom može značajno pridonijeti njezinoj uspješnosti, pa su stoga studije procjene pojedinih, bilo kliničkih, biokemijskih ili genskih biljega kao čimbenika uspješnosti IVF sve više predmet znanstvenih istraživanja.

Određivanje veličine jajnika te broja i promjera antralnih folikula kao klinički parametar te određivanje bazalne koncentracije FSH, E2 i inhibina B kao biokemijski parametar postali su sastavni dio rutinske obrade pacijentica koje ulaze u postupak IVF (Lass, 2001). Zbog neinvazivnosti postupka uzorkovanja kao i relativno jednostavnih postupaka analize od posebnog je značaja prepoznati i validirati biokemijske parametre koji bi mogli pridonijeti što boljoj procjeni odgovora pacijentice na terapiju FSH u postupku COS, a time i IVF. Premda su prepoznati kao potencijalni biljezi, literaturni podaci o vrijednosti određivanja bazalnih koncentracija LH, TSH i prolaktina u tu svrhu relativno su oskudni, a smjernice za obradu pacijentice koja ulazi u postupak medicinski potpomognute oplodnje kao i za primjenu određenog terapijskog protokola za kontroliranu stimulaciju jajnika, utemeljenu na dokazima, još uvijek ne postoje i ovise isključivo o procjeni liječnika.

Izostanak očekivanog odgovora na standardni protokol i izostanak adekvatne folikulogeneze se naziva i loš odgovor jajnika (*eng.* "poor ovarian response", POR). Rezultat neadekvatnog odgovora na stimulaciju je smanjenje broja stvaranja oocita, a time i smanjenje mogućnosti ostvarivanja trudnoće, odnosno prekidanje postupka stimulacije (Venetis i sur., 2010). POR je prvi put opisan 1983. godine i definiran je vršnom koncentracijom estradiola (nižom od 300 ng/L) te manjim brojem folikula, dobivenih oocita i zametaka. Kontinuirano traju pokušaji definiranja "lošeg odgovora", a zadnji je prijedlog radne grupe Europskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju (*European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) za definiciju "lošeg odgovora" sljedeći: ukoliko su prisutna dva od sljedeća tri faktora (a) uznapredovala starosna dob potencijalne trudnice ili bilo koji drugi rizični faktor za POR, (b) prethodni POR, (c) neuredan test ovarijske rezerve. Stoga je logično smatrati da jedan postupak stimulacije jajnika s lošim odgovorom (uz stimulaciju gonadotropinima te dobiveno 3 ili manje oocita) klasificira pacijenticu u skupinu POR, a da pacijentice koje su uznapredovale starosne dobi s neurednim testom ovarijske rezerve treba klasificirati kao "očekivani" POR (Ferraretti i sur., 2011).

Incidencija POR nije mala; prevalencija varira od 9 do 24% , a ovisi i o definiciji POR koja do danas, kao što je prethodno spomenuto, nije jedinstvena u svijetu (Venetis i sur., 2010). Brojni kriteriji su predloženi za definiranje POR; broj antralnih folikula i broj dobivenih oocita u standardnom protokolu najvažniji su kriterij, no autori se razlikuju stavu o graničnom broju dobivenih oocita koji varira od 3 do 5. Vršna koncentracija estradiola je drugi mogući kriterij koji prema različitim autorima varira od < 300 do < 500 ng/L ili čak < 1000 ng/L. Predloženo je, također, da bi kriterij za definiranje POR mogao biti broj iskorištenih ampula (> 44) humanog menopauzalnog gonadotropina, odnosno dnevna doza > 300 IU/dan (Shaker i sur., 1992; Toth i sur., 1996).

Bazalna koncentracija FSH također je od velikog interesa kliničara kao potencijalni prediktor odgovora jajnika na COS, no provedene studije pokazale su oprečne rezultate (Ashrafi i sur., 2005; Caroppo i sur., 2006; Watt i sur., 2000). Jedan od mogućih razloga takvih rezultata je i biološka aktivnost receptora za FSH, koja je uvjetovana proteinskom strukturom, a koja može biti promijenjena uslijed mutacija/polimorfizama u genu *FSHR* (Gromoll i Simoni, 2005). Pokazano je, primjerice da mutacije u genu za FSH receptor mogu utjecati na reproduktivnu sposobnost, posebice kod žena (Sudo i sur., 2002).

Od otkrivanja ljudskog genoma učinjen je veliki napredak i u otkrivanju gena povezanih s funkcijom jajnika (Fauser, 2008). Različite varijante *FSHR* prvi su put opisane 1995. godine (Aittomaki i sur., 2005), što je otvorilo raspravu o tome može li polimorfizam jedne baze (*eng.* single nucleotide polymorphism) u genu *FSHR* utjecati na ovarijski odgovor na egzogenu stimulaciju gonadotropinima. Jednu od prvih takvih studija proveli su Perez Mayorga i suradnici koji su utjecaj genotipa za SNP p.N680S u genu *FSHR* na ovarijski odgovor na stimulaciju FSH istražili kod 161 neplodne žene podvrgnute IVF postupku (Perez Mayorga i sur., 2000). Premda dobivene razlike u broju dobivenih oocita, kao ni u serumskoj koncentraciji estradiola na dan primjene hCG nisu utvrđene, ukupan broj potrošenih ampula gonadotropina te bazalna koncentracija FSH bili su viši u skupini s genotipom Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰. Zaključeno je da je SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR* važan prognostički faktor za uspjeh COS ciklusa u neplodnih žena s normalnom ovulacijom te da genotip za taj SNP pokazatelj težine ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS) (Perez Mayorga i sur., 2000). Kasnije je proveden niz studija koje su dovele do sličnih zaključaka (de Castro i sur., 2004; de Castro i sur., 2003; Falconer i sur., 2005; Loutradis i sur., 2006a; Sudo i sur., 2002). Jedna od njih, retrospektivna studija pokazala je povezanost između prisutnosti serina na položaju 680 i slabog odgovora jajnika na gonadotropine (de Castro i sur., 2003). Loutradis i suradnici

utvrdili su kako su pacijentice s optimalnim odgovorom na stimulaciju češće nositeljice genotipa Asn^{680}/Ser^{680} skupini, te kako bi varijanta Ser^{680}/Ser^{680} mogla biti povezana s višom, a varijanta Asn^{680}/Ser^{680} s nižom serumskom koncentracijom FSH (Loutradis i sur., 2006b). Jun i suradnici su također pokazali povezanost ovog SNP i ishoda COS, utvrdivši da je serumska koncentracija E2 u vrijeme primjene hCG kod ispitanica s genotipom Ser^{680}/Ser^{680} niža te da je kod njih nužna primjena veće doze gonadotropina za COH. Uz to, pokazano je kako se u skupini pacijentica s genotipom Asn^{680}/Asn^{680} dobiva više oocita, uz viši postotak trudnoća u usporedbi s ostalim skupinama (Jun i sur., 2006). Ipak, druga je studija pokazala suprotne rezultate s većom stopom uspješnih trudnoća kod žena s genotipom Ser^{680}/Ser^{680} uz sličan dizajn istraživanja (Klinkert i sur., 2006). U parcijalno retrospektivnoj nerandomiziranoj studiji koja je obuhvatila žene s normalnom ovarijskom funkcijom pokazale su da SNP na eksonu 10 moduliraju funkciju FSHR i ovarijski odgovor na FSH (Wunsch i sur., 2007). Štoviše i drugi su genetski faktori poput polimorfizama u genima koji kodiraju estrogenske receptore (*ER1* i *ER2*) (de Castro i sur., 2004) te u genima koji kodiraju anti-milerijski hormon, odnosno receptor za AMH (AMH tip 2 receptor) uključeni u moduliranje ovarijske osjetljivosti na FSH (Hanevik i sur., 2010). Ove, dijelom oprečne, rezultate treba oprezno tumačiti te ih uzeti u obzir prilikom osmišljavanja studija o utjecaju genotipova za polimorfizme u genu *FSHR* na uspješnost ostvarivanja trudnoća u postupku medicinski potpomognute oplodnje.

Studije koje su obuhvatile žene s patološkom ovarijskom funkcijom nisu našle povezanost polimorfizama u genu *FSHR* i prijevremene ovarijske insuficijencije (Conway i sur., 1999; Sundblad i sur., 2004). Nekoliko studija provedenih na ženama različitih entiteta sa sindromom policističnih jajnika (*eng.* polycystic ovarian syndrome, PCOS) pokazalo je da je u toj skupini genotip Asn^{680}/Ser^{680} češći u odnosu na kontrolnu skupinu (Conway i sur., 1999; Sudo i sur., 2002; Tong i sur., 2001). U nerandomiziranoj studiji s normogonadotropnim anovulatornim ženama koje nakon stimulacije klomifen citratom nisu ovulirale niti začele, a liječene su niskim dozama FSH za indukciju ovulacije nisu nađene razlike u dozi FSH potrebne za razvoj jednog folikula između skupina žena s različitim genotipovima za SNP Asn^{680}/Ser^{680} u genu *FSHR* (Laven i sur., 2003). Čini se, dakle, kako je različit estradiolski odgovor uzrokovan različitim varijantama gena *FSHR* prisutan samo kod žena s normalnom ovarijskom funkcijom. Pokazano je također da je alel Ser^{680} značajno češći kod žena s normalnim menstruacijskim ciklusom i povišenom koncentracijom FSH u usporedbi s onima kod kojih je koncentracija FSH normalna, potvrđujući tako ideju o višem pragu za FSH (Wunsch i sur., 2007).

Uz to, pokazano je da estradiolski odgovor na terapiju FSH ovisi o genotipu SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR*, jer je jednaka doza FSH u COH postupku rezultirala značajno nižim vrijednostima koncentracije estradiola kod žena s genotipom Asn⁶⁸⁰/Asn⁶⁸⁰ što je bilo moguće nadoknaditi povećanjem doze FSH (Behre i sur., 2005; Wunsch i sur., 2007). Unatoč razlikama u razini estradiola nisu nađene razlike u broju folikula, dobivenih oocita, broju oplodnja, broju embrija ili uspješnosti trudnoća što dovodi do zaključka da bi prema postojećim protokolima FSH mogao biti predoziran kod pojedinih žena čime se povećava rizik razvoja OHSS na koji indirektno utječe ekscesivno davanje FSH. Retrospektivna studija Daelemansa i suradnika pokazala je povezanost Asn680 alela s prognozom teškog oblika OHSS, te je na temelju dobivenih rezultata zaključeno da žene s genotipom Asn680 prilikom postupka COH imaju povećan rizik za hiperstimulaciju s FSH (Daelemans i sur., 2004). Ova se studija ipak temelji na relativno malom broju slučajeva te zasada ostaje samo promišljanje koje zahtjeva dodatnu potvrdu.

U skladu s rezultatima studije Sheikhha MH i suradnika istraživanje predstavljeno u ovom radu pokazalo je kako je u skupini ispitanica s genotipom Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ bilo neočekivano više pacijentica s pojačanim odgovorom jajnika na stimulaciju hormonskom terapijom. Na sreću, niti jedna žena s prejakim odgovorom nije razvila OHSS zbog odgovarajućih preventivnih terapijskih mjera, ali ih ipak možemo usporediti s pacijenticama s OHSS iz drugih studija, s obzirom na jak odgovor na COH (Sheikhha i sur., 2011). Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost identifikacije pacijentica s povećanim rizikom za razvoj OHSS prije samog početka IVF protokola na temelju analize genotipa Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ čime bi se pridonijelo odabiru adekvatnog protokola za COH na temelju specifičnih kriterija. Ipak, nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji E2 kod žena podvrgnutih COS s obzirom na genotip Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰. Mora se uzeti u obzir i istraživanje Klinkerta i suradnika kojim ne utvrđena razlika u ovarijskom odgovoru u skupinama s različitim genotipom, ali je uočena tri puta veća stopa implantacija i trudnoća kod ispitanica s genotipom Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u odnosu na one s genotipom Asn⁶⁸⁰/Asn⁶⁸⁰ (Klinkert i sur., 2006). Ukupno gledajući, većina studija upućuje na povezanost SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR* i ishoda kao i komplikacije postupaka COS, ali bez utjecaja na samu neplodnost (Yao i sur., 2011), pa se može se reći kako je u populaciji neplodnih žena SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR* gena povezan s različitim ovarijskim odgovorom na COH. Premda je proveden niz studija, još uvijek postoji niz nerazjašnjenih pitanja, pa su nužne dodatne studije koje bi mogle pridonijeti rasvjetljavanju utjecaja ovog SNP na biološku aktivnost receptora za FSH (Livshyts i sur., 2009). Daljnja su

istraživnja također nužna radi konačnog zaključka može li genotipizacija SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ pridonijeti predikciji OHSS, odnosno slabog ovarijskog odgovora, prije samog IVF postupka.

Do danas je provedeno nekoliko studija kojima se pokušala utvrditi raspodjela genotipova za Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ kako u zdravoj populaciji tako i kod ispitanica koje su bile u postupku medicinski potpomognute oplodnje te povezanost pojedinog genotipa s uspješnošću postupka. U ovom je istraživanju uočeno da raspodjela genotipova u ispitivanoj populaciji nije jednaka ($p < 0,001$): najčešće je prisutan genotip NS (51,66%), dok su genotipovi NN i SS prisutni u približno sličnim postotcima od 25,12% (NN) i 23,22% (SS). Upoređujući dobivene rezultate s rezultatima drugih studija utvrđena je sličnost s nekima od njih, pa su tako primjerice, Perez Mayorga i suradnici genotipizacijom 161 neplodne ispitanice našli raspodjelu prema kojoj je najveći broj ispitanica bio genotipa NS (45%), dok su druga dva genotipa prisutni u približno sličnim postotcima kao u ovom istraživanju: NN genotip je bio prisutan kod 29%, a genotip SS kod 26% ispitanica (Perez Mayorga i sur., 2000). U istraživanju Juna i suradnika koja je obuhvatila 263 ispitanice raspodjela genotipova bila je nešto drugačija: NN genotip je nađen kod 41,8% ispitanica, genotip SS je nađen kod samo 12,5% ispitanica, a genotip NS je kao i u ovom istraživanju utvrđen kod 45,6% ispitanica (Jun i sur., 2006). Slične su rezultate opisali i Sheikhha MH i suradnici; od 108 neplodnih ispitanica genotip NN nađen je kod 20,37%, genotip SS kod 13,89%, a genotip NS kod 65,74% ispitanica (Sheikhha i sur., 2011). U studiji Bindera H i suradnika s neplodnim pacijenticama u IVF postupcima raspodjela je bila sljedeća: NN 15,4%, NS 51,6% i SS 33% u skupini koja je razvila OHSS skupini, a NN 17,4%, NS 46,5% i SS 36,1% u skupini ispitanica koje su bile u postupku COS, ali nisu razvile OHSS. U kontrolnoj je skupini raspodjela po genotipovima bila slična: NN 24,8%, NS 54,6% i SS 20,6% (Binder i sur., 2008). U studiji koja je uključila ispitanice s normalnom fertilnom sposobnošću koje su rodile prirodno začetu djecu i koje su bile mlađe od 35 godina, utvrđena je raspodjela po genotipovima (NN 18,6%, NS 53,9% i SS 27,5%) te se razlikovala od one utvrđene kod žena s ovarijskom disfunkcijom (NN 33,1%, NS 52,3% i SS 14,6%) (Livshyts i sur., 2009). Ispitivanje raspodjele genotipova za ovaj SNP unutar različitih etničkih skupina koje je bilo provedeno na 1771 ispitanica pokazalo je da statistički značajno manja učestalost genotipa SS (10,5%) kod Azijatkinja u odnosu na stanovnice Mediterana (21,5%), ali nije utvrđena razlika u koncentraciji bazalnog FSH između etničkih skupina niti su bile različite između skupina formiranih prema genotipu (Kuijper i sur., 2011). Najnovija objavljena prospektivna studija koja je bila provedena na 421 ispitanici u prvom postupku

COS utvrdila je raspodjelu sličnu raspodjeli nađenoj u ovom istraživanju: NN 30%, NS 51% i SS 19% (Mohiyiddeen i sur., 2012).

Populacija na kojoj je provedeno ovo istraživanje u prosjeku je bila stara $34,04 \pm 4,2$ godine. Kada je uspoređena raspodjela genotipova unutar dobnih skupina (< 32 , $32 - 36$ i > 36 godina) uočena je statistički značajna razlika u dobi ispitanica s genotipom NS ($34,7 \pm 4,17$) u odnosu na NN genotip ($33,28 \pm 4,3$) i SS genotip ($33,24 \pm 3,83$). Prema ostalim mjerenim parametrima nije zabilježena statistički značajna razlika unutar skupina s različitim genotipom. U po dizajnu sličnoj studiji Perez Mayorge i suradnika unutar ispitivane populacije nije bilo statistički značajne razlike u dobi između skupina po genotipovima, mada je prosječna dob ispitanica općenito niža od dobi populacije ispitivane u ovoj studiji (NN $32,3 \pm 0,5$; NS $32,8 \pm 0,42$ te SS $32,0 \pm 0,6$ godina) (Perez Mayorga i sur., 2000). Srednje vrijednosti godina koje su praktično identične za sve 3 skupine po genotipovima upućuju na zaključak da se toj retrospektivnoj studiji željelo uključiti samo ispitanice određene dobi kako dob ne bi imala utjecaj na krajni rezultat istraživanja čiji je cilj bio procijeniti broj potrošenih ampula gonadotropina za isti broj dobivenih jajnih stanica u COS ovisno o genotipu. U opisanoj studiji ostali ispitivani parametri (bazalna koncentracija FSH, koncentracija estradiola izmjerena na dan primjene hCG, broj antralnih folikula i broj dobivenih jajnih stanica) bili su slični, bez statistički značajnih razlika između skupina s različitim genotipom, a što je također bio slučaj u ovdje predstavljenom istraživanju. Uz to, kada su koncentracije E2 i prolaktina mjerene 7. dana COS korigirane bazalnim koncentracijama, odnosno koncentracije izmjerene na dan primjene hCG onima od 7. dana, također nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina s različitim genotipovima.

Ključni korak u postupku kontrolirane stimulacije jajnika je odabir samog terapijskog protokola za COS, koji se temelji isključivo na procjeni liječnika, a na osnovi parametara određenih prije samog postupka. Zato je u ovom radu učinjena analiza mjerenih parametara po skupinama ispitanica koje su primale različitu hormonsku terapiju. Analizom vrijednosti mjerenih parametara utvrđeno je da se jedino bazalna koncentracija LH statistički značajno razlikuje između skupina, odnosno skupina koja je primala "kratki protokol" (225 IU rFSH ili HP-hMG od 2. dana menstruacijskog ciklusa svakodnevno do primjene hCG uz istodobno korištenje antagonista GnRH od 7. dana stimulacije) imala je statistički značajno višu razinu LH ($7,75 \pm 2,28$ IU/L) u odnosu na druge dvije skupine koje su primale "dugi protokol" ($6,37 \pm 2,52$ IU/L; $6,56 \pm 1,75$ IU/L). Dobivenu razliku u bazalnoj koncentraciji LH u skupini T3 moguće je objasniti odabirom terapije prema bazalnim vrijednostima hormonskih parametara;

ispitanice u toj skupini primale su antagoniste GnRH, što su lijekovi koji se preporučavaju u slučajevima i najmanjeg rizika za hiperstimulaciju jajnika, odnosno u svim slučajevima kada je poremećen odnos bazalnih koncentracija FSH/LH, odnosno kada je koncentracija LH viša od koncentracije FSH, primjerice kod pacijentica s policističnim jajnicima.

Kada je razmatrana učestalost pojedinog genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ unutar skupina s različitom terapijom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u učestalosti ispitanica s genotipom SS po skupinama, no da postoji razlika učestalosti genotipa NN ($p = 0,043$) jer je najvećem broju ispitanica s tim genotipom dana terapija 2, dok je ta terapija najmanje primijenjena kod ispitanica s genotipom NS, a razlika je na granici statističke značajnosti ($p = 0,052$). Mogući razlog zbog kojeg bi veći broj pacijentica s genotipom NN dobio terapiju 2 je dobar klinički probir pacijentica jer se na terapiju 2 češće odlučujemo kod pacijentica kod kojih na temelju prethodno učinjenih kliničkih i laboratorijskih parametara očekujemo normalan odgovor jajnika na stimulaciju. Shodno tome terapiju 3 odabiremo u slučajevima kad očekujemo ili preslab ili prejak odgovor jajnika, a takvi odgovori su načelno manje uobičajeni.

Dob se smatra jednim od ključnih parametara uspješnosti postupka medicinski potpomognute oplodnje (Broekmans i sur., 2009). Stoga su i u ovom radu analizirane vrijednosti ispitanih parametara u odnosu na dob, a dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima prethodnih istraživanja. Poznato je da mlađe žene imaju niže vrijednosti bazalne koncentracije FSH, više antralnih folikula te veći broj dobivanih oocita, a povezano s time i veću koncentraciju estradiola izmjenog na dan primjene hCG (Alviggi i sur., 2009; Barad i sur., 2007; Santoro i sur., 1996; Sills i sur., 2009; Zhen i sur., 2008). Posebna se pozornost poklanja malim antralnim folikulima (2-6 mm) čiji se broj s dobi smanjuje, dok se broj većih folikula praktički ne mijenja sve do 45 godine starosti (Haadsma i sur., 2007).

U predstavljenom su radu utvrđene statistički značajne razlike između skupine ispitanica starijih od 36 godina u odnosu na one mlađe od 32 godine za bazalnu koncentraciju FSH koja je bila viša kod starijih ispitanica i broj oocita koji je bio niži te koncentraciju prolaktina 7. dana COS, koncentraciju estradiola na dan primjene hCG te broj antralnih folikula koji su bili niži kod starijih ispitanica u odnosu obje "mlađe" skupine (< 32 god. i 32 – 36 godina). U dobnoj skupini od 32 do 36 godina utvrđene su statistički značajno niže bazalne koncentracije FSH i broj antralnih folikula u odnosu na skupinu mlađu od 32 godine. Korekcijom koncentracija E2 i prolaktina 7. dana i na dan primjene hCG nestala je statistički značajna razlika između skupine ispitanica starijih od 36 godina i skupine ispitanica između 32 i 36

godina za koncentraciju E2 na dan primjene hCG. Raspodjela učestalosti genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ između dobnih skupina nije pokazala statistički značajnu razliku, a što je u skladu s literaturnim podacima (Perez Mayorga i sur., 2000).

Broj dobivenih oocita smatra se temeljnim pokazateljem uspješnosti kontrolirane stimulacije jajnika u postupku medicinski potpomognute oplodnje. Premda u stručnim krugovima još uvijek postoje oprečnosti u definiranju graničnih vrijednosti, u europskoj se praksi broj dobivenih oocita < 4 (0 – 3) smatra kriterijem za definiranje lošeg odgovora jajnika na hormonsku terapiju, dok se broj dobivenih oocita > 10 smatra hiperstimulacijom. Upravo su na temelju tih vrijednosti ispitanice obuhvaćene ovim istraživanjem podijeljene u 3 skupine: skupina O1 (0 – 3), skupina O2 (4 – 9) i skupina O3 (≥ 10). Statistički značajne razlike između skupina definiranim prema broju dobivenih oocita uočene su za niz parametara. Veći broj oocita dobiven je kod mlađih ispitanica, ispitanica s nižom bazalnom koncentracijom FSH, ispitanica s višim koncentracijama estradiola i prolaktina izmjerenim kako 7. dana stimulacije tako i na dan primjene hCG te ispitanica s većim brojem antralnih folikula. Iznimno velika statistička značajnost ($p < 0,001$) u razlikama u broju antralnih folikula utvrđena je kako između skupine O3 i skupina O1 i O2, tako i skupine O2 u odnosu na skupinu O1. Bazalna koncentracija FSH (bFSH) najčešće je korišten parametar za procjenu funkcionalne rezerve jajnika (Broekmans i sur., 2009). Analizirajući vrijednost bazalne koncentracije FSH kao prediktora lošeg odgovora jajnika na hormonsku stimulaciju, ista je studija utvrdila da bFSH ima prediktivnu vrijednost jedino u slučaju postavljanja visoke granične vrijednosti koja dobro predskazuje loš odgovor jajnika. Međutim, s obzirom na veliku fiziološku varijabilnost nalaza izolirana vrijednost bFSH se ne smatra temeljem za isključivanje pacijentice iz postupka pokušaja stimulacije jajnika. Ista studija broj antralnih folikula smatra vrijednim parametrom za ocjenu mogućeg odgovora u slučaju prvog pokušaja kontrolirane stimulacije jajnika (Broekmans i sur., 2006). Watt i suradnici ocijenili su ulogu bFSH kao prognostičkog čimbenika uspjeha postupka *in vitro* fertilizacije kod žena starijih od 40 godina i odredili su graničnu vrijednost bFSH za neostvarivanje trudnoće od 11,1 IU/L (Watt i sur., 2000). Istraživanje Ashrafi i suradnika koje je obuhvatilo 212 ispitanica u postupku izvantjelesne oplodnje utvrdilo je da su ispitanice s bFSH > 15 IU/L imale znakovito manje dobivenih oocita i veći broj prekinutih postupaka stimulacije zbog nereagiranja jajnika na stimulaciju i to neovisno o količini primjenjenih gonadotropina (Ashrafi i sur., 2005). Uz bazalnu koncentraciju FSH, broj antralnih folikula također se pokazao vrijednim prediktorom broja dobivenih oocita, u smislu da je niža bFSH i to veći broj

antralnih folikula u konačnici pretpostavlja veći broj dobivenih oocita (Chang i sur., 1998; Jayaprakasan i sur., 2010).

Analizom vrijednosti koncentracija bazalnog estradiola između skupina definiranih po broju dobivenih oocita utvrđeno je da je ona najniža u kod ispitanica u skupini s normalnim odgovorom jajnika, a najviša u skupini s lošim odgovorom te da se te vrijednosti statistički značajno razlikuju. Opsežna analiza vrijednosti testova za procjenu mogućeg odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju pokazala je da izolirane vrijednosti bazalne koncentracije estradiola nisu klinički vrijedne s obzirom na vrlo nisku predikcijsku vrijednost, bilo za neodgovarajući odgovor jajnika na stimulaciju bilo za neostvarivanje trudnoće (Broekmans i sur., 2006). Povezanost koncentracije estradiola tijekom postupka stimulacije jajnika i vršne koncentracije estradiola na dan primjene hCG s brojem dobivenih jajnih stanica, prethodno opisana u literaturi primjećena je i u ovom istraživanju. Do sličnih su saznanja došli Bianco i suradnici u svom ispitivanju povezanosti koncentracije estradiola i razvoja oocita; statistički značajno više oocita dobiveno je kod ispitanica s vršnim (na dan primjene hCG) vrijednostima estradiola > 2000 ng/L u odnosu na one s < 2000 ng/L. Slične su rezultate dobili usporedbom broja dobivenih zametaka nakon postupka izvantjelesne oplodnje: broj dobivenih zametaka je bio znakovito viši u skupini ispitanica s vrijednostima estradiola > 2000 ng/L (Bianco i sur., 2009).

Analizom vrijednosti koncentracije estradiola i prolaktina 7. dan ciklusa utvrđena je statistički značajna povezanost viših vrijednosti koncentracija E2 i prolaktina izmjerenih kako 7. dana ciklusa tako i na dan primjene hCG-a s brojem dobivenih oocita. U studiji Miaoa i Huanga koncentracija inhibina B, E2, FSH i LH mjerena je 4 puta (bazalna vrijednost izmjerena 3. dana ciklusa koji prethodi postupku stimulacije, na 1. dan ciklusa, na 1. dan primjene gonadotropina i na 5. dan primjene gonadotropina) te je utvrđeno da vrijednosti E2 i inhibina B izmjerene 1. i 5. dana terapije gonadotropinima pozitivno koreliraju s odgovorom jajnika odnosno brojem folikula, brojem dobivenih jajnih stanica, brojem oplodjenih oocita i brojem zametaka. Na temelju pozitivne korelacije autori su zaključili da serumske koncentracije inhibina B i E2 izmjerene početkom primjene gonadotropina daju kvalitetnu i ranu predikciju odgovora jajnika (Miao i Huang, 2009).

Prema zaključcima prethodnih retrospektivnih studija bilo je za pretpostaviti da će ispitanice s genotipom SS za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u ovom prospektivnom istraživanju imati slabiji odgovor jajnika i manji broj dobivenih oocita (Loutradis i sur., 2006a; Loutradis i sur., 2008; Perez Mayorga i sur., 2000). Međutim, najnovija studija Loutradisa i suradnika pokazala je da obje

homozigotne varijante NN i SS imaju veću mogućnost za slabiji odgovor jajnika na COS (Loutradis i sur., 2012). Statističkom analizom rezultata dobivenih u ovom radu nije utvrđena značajna povezanost nekog od genotipova sa slabijim odgovorom na stimulaciju jajnika. Slične su rezultate dobili su Klinkert i suradnici koji nisu dokazali povezanost genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ s mogućim lošim odgovorom na kontroliranu stimulaciju jajnika (Klinkert i sur., 2006). Najnovije prospektivno istraživanje Mohiyiddeen L i suradnika na 421 pacijentice koji su bile u prvom postupku COS za izvantjelesnu oplodnju također je polučilo slične rezultate. Analizirane su vrijednosti bazalnih koncentracija FSH, LH, AMH, broj antralnih folikula te su određeni genotipovi za SNP-ove p.Asn680Ser i p.Thr307Ala u genu FSHR kod ispitanica koje su bile mlađe od 40 godina i imale su BMI između 20 i 30. Nije nađena statistički značajna povezanost različitih polimorfizama niti s jednim izmjerenim parametrom, što je sukladno rezultatima ovog istraživanja. Zaključeno je također da određivanje genotipova SNP-ove p.Asn680Ser i p.Thr307Ala u genu FSHR ne pridonosi predikciji odgovora jajnika na COS, posebice u usporedbi s vrijednostima bazalnih koncentracija FSH i AMH te broja antralnih folikula i dobi pacijentice (Mohiyiddeen i sur., 2012). Do sličnih se spoznaja došlo istraživanjem koje je obuhvatilo 259 pacijentica od kojih su 162 bile u postupku COS; zaključeno je da SNP-ovi, p.Asn680Ser, p.Ala189Val, p.Thr449Ile i p.Ile160Thr nemaju važnost u predikciji odgovora na COS, što je također u suglasju s rezultatima predstavljenog istraživanja (Binder i sur., 2012).

Kad je ispitana povezanost dobi ispitanica i genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ s brojem dobivenih oocita, došlo se do neočekivanog rezultata; u skupini mlađih ispitanica (< 32 godine) genotipa SS uočen je statistički značajno veći broj oocita, dok je kod starijih ispitanica (< 36 god.), neovisno o genotipu broj oocita bio manji. Pomnim proučavanjem oskudne literature jedini slični rezultati opisani su u studiji Sheikhha MH i suradnika koji su našli značajnu povezanost prekomjernog odgovora jajnika u mlađih pacijentica s SS genotipom (Sheikhha i sur., 2011).

Utjecaj indeksa tjelesne mase na ishod izvantjelesne oplodnje općenito nije razjašnjen. U ovom ispitivanju utvrđena je statistički značajna interakcija genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i BMI s brojem dobivenih oocita, odnosno nađeno je da je veći broj oocita dobiven kod homozigota (bilo NN ili SS) s normalnom tjelesnom masom, dok je kod ispitanica s genotipom NS veći broj oocita dobiven u ispitanica s BMI > 25. Slična analiza do danas nije provedena, no rezultati dobiveni po pitanju povezanosti samo broja dobivenih oocita i indeksa tjelesne mase u skladu su s velikim brojem studija koje nemaju jednoznačne zaključke. Novije istraživanje Micah i sur koje je uključilo 117 neplodnih ispitanica nije ustanovilo

nikakvu razliku u uspjehu postupka IVF kod ispitanica s povišenim indeksom tjelesne mase. Utvrđena je pozitivna korelacija između BMI i broja folikula koji su aspirirani te negativna korelacija između BMI i iskorištenih ampula gonadotropina kao i trajanja stimulacije, međutim nije utvrđena statistički značajna razlika po pitanju broja dobivenih oocita između dvije ispitavane skupine (BMI > 25 i BMI < 25). Zaključeno je da žene s višim BMI proizvode više folikula, brže reagiraju na terapiju i zahtjevaju manje ampula gonadotropina u postupku IVF, no da razlike u BMI nemaju znakovitog utjecaja na ishod samog postupka po pitanju ostvarenih trudnoća (Hill i sur., 2011). Istraživanje Beydoun i suradnika nije utvrdilo povezanost BMI i broja oplodjenih zrelih oocita kao ni stope trudnoće, spontanih pobačaja ili živorođene djece te je istaknuto da BMI ne utječe na uspješnost postupka IVF (Beydoun i sur., 2009). Suprotno tome, više ispitivanja utvrdilo je da postoji znakovit negativan utjecaj višeg BMI na ishod IVF, pa je tako studijom koja je obuhvatila 130 ispitanica mlađih od 40 godina u 180 stimuliranih ciklusa utvrđeno da su u skupini žena s BMI > 25 bazalna koncentracija FSH, stopa implantacije i stopa trudnoća bile značajno niže, a trajanje stimulacije, broj potrošenih ampula gonadotropina i broj spontanih pobačaja znakovito viši u usporedbi sa skupinom pacijentica s BMI < 25. Zanimljivo je da se skupine nisu razlikovale po broju dobivenih oocita. (Loveland i sur., 2001). Retrospektivna analiza vrijednosti BMI kod 920 ispitanica mlađih od 40 godina u klasičnoj stimulaciji "dugim protokolom", od kojih je 140 klasificirano pretilim (BMI > 27) pokazala je da su pretile ispitanice češće imale prekid stimulacije zbog nereagiranja, dok nije bilo razlike u odnosu na količinu potrošenih ampula gonadotropina, ali je dobiveno značajno manje oocita te su vršne koncentracije estradiola (izmjerene na dan primjene hCG) bile niže u odnosu na pacijentice s BMI < 27. Uprkos slabijem odgovoru na stimulaciju stopa ostvarenih trudnoća se nije razlikovala između dvije proučavane skupine (Spandorfer i sur., 2004). Studija koja je obuhvatila 100 pacijentica pokazala je da je BMI > 26 povezan s većim brojem potrošenih ampula gonadotropina, manjim brojem dobivenih oocita, slabijom fertilizacijom oocita nakon oplodnje izvan tijela te slabijom stopom ostvarenih trudnoća (Salha i sur., 2001).

U ovom ispitivanju nije dokazan mogući utjecaj interakcije bazalne koncentracije FSH (skupine F1: FSH ≤ 10 i F2: FSH > 10) i genotipova za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ (NN, NS, SS) na broj oocita. Kao što je već spomenuto, u prethodnim je istraživanjima utvrđena razlika u vrijednostima bazalne koncentracije FSH po skupinama s različitim genotipom (više koncentracije bFSH u skupini s genotipom SS) (Jun i sur., 2006; Perez Mayorga i sur., 2000), no niti u jednoj studiji do danas nije ispitana povezanost bFSH i različitog genotipa te

konačnog broja dobivenih oocita. Slično tome, pregledom literature nije nađeno istraživanje odnosa genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i omjera bazalnih koncentracija FSH/LH u odnosu na broj dobivenih oocita. U predstavljenom istraživanju nije utvrđena interakcija za ove parametre. Također nije utvrđena povezanost genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i različitih terapija za COS s brojem dobivenih oocita, no uočeno je da je najveći broj oocita dobiven kod ispitanica s genotipom SS koje su bile na terapiji 3 ($9,2 \pm 1,42$). Do sličnog se zaključka došlo analizom povezanosti genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ i dobi s brojem dobivenih oocita; premda nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina, najveći broj oocita dobiven je kod mladih ispitanica (< 32 godine) genotipa SS ($11,2 \pm 1,53$). Također, nije utvrđena povezanost pojedine terapije, indeksa tjelesne mase i broja dobivenih oocita, kao ni pojedine terapije i bazalne koncentracije FSH, odnosno omjera bazalnih koncentracija FSH i LH s brojem dobivenih oocita. Metodološki najbližije ispitivanje je ono Yoo-a i suradnika koji su retrospektivno analizirali ishode 389 pokušaja izvantjelesne oplodnje kod 285 ispitanica koje su bile definirane kao POR s FSH > 12 ili < 3 dobivene oocite ili s koncentracijom E2 na dan primjene hCG < 500 ng/L (Yoo i sur., 2011). Uspoređeni su ishodi 119 ciklusa s blagom stimulacijom (5 dana klomifen citrat od 3. dana ciklusa, potom gonadotropini (< 225 IU) i antagonisti GnRH svakodnevno do dana primjene hCG) s 270 ciklusa s dugim protokolom stimulacije, a ispitanice su dodatno podijeljene prema dobi (≤ 37 ili > 37 godina). U skupini ispitanica podvrgnutih blagoj stimulaciji uz kraće trajanje stimulacije utvrđeno je da je količina potrošenih gonadotropina bila manja, serumska koncentracija estradiola na dan primjene hCG niža te je broj dobivenih oocita bio manji. Ipak, nije bilo statistički značajne razlike između skupina po pitanju broja kvalitetnih zametaka i stope uspješnosti postupka (izražena kao broj ostvarenih trudnoća). Premda bez statistički značajne razlike, zanimljivo je da je stopa ostvarenih trudnoća bila viša u skupini pacijentica starijih od 37 koje su bile podvrgnute blagom protokolu.

Kako bi se pridonijelo boljem razumijevanju povezanosti određivanih parametara i broja dobivenih oocita u radu je učinjena analiza korelacija te je utvrđeno da su od parametara određivanih u ciklusu koji prethodi COS u obrnutoj korelaciji s brojem oocita dob, BMI i bazalna koncentracija FSH, dok je broj antralnih folikula u izravnoj korelaciji. To znači da mlađe ispitanice, s nižim indeksom tjelesne mase i nižom bazalnom koncentracijom FSH te one koje imaju veći broj antralnih folikula imaju veću vjerojatnost da će uz COS imati veći broj dobivenih oocita. Od parametara određivanih 7. dana ciklusa sa COS s brojem oocita u korelaciji je koncentracija E2. Uz to, utvrđeno je da s porastom koncentracija prolaktina i E2

određenih na dan primjene hCG raste i broj oocita. Najjača korelacija između broja oocita i ispitivanih parametara dokazana je za koncentraciju E2 izmjerenu na dan primjene hCG ($r = 0,734$) i broj antralnih folikula ($r = 0,646$). Od posebnog su interesa rezultati dobiveni za parametre određivane prije postupka COS jer bi upravo oni mogli biti dobre smjernice za primjenu odgovarajuće terapije. Kad je promatrana veza ispitivanih parametara i broja dobivenih oocita unutar skupina ispitanica s različitim genotipom za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰, uočeno je da korelacija unutar sve 3 skupine postoji samo kod koncentracije E2 7. dana i na dan primjene hCG, dok je korelacija za ostale parametre uočena samo u pojedinim skupinama po genotipovima. U skupini ispitanica s genotipom NN jedini neovisni prediktor visokog broja oocita bila je koncentracija E2 na dan primjene hCG, u skupini ispitanica s genotipom NS broj antralnih folikula i koncentracija E2 na dan primjene hCG, dok su u skupini ispitanica s genotipom SS broj antralnih folikula i koncentracija E2 7. dana i na dan primjene hCG. Slična analiza do danas nije provedena, pa su ovi rezultati vrijedan temelj za daljnja istraživanja kojima bi se u konačnici mogla evaluirati vrijednost određivanja genotipa za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu FSHR.

Provedena su brojna su istraživanja kojima se pokušao identificirati najbolji prediktor odgovora na COS u postupku izvantjelesne oplodnje, odnosno krajnjeg ishoda postupka, rođenja živog i zdravog djeteta. Nakon opsežnog retrospektivnog istraživanja 806 stimuliranih ciklusa Pal i suradnici su zaključili da je najbolji prediktor konačnog uspjeha izvantjelesne oplodnje dob žene i to neovisno o svim ostalim bazalnim hormonskim parametrima (Pal i sur., 2008). Prema toj studiji mlađe žene s višim bazalnim koncentracijama FSH, nižim koncentracijama AMH i manjim brojem antralnih folikula imaju veću šansu za konačni uspjeh od starijih žena s boljim gore navedenim parametrima. Zaključeno je također da povećavanje koncentracije gonadotropina koji se koriste u postupku u žena s prethodno procijenjenom slabijom rezervom jajnika ne pridonosi krajnjem uspjehu jer nema učinka na dobiveni broj kvalitetnih jajnih stanica, zametaka i konačno na ostvarenje trudnoće. Povećavanje koncentracije ordiniranih gonadotropina ne nadoknađuje predvidivo loš odgovor na COS, a znakovito povećava cijenu, ali i rizičnost postupka (Pal i sur., 2008). I u ovom je radu dob prepoznata kao je značajan prediktor odgovora jajnika na COS, ali određenu su značajnost pokazali i indeks tjelesne mase, bazalne koncentracija FSH, TSH i E2, koncentracija E2 mjerena 7. dan ciklusa i na dan primjene hCG, koncentracija prolaktina na dan primjene hCG te broj antralnih folikula. Znanstvenici i kliničari koje se bave neplodnošću

upozoravaju da slabljenje plodnosti počinje u ranim tridesetim godinama života žene te da prevalencija neplodnosti znakovito raste nakon 35 godine života. Smatra se da je 99% žena starijih od 45 godina neplodno (de Carvalho i sur., 2008).

Vrijednost bazalne koncentracije FSH kao samostalnog prediktora ocjene odgovora na COS ovisi o graničnoj vrijednosti (eng. *cut off*) koje su različito postavljene od studije do studije. Usporedno s višom zadanom graničnom vrijednošću bFSH raste specifičnost, ali pada osjetljivost i obrnuto, a što je zadana granična vrijednost bFSH niža pada specifičnost, a raste osjetljivost. Ispitivanjem 344 ciklusa za pokušaj izvantjelesne oplodnje Sharif i suradnici su dobili različite rezultate prediktivnosti za iste pacijentice ovisno o postavljenoj graničnoj koncentraciji bFSH. Kada je granična vrijednost koncentracije bFSH postavljena 5,4 IU/L osjetljivost je bila 0,91, a specifičnost 0,12, a kad je bila 10,8 IU/L osjetljivost je bila 0,31, a specifičnost 0,93 (Sharif i sur., 1998). Druga je pak studija koja je uključila 58 ciklusa, sa zadanom graničnom koncentracijom bFSH od 7 IU/L polučila identičnu specifičnost i osjetljivost od 0,76 za bFSH kao samostalni prediktor za ocjenu odgovora jajnika na COS (Ficicioglu i sur., 2003). Analizom rezultata 110 ciklusa COS i postavljanjem granične vrijednosti koncentracije bFSH na 8 IU/L Kwee i suradnici su dobili osjetljivost od 0,72 i specifičnost od 0,78 (Kwee i sur., 2003). U predstavljenom prospektivnom istraživanju kao granična koncentracija bFSH koja bi mogla razlučiti ispitanice s lošim odgovorom na COS (< 4 dobivene oocite) od onih s dobrim odgovorom (≥ 4) je dobivena 7,6 IU/L, što je slično rezultatima iz prethodne dvije navedene studije. U ispitivanju Zhena i suradnika na 472 ispitanice u postupku COS bazalna koncentracija FSH pokazala se kao najbolji individualni biljeg ovarijske rezerve, bolji od dobi pacijentice (Zhen i sur., 2008).

U predstavljenom je istraživanju izračunata AUC vrijednost za ROC krivulju za bazalnu koncentraciju FSH koja iznosi 0,620 uz statističku značajnost $p < 0,05$ te osjetljivost 0,55 i specifičnost 0,70, što je značajno manje od vrijednosti dobivenih u studiji Bancsija i suradnika gdje AUC za ROC iznosi 0,84 (Bancsi i sur., 2002), ali što bazalnu koncentraciju FSH svakako kvalificira kao jedan od vrijednih prediktora odgovora na COS.

Bliska povezanost FSH i LH za vrijeme rane i kasne folikularne faze upućuju na zaključak da ne samo bazalna koncentracija FSH već i LH može imati ulogu u procjeni ovarijske rezerve i mogućeg odgovora na COS. Luteinizirajući hormon ima ulogu u kontroli i selekciji dominantnog folikula, ali bi mogao imati i utjecaja na indukciju manjih folikula u kasnoj folikularnoj fazi. U ovom istraživanju nije nađena znakovita povezanost bazalne koncentracije LH s brojem dobivenih oocita te nije identificirana kao potencijalni prediktor odgovora na

COS, što odgovara rezultatima prethodnih prospektivnih i retrospektivnih studija (Popovic-Todorovic i sur., 2003; Weghofer i Feichtinger, 2006). U studiji Weghofer i suradnika retrospektivno je analiziran ishod COS (praćen kao broj dobivenih oocita) kod 632 pacijentice u odnosu na dob, bazalnu koncentraciju FSH i LH te omjer bFSH/bLH te je utvrđeno da postoji znakovita korelacija dobi, bFSH i bFSH/bLH na broj dobivenih oocita, ali ne i izoliranog bLH s brojem dobivenih oocita (Weghofer i Feichtinger, 2006). U ovom radu nije nađena statistički značajna povezanost omjera bFSH/bLH i broja dobivenih oocita nakon COS te ovaj parametar nije identificiran kao potencijalni prediktor odgovora na COS. Broj studija koje se bave utjecajem odnosa bFSH/bLH nije velik. Retrospektivno ispitivanje koje je uključilo 125 ispitanica u postupku COS nije uspjelo dokazati da bi omjer bFSH/bLH bio koristan parametar za predikciju ishoda postupka pomognute oplodnje niti za odabir stimulacijskog protokola u neplodnih pacijentica (Yang i sur., 1997). Moguća vrijednost omjera bFSH/bLH za procjenu funkcije jajnika proučavana je u prethodno spomenutoj studiji Weghofer i suradnika u kojoj je pokazana povezanost omjera bFSH/bLH i broja dobivenih oocita. Slabiji odgovor jajnika može se očekivati u slučaju kombinacije višeg bFSH i niskog bLH, dok je viši bLH kod ispitanica koje imaju viši bFSH dobar prognostički biljeg u smislu većeg broja dobivenih oocita, neovisno o dobi ispitanica, pa je predloženo dodavanje LH u kasnijoj fazi stimulacije u slučajevima s navedenim omjerom bFSH/bLH (Weghofer i Feichtinger, 2006). Do sličnog su zaključka došli Ho i suradnici koji smatraju da je omjer FSH/LH > 3 povezan s malim brojem dobivenih oocita, no kako je u ovoj studiji omjer FSH/LH izračunat na temelju vrijednosti FSH i LH izmjerenih nakon što su ispitanice već desetak dana bile pod terapijom agonistima GnRH rezultati nisu izravno uporedivi s predstavljenim ispitivanjem (Ho i sur., 2005). Zaključak istraživanja provedenog na 472 pacijentice u svrhu određivanja mogućih parametara za ocjenu očekivanog lošeg odgovora na COS jest da postoji znakovita povezanost očekivanog lošeg odgovora ukoliko je bazalna koncentracija bFSH viša, broj antralnih folikula niži, ali i omjer bFSH/bLH veći. Loš odgovor jajnika povezan je s dobi, prethodnim operacijskim postupcima na jajnicima, brojem iskorištenih ampula gonadotropina i s vršnom koncentracijom E2, na dan primjene hCG (Zhen i sur., 2008).

Prema nekim studijama bazalna koncentracija estradiola može pridonijeti kvalitetnijoj ocjeni ovarijske rezerve. Smatra se da su bazalne koncentracije estradiola < 20 ng/L ili > 80 ng/L indikacija za nezapočinjanje COS zbog mogućeg nereagiranja na terapiju (Frattarelli i sur., 2000). Stoga se određivanje bazalne koncentracije estradiola preporučuje uz određivanje

bazalne koncentracije FSH, s obzirom na to da vrijednost koncentracije estradiola omogućava smanjenje lažno-negativne procjene donesene samo na temelju bFSH; ukoliko su i bFSH i bE2 povišene izvjestan je loš odgovor jajnika na COS (Speroff i Fritz, 2005). S obzirom na to da je utvrđeno da ispitanice s istim bazalnim vrijednostima estradiola mogu imati različit odgovor na COS, smatra se da izolirana vrijednost bazalne koncentracije estradiola ne može biti neovisan prediktor odgovora jajnika na COS (Ficicioglu i sur., 2006). U predstavljenom je istraživanju bazalna koncentracija estradiola prepoznata kao jedan od mogućih predikora lošeg odgovora na COS jer je vrijednost AUC za ROC krivulju iznosila 0,68 uz $p < 0,05$, osjetljivost 0,71 i specifičnost 0,70, al ne i kao nezavisan prediktor. Smatra se također da je bazalna koncentracija estradiola koristan indikator za započinjanje postupka COS, no nema vrijednost kao prediktor odgovora jajnika na COS (Ramalho de Carvalho i sur., 2012).

Poznato je da koncentracija prolaktina raste u stimuliranim ciklusima s obzirom na to da gonadotropini stimuliraju laktotrofe u hipofizi na pojačano stvaranje prolaktina. Istraživanja o povezanosti bazalne koncentracije prolaktina i ishoda COS relativno je oskudan, no može se smatrati da povišena koncentracija bazalnog prolaktina ne utječe na broj dobivenih oocita, kao niti na kvalitetu zametaka i konačan ishod postupka (Chang i sur., 1993; Cramer i sur., 2003; Hummel i sur., 1990; Piekos i sur., 1995) Zbog navedenog određivanje koncentracije prolaktina u postupku COS ne pobuđuje značajniji interes istraživača, pa praktički ne postoje novije studije o mogućoj prediktivnoj vrijednosti prolaktina za uspješnost COS. Crosignani i suradnici su utvrdili da ispitanice u postupku stimulacije s prethodnom primjenom agonista GnRH s ciljem rane supresije skoka LH imaju znakovito više vrijednosti prolaktina za vrijeme stimulacije gonadotropinima (Crosignani i sur., 1991). U ovom istraživanju nije nađena značajna razlika između srednje vrijednosti koncentracija prolaktina između skupina T1 i T2 (COS uz agonist) i skupine T3 (COS uz antagonist). Mendes i suradnici smatraju da tranzitorno povišenje koncentracije prolaktina za vrijeme COS može biti povezano s većim brojem folikula > 12 mm i više dobivenih oocita (Mendes i sur., 2001). Rezultati ovog rada u suglasju su s tim rezultatima jer je kod ispitanica s manjim brojem oocita utvrđena niža koncentracija prolaktina. Ipak, utvrđeno je, također, da bazalna koncentracija nema prediktivnu vrijednost za loš odgovor jajnika na COS. U smislu konačne potvrde ovih rezultata, bit će potrebno obaviti više prospektivnih studija s većim brojem ispitanica kako bi se konačno procijenila prediktivna vrijednost bazalne koncentracije prolaktina za procjenu odgovora jajnika na COS.

Bazalna se koncentracija TSH u literaturi ne spominje kao mogući prediktor odgovora jajnika na COS. Premda njezine vrijednosti ne koreliraju s ishodom COS, zapaženo je da žene sa značajno višim bazalnim koncentracijama TSH imaju znatno više oocita koje se ne fertiliziraju nakon postupka oplodnje izvan tijela (Cramer i sur., 2003). Novije retrospektivno ispitivanje nije našlo znakovitu razliku u ishodu COS i izvantjelesne oplodnje između skupina ispitanica sa zadanim graničnim vrijednostima bazalne koncentracije TSH $< 2,5$ mIU/L i TSH $< 4,5$ mIU/L (Reh i sur., 2010). Suplementacija levotiroksinom pacijenticama s graničnim hipotireoidizmom ne pridonosi poboljšanju ishoda COS i izvantjelesne oplodnje jer pacijentice koje imaju disfunkciju štitnjače imaju slabiju stopu implantacije i kliničkih trudnoća (Scoccia i sur., 2012). Smatra se da kontrolirana stimulacija jajnika utječe na povišenje serumske koncentracije TSH (Mintziori i sur., 2011), a to je posebice izraženo kod pacijentica s preegzistentnim hipotireoidizmom (Gracia i sur., 2012). Autori se slažu da su neophodne daljnje prospektivne studije koje bi pružile uvjerljive dokaze za nužnost obrade funkcije štitnjače prije i tijekom COS. Do danas nije provedeno istraživanje kojim bi se procijenila prediktivna vrijednost bazalne koncentracije TSH za procjenu odgovora na COS, pa su rezultati ovog ispitivanja koji upućuju da bi bazalna koncentracija TSH bila mogući prediktor odgovora jajnika na COS temelj za daljnje studije. Utvrđeno je da bazalna koncentracija TSH nije nezavisni prediktor lošeg odgovora na COS, ali AUC vrijednost za ROC krivulju iznosi 0,653 uz $p < 0,05$ te osjetljivost 0,70 i specifičnost 0,56.

Danas se broj antralnih folikula smatra jednim od boljih prediktora odgovora jajnika na COS jer je utvrđeno da značajno korelira s brojem dobivenih oocita nakon COS. Rezultati ovog ispitivanja sukladni su zaključcima brojnih studija koja povezuju broj antralnih folikula s brojem dobivenih oocita nakon COS (Bancsi i sur., 2002; de Carvalho i sur., 2008; Frattarelli i sur., 2000; Hendriks i sur., 2007; Jayaprakasan i sur., 2010; Muttukrishna i sur., 2005). Prospektivnom studijom koja je obuhvatila 110 ispitanica koji su podvrgnute COS utvrđeno je da je broj antralnih folikula superioran ili po vrijednosti barem jednak svim proučavanim endokrinim parametrima u predikciji odgovora na COS (Kwee i sur., 2007). Zaključak meta-analize Verhagena i suradnika je bio da broj antralnih folikula ima jednako dobru prediktivnu vrijednost kao i multifaktorski model ocjene mogućeg lošeg odgovora na COS, pa stoga broj antralnih folikula treba smatrati prvim izborom za ocjenu smanjene ovarijske rezerve (Verhagen i sur., 2008). Prospektivnim istraživanjem koje je uključilo 336 pacijentica uključenih u prvi pokušaj COS potvrđeni su rezultati prethodnih studija koje povezuju

bazalnu koncentraciju FSH i AMH te broj antralnih folikula s dobi pacijentice. Bazalna koncentracija AMH i broj antralnih folikula imali su veću prediktivnu vrijednost za procjenu ovarijske rezerve u odnosu na izoliranu vrijednost bazalne koncentracije FSH ili dobi pacijentice te je zaključeno da koncentracija AMH i broj antralnih folikula mogu koristiti za procjenu ovarijske rezerve sa sličnom razinom značajnosti (Lee i sur., 2009). U ovom istraživanju broj antralnih folikula pokazao se se kao najbolji neovisni prediktor odgovora jajnika na COS jer je vrijednost AUC za ROC krivulju iznosila 0,838 uz $p < 0,05$, osjetljivost 0,73 i specifičnost 0,85. Smatra se da broj antralnih folikula kao neovisni prediktor ima najbolji potencijal otkrivanja lošeg odgovora jajnika na COS; Bancsi i suradnici utvrdili su da je AUC za ROC krivulju 0,87, premda bez statističke značajnosti u odnosu na prediktivnu snagu bFSH čija je AUC iznosila 0,84. Uključivanjem bFSH i inhibina B AUC se povećala na 0,90, dok ostale mjerene varijable (bE2, dob, volumen jajnika) uključivanjem u model predikcije nisu pridonijele boljem rezultatu. Autori su predložili formulu za objektivizaciju predikcije lošeg odgovora na COS:

PRSc („poor response score“)= $(12 \times \text{FSH IU/L}) - (14 \times \text{AFC n}) - (1 \times \text{inhibin B pg/ml})$

čime je moguće procijeniti mogućnost lošeg odgovora jajnika na COS (Bancsi i sur., 2002).

U ovom su radu dobiveni slični rezultati; broj antralnih folikula je identificiran kao najbolji neovisni prediktor odgovora jajnika na COS AUC 0,84, bazalne koncentracije FSH, E2 i TSH imaju slabiju, ali još uvijek statistički značajnu dijagnostičku točnost, dok bazalne koncentracije prolaktina i BMI nemaju statistički znakovitu točnost u predikciji odgovora na COS. Zanimljivi su podaci dobiveni za prediktivnu vrijednost dobi; premda s malom osjetljivošću od 0,38, ali s najvećom specifičnošću od 0,89, AUC za ROC krivulju iznosila je 0,86 uz $p < 0,05$. Uključivanjem svih potencijalnih prediktora koji su prehodnom analizom identificirani (dob, bazalne koncentracije FSH, E2 i TSH te broj antralnih folikula) utvrđeno je da je zajednička dijagnostička točnost veća od pojedinačne te da AUC iznosi 0,89, a što je sličan rezultat prethodno navedene studije koja je uključila bazalne koncentracije FSH i inhibina B te broj antralnih folikula, u kojoj je AUC iznosio 0,90 (Bancsi i sur., 2002). Multivarijantne analize za predikciju lošeg odgovora jajnika na COS kombiniraju različite parametre, pa je tako ispitana mogućnost predikcije kombiniranim vrijednostima bazalnih koncentracije FSH i inhibina B, ali je zaključeno da ovakav test ima nisku osjetljivost (Fabregues i sur., 2000). Ispitivanje kojim je vrednovana kombinacija bazalnih koncentracija FSH, inhibina B i AMH pokazalo je dobru specifičnost od 0,91, ali lošiju osjetljivost od 0,69 (van Rooij IA et al, 2006.). Nedavna prospektivna studija koja je obuhvatila 135 ispitanica u

prvom pokušaju COS pokazala je da su bazalna koncentracija AMH i broj antralnih folikula najbolji prediktori odgovora na COS s AUC od 0,935 za AFC i 0,905 za koncentraciju AMH uz osjetljivost i specifičnost predikcije 0,93 i 0,88 za broj antralnih folikula i 1,00 i 0,73 za bAMH. Kombinirani test broja antralnih folikula i bAMH nije značajno poboljšao razinu predikcije (AUC = 0,946) (Jayaprakasan i sur., 2010). Prospektivnom studijom Al-Azemia i suradnika ispitana je prediktivna vrijednost bazalne koncentracije FSH, inhibina B i AMH te dobi pacijentice za očekivani odgovor na COS te je utvrđeno da kombinacijom navedenih parametara AUC iznosi 0,819 dok je za izolirane parametre AUC iznosio 0,827 za AMH; 0,721 za bFSH; 0,686 za inhibin B i 0,676 za dob (Al-Azemi i sur., 2011).

Osim procjene vrijednosti parametara koji su određivani u ciklusu koji prethodi COS kao prediktora odgovora jajnika, u ovom je radu analizirana vrijednost parametara mjerenih 7. dana stimuliranog ciklusa i na dan primjene hCG, prolaktina i estradiola. Utvrđeno je da koncentracija E2 7. dan ima prihvatljivu sposobnost otkrivanja lošeg odgovora na COS s AUC = 0,828, specifičnošću 0,70 i osjetljivošću 0,85 ukoliko se optimalna granična vrijednost vrijednost postavi 1455,1 IU/L. Nekoliko studija pokušalo je definirati korisnost mjerenja estradiola kao prediktora odgovora jajnika nakon što je COS započeta. U jednoj od njih koncentracija E2 mjerena četvrti dan COS prepoznata je kao značajni prediktor uspješnosti postupka uz graničnu vrijednost od 75 pg/ml (275 pmol/L) (Phelps i sur., 1998). Zanimljiva su opažanja Mitwallya i suradnika koji su pokazali da AUC za koncentraciju E2 tijekom trajanja stimulacije ne odražava primjereno vršnu koncentraciju E2 na dan primjene hCG (Mitwally i sur., 2005), te da ciklusi imaju znakovito manju uspješnost ostvarenih trudnoća kod žena starijih od 35 godina neovisno o vrijednosti AUC za koncentraciju E2, a da je pozitivna korelacija između AUC za koncentraciju E2 s ostvarenom stopom trudnoća prisutna do određene granice iznad koje se javlja negativna korelacija (Mitwally i sur., 2006). Već spomenuta studija Miao i suradnika došla je do zaključka da određivanje koncentracije E2 i inhibina B u ranoj fazi COS mogu ponuditi preciznu i točnu ranu predikciju odgovora jajnika na COS te tako pridonijeti pravovremenoj prilagodbi terapije, a kako bi se smanjio rizik lošeg odgovora jajnika odnosno hiperstimulacije (Miao i Huang, 2009).

Prediktivna vrijednost koncentracije prolaktina 7. dana stimulacije nije se pokazala iznimno značajnom (AUC = 0,66, specifičnost 0,83 i osjetljivost 0,62) što je dijelom sukladno prethodnim studijama koje tranzitorno povišenje koncentracije prolaktina za vrijeme COS ne smatraju bitnim za ishod pomognute oplodnje (Chang i sur., 1993; Merari i sur., 1992; Piekos i sur., 1995).

Dobiveni rezultati prema kojima koncentracija E2 izmjerena na dan primjene hCG ima odličnu sposobnost predikcije lošeg odgovora na COS (AUC = 0,91, specifičnost 0,78, osjetljivost 0,91) u skladu su s istraživanjima koja povezuju vrijednost serumske koncentracije E2 s brojem dobivenih oocita, ali i s krajnjim ishodom postupka izvantjelesne oplodnje (Balasch i sur., 1995; Bianco i sur., 2009). U retrospektivnoj studiji Jooa i suradnika obrađeni su podaci iz 455 ciklusa COS u kojem su ispitanice na temelju koncentracije E2 na dan primjene hCG podijene u 5 skupina (skupina A < 1000 pg/ml, B 1000-2000 pg/ml, C 2000-3000 pg/ml, D 3000-4000 pg/ml i E > 4000 pg/ml). Utvrđeno je da je broj dobivenih oocita pozitivno korelirao s koncentracijom E2 te da je konačni ishod postupka izvantjelesne oplodnje bio značajno bolji u skupini D u odnosu na skupine B i C. Premda je skupina E imala najvišu koncentraciju E2 na dan primjene hCG i najviše dobivenih oocita, klinička je stopa trudnoća bila značajno manja nego u skupini D pa je kao optimalna vrijednost E2 na dan primjene hCG, u smislu predikcije uspješnosti postupka IVF za žene mlađe od 38 godina predložena 3000-4000 pg/ml, a za starije od 38 godina 2000-3000 pg/ml (Joo i sur., 2010). Previsoke koncentracije E2 mnogi autori smatraju nepovoljnima za implantaciju, a istraživanja potvrđuju lošije ishode postupaka kod žena s prekomjernim brojem dobivenih oocita (Kosmas i sur., 2004; van der Gaast i sur., 2006).

Pregledom dostupne literature, nije nađena studija procjene vrijednosti koncentracije prolaktina na dan primjene hCG. Prema dobivenim rezultatima moguće je zaključiti da taj parametar usprkos statističkoj značajnosti $p < 0,05$ nema značajnu prediktivnu vrijednost za procjenu odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, obzirom na to da je AUC iznosio 0,644, uz specifičnost 0,69 i osjetljivost 0,60. Studija u kojoj je koncentracija prolaktina mjerena 36 sati, 12 sati, 10 minuta prije te 12 sati nakon primjene hCG nije pokazala značajnu razliku u koncentraciji prolaktina između trudnih žena i žena kod kojih trudnoća nije bila ostvarena (Chang i sur., 1993). Uporedba koncentracije prolaktina u ranoj lutealnoj fazi i ishoda izvantjelesne oplodnje nije pokazala značajnu razliku između trudnih i netrudnih ispitanica (Balasch i sur., 1995).

Kako su dob i indeks tjelesne mase prepoznati kao čimbenici koji utječu na odgovor jajnika na COS u ovom se istraživanju pokušalo utvrditi koji bi od mjerenih parametara mogao biti bolji prediktor odgovora jajnika, upravo kod ispitanica koje spadaju u "nerizičnu skupinu", odnosno kod onih koje su mlađe od 36 godina i čiji je indeks tjelesne mase < 25. Stoga je učinjena istovrsna analiza kojom je ustanovljeno da samo dva parametra imaju statističku značajnost kao mogući prediktori odgovora na COS: broj antralnih folikula i koncentracija E2

na dan primjene hCG. Jedino broj antralnih folikula od svih parametara koji su određivani u ciklusu koji prethodni COS ima prihvatljivu dijagnostičku točnost za procjenu odgovora na COS (AUC = 0,742, specifičnost 0,65, osjetljivost 0,84), dok estradiol ima slab dijagnostički potencijal (AUC = 0,645 specifičnost 0,76, osjetljivost 0,53). Rezultati studije u kojoj je procjenjivana prediktivna vrijednost bazalnih parametara za procjenu uspješnosti pomognute oplodnje a ispitanice podijeljene na mlađe i starije od 35 godina, pokazali su da bazalne koncentracije hormona nemaju prediktivnu vrijednost za ishod pomognute oplodnje u skupini ispitanica mlađih od 35 godina (Lee i sur., 2009). U mlađoj dobnoj skupini kao najbolji prediktor pokazao se broj antralnih folikula, a što je sukladno rezultatima ove studije.

I za ovu je skupinu ispitanica procijenjena prediktivna vrijednost koncentracija E2 i prolaktina izmjerene 7. dan COS i na dan primjene hCG. Koncentracija E2 7. dana ima prihvatljivu sposobnost u identifikaciji lošeg odgovora na COS (AUC = 0,702), dok koncentracija prolaktina ima nešto lošiju dijagnostičku točnost (AUC = 0,667). Zajednički učinak ovih vrijednosti nešto je veći od pojedinačnog (AUC = 0,738) te bi možda mogao imati klinički značaj u predviđanju ishoda COS što bi moglo utjecati na promjenu, odnosno prilagodbu terapije. Vrijednosti za dijagnostičku točnost koncentracije E2 na dan primjene hCG bile su, kao što je za očekivati, bolje nego 7. dana COS (AUC = 0,777), ali je koncentracija prolaktina imala čak nešto lošiju dijagnostičku točnost (AUC = 0,648). Kao i u prethodnom slučaju kombiniranjem ovih vrijednosti dijagnostička se točnost povećava te AUC iznosi 0,788.

Rezultati ove studiji ne samo da nisu potvrdili postavljenu tezu da žene s genotipom Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ imaju veću predispoziciju za loš odgovor jajnika na COS, već je na temelju njih moguće pretpostaviti da su žene mlađe od 32 godine s tim genotipom sklonije prekomjernoj reakciji jajnika na COS. Statistički je stoga detaljnije analizirana skupina žena s genotipom SS (N=49) koja je podijeljena prema bazalnoj koncentraciji FSH ($\leq 7,6$ IU/L i $> 7,6$ IU/L) i prema dobi (≤ 36 i > 36 godina). Analizom nije utvrđena statistički značajna razlika bazalne koncentracije po dobnim skupinama, čak ni kada su ispitanice prema dobi podijeljene u 3 skupine (< 32 , $32 - 36$ i > 36 godina). Ipak, zanimljivo je primjetiti da je broj dobivenih oocita u skupini ispitanica mlađih od 36 godina bio veći u kada je bFSH $\leq 7,6$ IU/L, dok je kod starijih od 36 godina, bio veći u skupini s bFSH $> 7,6$ IU/L. Kad je analizirana povezanost bazalne koncentracije FSH s odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju definiranog kroz broj dobivenih oocita (ispitanice su podijeljene u skupinu *poor responders* – broj dobivenih oocita 0 – 3 i ostale – broj dobivenih oocita ≥ 4 utvrđena je statistički značajna razlika između skupina. Bazalna koncentracija FSH bila je statistički značajno viša u skupini

ispitanica sa slabim odgovorom jajnika na kontroliranu stimulaciju ($p = 0,026$). Statističkom se analizom pokušalo ispitati hoće li se na temelju bFSH moći prepoznati ispitanice s pojačanim odgovorom na COS (broj dobivenih oocita ≤ 12 i > 12), no nije utvrđena značajna razlika između skupina s bFSH $\leq 7,6$ IU/L i $> 7,6$ IU/L. Prema literaturi, različite su procjene o predispoziciji žena s genotipom SS za loš odgovor na COS. Prvi radovi su zaključivali da su žene s genotipom SS sklone lošijem odgovoru na COS (Jun i sur., 2006; Loutradis i sur., 2006a; Perez Mayorga i sur., 2000; Sudo i sur., 2002), međutim novije studije upućuju na zaključak da genotip za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ne utječe na odgovor jajnika na COS (Binder i sur., 2012; Mohiyiddeen i Nardo, 2010). Novija literatura također izjednačava mogućnost lošeg odgovora na COS kod osoba s homozigotnim oblikom (SS i NN) (Loutradis i sur., 2012) dok neki autori smatraju da je bolji ishod izvantjelesne oplodnje moguće očekivati kod žena s genotipom SS (Klinkert i sur., 2006). Zanimljivo je spomenuti studiju koja žene s genotipom SS povezuje sa neprimjerenim odgovorom na stimulaciju, od kojih čak 53,3% prekomjerno reagira na COS, dok tek 46,7% loše reagira na COS, no treba naglasiti da je prosječna dob skupine s genotipom SS u tom istraživanju 28 godina (Sheikhha i sur., 2011). Raznolikost rezultata svakako zaslužuje pažnju te su nužna daljnja ispitivanja posebice mladih žena koje su kandidati za prekomjeran odgovor jajnika i moguću hiperstimulaciju.

Odabir terapije za prvi pokušaj COS za postupak izvantjelesne oplodnje ovisi o individualnim osobinama pacijentice, dobi, anamnezi, hormonskom statusu, ultrazvučnom nalazu i uzroku neplodnosti, ali i o kliničkom iskustvu liječnika. Dilema postoji u odabiru gonadotropina i načina supresije LH: agonistima ili antagonistima. Brojna su istraživanja zaključila da su rezultati neovisno o odabranom gonadotropinu ili agonistu/antagonistu slični te da je za odabir prvog pokušaja COS važan individualan pristup svakoj pacijentici (Bosch i sur., 2008; Engel i sur., 2006). U literaturi za sada ne postoji model odabira optimalne terapije utemeljen na parametrima određenim prije COS. Stoga se na temelju dobivenih rezultata u ovom radu pokušalo definirati takav model, ali se on zbog relativno malog broja ispitanica oslonio na samo 2 parametra: bazalnu koncentraciju FSH i dob ispitanice. Ispitanice su prvo podijeljene na 2 skupine prema bazalnoj koncentraciji FSH ($\leq 7,6$ IU/L i $> 7,6$ IU/L), a zatim po dobi (< 32 , $32 - 36$, i > 36 godina). Statistički značajna razlika utvrđena je za skupinu čija je bFSH $\leq 7,6$ IU/L, a dob $32 - 36$ godina, te je utvrđeno da se najbolji rezultati postižu s "dugim protokolom" (svakodnevnim korištenjem agonista GnRH od 21. dana ciklusa koji prethodi COS te s 225 IU rFSH od 2. dana menstruacijskog ciklusa svakodnevno do primjene hCG

(8,0 oocita). Ista se terapija pokazala najboljom u skupini ispitanica s bFSH > 7,6 IU/L i dobi < 32 godine. Ovakav pristup mogao bi uvelike pridonijeti odabiru optimalne terapije za prvi pokušaj COS i to na specifičan način koji uključuje dob žene te bazalnu koncentraciju FSH. Svakako da bi uključivanje i drugih parametara, posebice broja antralnih folikula, značajno pridonijelo vrijednosti ovakvih modela no potrebno je provesti studiju na puno većem broju ispitanica kako bi dobiveni rezultati imali što veći klinički značaj.

Polimorfizmi receptora hormona uključenih u regulaciju reprodukcije neprekidan su predmet znanstvenih i kliničkih istraživanja. Od svih do danas otkrivenih SNP najveću pozornost plijeni SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu za *FSHR*, premda novije istraživanje uz navedeni SNP predlaže i genotipizaciju polimorfizama u receptorima za estrogene (ESR1 Pvu II i ESR2 Rsa) s ciljem što bolje predikcije odgovora na COS (Anagnostou i sur., 2012). Kao mogući kandidati spominju se SNP u genima za AMH i njegov receptor, premda je nedavno istraživanje utvrdilo da ove genske varijante nemaju prediktivnu vrijednost za odgovor na COS (Hanevik i sur., 2010). Krajnji cilj farmakogenomike jest klinička uporaba rutinski određenih genetskih markera za predviđanje odgovora jajnika, kao i odabir adekvatne terapije prije uvođenja pacijentica u COS, no kako bi se takvi biljezi identificirali i validirali, nužno je provesti što veći broj sustavnih istraživanja koje će uključiti što veći broj ispitanica kako bi se došlo do konačnog odgovora o vrijednosti pojedinog biljega. Rezultati predstavljenog istraživanja nisu potvrdili vrijednost genotipizacije SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ za predviđanje ishoda COS, ali su pridonijeli vrednovanju klasičnih biokemijskih parametara i broja antralnih folikula za procjenu ovarijske rezerve. Zaključci ove studije sukladni su zaključcima nedavne meta-analize kojom je utvrđeno da nema jasne kliničke učinkovitosti probira populacije na SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u smislu procjene ovarijske rezerve i individualizacije doze FSH (Mohiyiddeen i sur., 2012). Ipak, ostaje mogućnost da genotipizacija SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ kod mlađih ispitanica s genotipom p.Ser680Ser može predvidjeti odgovor na COS, ali potrebne su studije na većem broju ispitanica kako bi se ova hipoteza potvrdila. Uz to, pretpostavljen je mogući model za što bolji odabir terapije na osnovi dobi žene i bazalnoj koncentraciji FSH u smislu postizanja boljeg odgovora na COS.

5 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- hipoteza da ispitanice genotipa Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ imaju predispoziciju za lošiji odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju nije dokazana
- genotip za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ u genu *FSHR* nije dobar prediktor ovarijske rezerve niti odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, pa se genskim probirom ne mogu jednoznačno identificirati ispitanice s mogućim lošijim odgovorom na COS
- genotipizacija za SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ima potencijalnu vrijednost za identifikaciju ispitanica mlađe dobi koje su predisponirane za pojačan odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju
- najbolji samostalni prediktor ovarijske rezerve i dobrog odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika mjeren prije započinjanja COS je broj antralnih folikula
- predikcijski model formiran na temelju parametara određenih prije početka COS (broj antralnih folikula, dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, E2 i THS) zbog svoje dijagnostičke točnosti veće od dijagnostičke točnosti broja antralnih folikula (AUC 0,89 vs. 0,84) može značajno pridonijeti procjeni odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju
- koncentracija E2 izmjerena na dan primjene hCG uz veliku dijagnostičku točnost (AUC = 0,91) najbolji je neovisni prediktor odgovora na COS

6 POPIS LITERATURE

- Aittomaki K, Bergh C, Hazekamp J, Nygren KG, Selbing A, Soderstrom-Anttila V, Wennerholm UB. Genetics and assisted reproduction technology. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005, 84, 463-73.
- Al-Azemi M, Killick SR, Duffy S, Pye C, Refaat B, Hill N, Ledger W. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction. *Hum Reprod*, 2011, 26, 414-22.
- Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7, 101.
- Anagnostou E, Mavrogianni D, Theofanakis C, Drakakis P, Bletsas R, Demiroglu A, Gurgan T, Antsaklis A, Loutradis D. ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a useful genetic tool for the prediction of poor responders. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13, 426-34.
- Anderson RA, Nelson SM, Wallace WH. Measuring anti-Mullerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? *Maturitas*, 2012, 71, 28-33.
- Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet*, 2005, 91, 53-7.
- Balash J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Penarrubia J, Rivera F, Vanrell JA. Hormonal profiles in successful and unsuccessful implantation in IVF-ET after combined GnRH agonist/gonadotropin treatment for superovulation and hCG luteal support. *Gynecol Endocrinol*, 1995, 9, 51-8.
- Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2002, 77, 328-36.
- Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Age-specific levels for basal follicle-stimulating hormone assessment of ovarian function. *Obstet Gynecol*, 2007, 109, 1404-10.
- Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P, Seliger E, Ropke F, Gromoll J, Nieschlag E, Simoni M. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics*, 2005, 15, 451-6.

- Beydoun HA, Stadtmauer L, Beydoun MA, Russell H, Zhao Y, Oehninger S. Polycystic ovary syndrome, body mass index and outcomes of assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18, 856-63.
- Bianco K, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D, Taylor HS. Effect of estradiol on oocyte development. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, 104, 230-2.
- Binder H, Dittrich R, Einhaus F, Krieg J, Muller A, Strauss R, Beckmann MW, Cupisti S. Update on ovarian hyperstimulation syndrome: Part 1--Incidence and pathogenesis. *Int J Fertil Womens Med*, 2007, 52, 11-26.
- Binder H, Dittrich R, Hager I, Muller A, Oeser S, Beckmann MW, Hamori M, Fasching PA, Strick R. Association of FSH receptor and CYP19A1 gene variations with sterility and ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproduction*, 2008, 135, 107-16.
- Binder H, Strick R, Zaherdoust O, Dittrich R, Hamori M, Beckmann MW, Oppelt PG. Assessment of FSHR variants and antimullerian hormone in infertility patients with a reduced ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril*, 2012, 97, 1169-1175 e1.
- Bosch E, Vidal C, Labarta E, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists--a randomized study. *Hum Reprod*, 2008, 23, 2346-51.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006, 12, 685-718.
- Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*, 2009, 30, 465-93.
- Caroppo E, Matteo M, Schonauer LM, Vizziello G, Pasquadibisceglie A, Vitti A, D'Amato G. Basal FSH concentration as a predictor of IVF outcome in older women undergoing stimulation with GnRH antagonist. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13, 815-20.
- Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*, 1998, 69, 505-10.
- Chang SP, Ng HT, Lan TL, Chao HT, Wei TC, Yang TS, Ou-Yang XR. Transient hyperprolactinemia in gonadotropin-stimulated cycles for in vitro fertilization and its effect on conception. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 1993, 51, 401-6.
- Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1999, 51, 97-9.

- Cramer DW, Sluss PM, Powers RD, McShane P, Ginsburgs ES, Hornstein MD, Vitonis AF, Barbieri RL. Serum prolactin and TSH in an in vitro fertilization population: is there a link between fertilization and thyroid function? *J Assist Reprod Genet*, 2003, 20, 210-5.
- Crosignani PG, Maini MC, Negri E, Ragni G. Human prolactin release induced by follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin. *Hum Reprod*, 1991, 6, 1070-3.
- Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, Delbaere A. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89, 6310-5.
- de Carvalho BR, Rosa-e-Silva AC, Rosa-e-Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, de Sa MF. Anti-mullerian hormone is the best predictor of poor response in ICSI cycles of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2011, 38, 119-22.
- de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sa MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25, 311-22.
- de Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galan JJ, Hernandez DP, Padilla ES, Ramirez-Lorca R, Real LM, Ruiz A. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics*, 2004, 14, 285-93.
- de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez-Hernandez D, Sanchez-Casas Padilla E, Real LM, Ruiz A. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*, 2003, 80, 571-6.
- Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? II. A biochemical point of view. *Hum Reprod*, 2001, 16, 825-30.
- Dias JA, Van Roey P. Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch Med Res*, 2001, 32, 510-9.
- Engel JB, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R, Diedrich K. GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13, 84-7.
- Fabregues F, Balasch J, Creus M, Carmona F, Puerto B, Quinto L, Casamitjana R, Vanrell JA. Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet*, 2000, 17, 13-9.
- Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005, 84, 806-11.

- Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 2005, 433, 269-77.
- Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod*, 2005, 20, 923-7.
- Fauser BC. Preimplantation genetic screening: the end of an affair? *Hum Reprod*, 2008, 23, 2622-5.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, 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, 1616-24.
- Ficicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2006, 85, 592-6.
- Ficicioglu C, Kutlu T, Demirbasoglu S, Mulayim B. The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve. *Gynecol Endocrinol*, 2003, 17, 287-93.
- Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*, 2000, 74, 518-24.
- Fukuda J, Kumagai J, Kodama H, Murata M, Kawamura K, Tanaka T. Upper limit of the number of IVF-ET treatment cycles in different age groups, predicted by cumulative take-home baby rate. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001, 80, 71-3.
- Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod*, 2008, 23, 1359-65.
- Gracia CR, Morse CB, Chan G, Schilling S, Prewitt M, Sammel MD, Mandel SJ. Thyroid function during controlled ovarian hyperstimulation as part of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2012, 97, 585-91.
- Greb RR, Behre HM, Simoni M. Pharmacogenetics in ovarian stimulation - current concepts and future options. *Reprod Biomed Online*, 2005a, 11, 589-600.
- Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L, Simoni M. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005b, 90, 4866-72.
- Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16, 368-73.

- Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EM, Groenewoud ER, Heineman MJ, Hoek A. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod*, 2007, 22, 1925-31.
- Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. Single nucleotide polymorphisms in the anti-Mullerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21, 616-23.
- Heckert LL, Griswold MD. Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol*, 1991, 5, 670-7.
- Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*, 2007, 87, 764-75.
- Hill MJ, Hong S, Frattarelli JL. Body mass index impacts in vitro fertilization stimulation. *ISRN Obstet Gynecol*, 2011, 2011, 929251.
- Ho JY, Guu HF, Yi YC, Chen MJ, Ho ES. The serum follicle-stimulating hormone-to-luteinizing hormone ratio at the start of stimulation with gonadotropins after pituitary down-regulation is inversely correlated with a mature oocyte yield and can predict "low responders". *Fertil Steril*, 2005, 83, 883-8.
- Hummel WP, Clark MR, Talbert LM. Transient hyperprolactinemia during cycle stimulation and its influence on oocyte retrieval and fertilization rates. *Fertil Steril*, 1990, 53, 677-81.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal*, 2006, 18, 1351-9.
- Jayaprakasan K, Deb S, Batcha M, Hopkisson J, Johnson I, Campbell B, Raine-Fenning N. The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Mullerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*, 2010, 94, 1775-81.
- Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89, 6155-67.
- Joo BS, Park SH, An BM, Kim KS, Moon SE, Moon HS. Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner. *Fertil Steril*, 2010, 93, 442-6.
- Jun JK, Yoon JS, Ku SY, Choi YM, Hwang KR, Park SY, Lee GH, Lee WD, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian

- responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet*, 2006, 51, 665-70.
- Kelly MJ, Qiu J. Estrogen signaling in hypothalamic circuits controlling reproduction. *Brain Res*, 2010, 1364, 44-52.
- Kiapekou E, Loutradis D, Mastorakos G, Bletsas R, Beretsos P, Zapanti E, Drakakis P, Antsaklis A, Kiessling AA. Effect of PRL on in vitro follicle growth, in vitro oocyte maturation, fertilization and early embryonic development in mice. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11, 293-300.
- Kligman I, Rosenwaks Z. Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders. *Fertil Steril*, 2001, 76, 1185-90.
- Klinkert ER, te Velde ER, Weima S, van Zandvoort PM, Hanssen RG, Nilsson PR, de Jong FH, Looman CW, Broekmans FJ. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13, 687-95.
- Kosmas IP, Kolibianakis EM, Devroey P. Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: a systematic review. *Hum Reprod*, 2004, 19, 2446-53.
- Kuijper EA, Blankenstein MA, Lutikhof LJ, Roek SJ, Overbeek A, Hompes PG, Twisk JW, Lambalk CB. Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity. *Reprod Biomed Online*, 2011, 22 Suppl 1, S60-5.
- Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007, 5, 9.
- Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod*, 2003, 18, 1422-7.
- Lalioti MD. Impact of follicle stimulating hormone receptor variants in fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2011, 23, 158-67.
- Lass A. Assessment of ovarian reserve - is there a role for ovarian biopsy? *Hum Reprod*, 2001, 16, 1055-7.
- Laven JS, Mulders AG, Suryandari DA, Gromoll J, Nieschlag E, Fauser BC, Simoni M. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. *Fertil Steril*, 2003, 80, 986-92.

- Lee TH, Liu CH, Huang CC, Hsieh KC, Lin PM, Lee MS. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7, 100.
- Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Arch Med Res*, 1999, 30, 486-94.
- Livshyts G, Podlesnaja S, Kravchenko S, Sudoma I, Livshits L. A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. *J Assist Reprod Genet*, 2009, 26, 29-34.
- Loutradis D, Patsoula E, Minas V, Koussidis GA, Antsaklis A, Michalas S, Makrigiannakis A. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Genet*, 2006a, 23, 177-84.
- Loutradis D, Patsoula E, Stefanidis K, Drakakis P, Antonakis G, Bletsas R, Antsaklis A, Michalas S. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecol Obstet Invest*, 2006b, 61, 56-60.
- Loutradis D, Theofanakis C, Anagnostou E, Mavrogianni D, Partsinevelos GA. Genetic profile of SNP(s) and ovulation induction. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13, 417-25.
- Loutradis D, Vlismas A, Drakakis P, Antsaklis A. Pharmacogenetics in ovarian stimulation--current concepts. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1127, 10-9.
- Loveland JB, McClamrock HD, Malinow AM, Sharara FI. Increased body mass index has a deleterious effect on in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet*, 2001, 18, 382-6.
- Lussiana C, Guani B, Mari C, Restagno G, Massobrio M, Revelli A. Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene. *Obstet Gynecol Surv*, 2008, 63, 785-95.
- Meduri G, Bachelot A, Cocca MP, Vasseur C, Rodien P, Kuttann F, Touraine P, Misrahi M. Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 282, 130-42.
- Mendes MC, Ferriani RA, Sala MM, Moura MD, Carrara HH, de Sa MF. Effect of transitory hyperprolactinemia on in vitro fertilization of human oocytes. *J Reprod Med*, 2001, 46, 444-50.
- Merari D, Feldberg D, Elizur A, Goldman J, Modan B. Psychological and hormonal changes in the course of in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 1992, 9, 161-9.

- Miao MF, Huang HF. Dynamic measurements of serum inhibin B and estradiol: a predictive evaluation of ovarian response to gonadotrophin stimulation in the early stage of IVF treatment. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10, 35-45.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M, Minegishi T. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175, 1125-30.
- Mintziori G, Goulis DG, Toulis KA, Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzis BC. Thyroid function during ovarian stimulation: a systematic review. *Fertil Steril*, 2011, 96, 780-5.
- Mitwally MF, Bhakoo HS, Crickard K, Sullivan MW, Batt RE, Yeh J. Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 2006, 86, 588-96.
- Mitwally MF, Bhakoo HS, Crickard K, Sullivan MW, Batt RE, Yehl J. Area under the curve for estradiol levels do not consistently reflect estradiol levels on the day of hCG administration in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, 2005, 22, 57-63.
- Mohiyiddeen L, Nardo LG. Single-nucleotide polymorphisms in the FSH receptor gene and ovarian performance: future role in IVF. *Hum Fertil (Camb)*, 2010, 13, 72-8.
- Mohiyiddeen L, Newman WG, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo LG. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertil Steril*, 2012, 97, 677-81.
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG*, 2005, 112, 1384-90.
- Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT, Jr., Garrisi GJ, Hofmann GE. Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril*, 1994, 61, 97-101.
- Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimullerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril*, 2010, 93, 1356-8.
- Olive DL, Palter SP. Reproductive Physiology. U: *Berek & Novak's Gynecology*. Berek JS, urednik, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, str. 141-184.
- Pal L, Jindal S, Witt BR, Santoro N. Less is more: increased gonadotropin use for ovarian stimulation adversely influences clinical pregnancy and live birth after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2008, 89, 1694-701.

- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85, 3365-9.
- Perlman S, Bouquin T, van den Hazel B, Jensen TH, Schambye HT, Knudsen S, Okkels JS. Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes. *Mol Hum Reprod*, 2006, 12, 135-44.
- Pfeifer M. Hiperprolaktinemija. U: *Neplodnost*. Meden-Vrtovec H, urednik, Ljubljana, Cankarjeva založba, 1989, str. 166-171.
- Phelps JY, Levine AS, Hickman TN, Zacur HA, Wallach EE, Hinton EL. Day 4 estradiol levels predict pregnancy success in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Fertil Steril*, 1998, 69, 1015-9.
- Piekos MW, Binor Z, Rawlins RG, Radwanska E. Effects of induced hyperprolactinemia on in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*, 1995, 63, 371-6.
- Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsboll S, Andersson AM, Andersen AN. A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standard' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. *Hum Reprod*, 2003, 18, 781-7.
- Poppe K, Glinoeer D, Tournaye H, Devroey P, Velkeniers B. Impact of the ovarian hyperstimulation syndrome on thyroid function. *Thyroid*, 2008, 18, 801-2.
- Poppe K, Velkeniers B, Glinoeer D. Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, 66, 309-21.
- Ramalho de Carvalho B, Gomes Sobrinho DB, Vieira AD, Resende MP, Barbosa AC, Silva AA, Nakagava HM. Ovarian reserve assessment for infertility investigation. *ISRN Obstet Gynecol*, 2012, 2012, 576385.
- Reh A, Grifo J, Danoff A. What is a normal thyroid-stimulating hormone (TSH) level? Effects of stricter TSH thresholds on pregnancy outcomes after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2010, 94, 2920-2.
- Rizk B. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Genetics of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19, 14-27.
- Rousseau-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics*, 1993, 15, 222-4.
- Salha O, Dada T, Sharma V. Influence of body mass index and self-administration of hCG on the outcome of IVF cycles: a prospective cohort study. *Hum Fertil (Camb)*, 2001, 4, 37-42.

- Santoro N, Brown JR, Adel T, Skurnick JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 1495-501.
- Scoccia B, Demir H, Kang Y, Fierro MA, Winston NJ. In Vitro Fertilization Pregnancy Rates in Levothyroxine-Treated Women With Hypothyroidism Compared to Women Without Thyroid Dysfunction Disorders. *Thyroid*, 2012,
- Shaker AG, Fleming R, Jamieson ME, Yates RW, Coutts JR. Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders. *Fertil Steril*, 1992, 58, 919-23.
- Shalev E, Leung PC. Gonadotropin-releasing hormone and reproductive medicine. *J Obstet Gynaecol Can*, 2003, 25, 98-113.
- Sharif K, Elgendy M, Lashen H, Afnan M. Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilisation outcome. *Br J Obstet Gynaecol*, 1998, 105, 107-12.
- Sheikhha MH, Eftekhar M, Kalantar SM. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *J Hum Reprod Sci*, 2011, 4, 86-90.
- Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 146, 30-6.
- Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update*, 2008, 14, 459-84.
- Spandorfer SD, Kump L, Goldschlag D, Brodtkin T, Davis OK, Rosenwaks Z. Obesity and in vitro fertilization: negative influences on outcome. *J Reprod Med*, 2004, 49, 973-7.
- Speroff L, Fritz MA. Female infertility. U: *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Speroff L, Fritz MA, urednici, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, str. 1015-1022.
- Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8, 893-9.
- Sundblad V, Chiauzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 222, 53-9.
- Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Mendoza C. Beneficial effect of luteal-phase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist- and antagonist-treated ovarian stimulation cycles. *Hum Reprod*, 2006, 21, 2572-9.

- Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 94, 109-13.
- Tong Y, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Absence of mutations in the coding regions of follicle-stimulating hormone receptor gene in Singapore Chinese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res*, 2001, 33, 221-6.
- Toth TL, Awwad JT, Veeck LL, Jones HW, Jr., Muasher SJ. Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist. Use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program. *J Reprod Med*, 1996, 41, 321-6.
- van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC, Macklon NS. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13, 476-80.
- van Wely M, Kwan I, Burt AL, Thomas J, Vail A, Van der Veen F, Al-Inany HG. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, CD005354.
- Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzi TB, Tarlatzis BC. Evidence-based management of poor ovarian response. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1205, 199-206.
- Verhagen TE, Hendriks DJ, Bancsi LF, Mol BW, Broekmans FJ. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2008, 14, 95-100.
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 2006, 131, 1-9.
- Watt AH, Legedza AT, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 2000, 17, 264-8.
- Weghofer A, Feichtinger W. The forgotten variable: impact of luteinizing hormone on the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2006, 85, 259-61.
- Wunsch A, Sonntag B, Simoni M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2007, 68, 160-6.
- Yang JH, Wu MY, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Long GnRH-agonist protocol in an IVF program. Is it appropriate for women with normal FSH levels and high FSH/LH ratios? *J Reprod Med*, 1997, 42, 663-8.

- Yao Y, Ma CH, Tang HL, Hu YF. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: a meta-analysis. *Mol Genet Metab*, 2011, 103, 388-93.
- Yoo JH, Cha SH, Park CW, Kim JY, Yang KM, Song IO, Koong MK, Kang IS, Kim HO. Serum anti-Mullerian hormone is a better predictor of ovarian response than FSH and age in IVF patients with endometriosis. *Clin Exp Reprod Med*, 2011, 38, 222-7.
- Zhen XM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. The clinical analysis of poor ovarian response in in-vitro-fertilization embryo-transfer among Chinese couples. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25, 17-22.

7 POPIS KRATICA I SIMBOLA

ACTH	adrenokortikotropni hormon (<i>eng.</i> adrenocorticotropic hormone)
AIH	inseminacija sjemenom partnera (<i>eng.</i> artificial insemination by husband/variation human)
Ala	alanin
Arg	arginin
ART	pomognuta oplodnja (<i>eng.</i> assisted reproductive technology, ART)
Asn	aspargin
bFSH	bazalna koncentracija FSH
blH	bazalna koncentracija LH
BMI	indeks tjelesne mase (<i>eng.</i> body mass indeks)
COS	kontrolirana stimulacija janika (<i>eng.</i> controlled ovarian stimulation)
CRH	hormon koji oslobađa kortikotropin (<i>eng.</i> corticotropin releasing hormone)
dNTP	deoksinukleotid-trifosfat
E2	estradiol
FSH	folikul stimulirajući hormon
FSHR	receptor za FSH
GH	hormon rasta (<i>eng.</i> growth hormone)
GHRH	hormon koji oslobađa hormon rasta (<i>eng.</i> growth hormone releasing hormone)
GnRH	hormon koji oslobađa gonadotropine (<i>eng.</i> gonadotrophin releasing hormone)
hCG	humani korionski gonadotropin (<i>eng.</i> human chorionic gonadotropin)
ICSI	intracitoplazmatsko injiciranje spermija (<i>eng.</i> intracytoplasmic sperm injection)
IVF	izvantjelesna oplodne (<i>eng.</i> in vitro fertilisation)
kDa	kilodalton
LH	luteinizirajući hormon
PRL	prolaktin
Pro	prolin
rFSH	rekombinantni FSH
Ser	serin
Thr	treonin (<i>eng.</i> threonine)
THR	hormon koji otpušta tireotropin (<i>eng.</i> thyreotropin releasing hormone)
TSH	hormon koji stimulira tireoideu (<i>eng.</i> thyroid stimulating hormone)

8 ŽIVOTOPIS

Renato Bauman rođen je 3. ožujka 1965. godine u Zagrebu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1983. godine, a diplomirao u svibnju 1990. godine nakon što je odslužio obavezni vojni rok. Nakon jednogodišnjeg pripravničkog staža u KB "Sestre milosrdnice" u Zagrebu, stručni ispit položio je u siječnju 1992. godine. Po položenom ispitu dragovoljno je pristupio Hrvatskoj vojsci te je do svibnja 1992. godine bio liječnik 1. bojne 100. brigade HV (Banija, Nova Gradiška). Do studenog 1992. godine bio je zaposlen Domu zdravlja Đurđevac. Specijalizaciju iz ginekologije i porodništva u Klinici za ginekologiju i porodništvo OB "Sveti Duh" započeo je u studenom 1992. godine, a specijalistički ispit je položio u veljači 1997. godine. Nakon položenog specijalističkog ispita zaposlen je na Odjelu za ginekologiju i humanu reprodukciju gdje radi i danas. Od početka specijalističkog staža bavi se obradom i liječenjem neplodnosti što uključuje postupke pomognute reprodukcije i izvantjelesnu oplodnju, a od 2005. godine voditelj je tima. Aktivno sudjeluje i u radu operativnog dijela istog odjela unutar kojeg je zadužen za dijagnostičku i terapijsku endoskopsku kirurgiju.

Tijekom specijalizacije odslušao je postdiplomski studij "Ultrasound in clinical medicine" i 2000. godine obranio magistarski rad "Praćenje protoka krvi obojenim doplerom kroz krvne žile maternice abdominalnim, vaginalnim i transperinealnim pristupom", te stekao znanstveni stupanj magistar znanosti. Znanstvena aktivnost sakupljena je u 19 znanstvenih radova od kojih je 6 objavljeno u časopisima koje citira baza *Current Contents*. Aktivno je sudjelovao na brojnim znanstvenim skupovima predstavivši 12 posterskih priopćenja te održavši nekoliko pozvanih predavanja.

Uz klinički rad s pacijentima aktivno je uključen u edukaciju dodiplomskih studenata te pripravnika i specijalizanata. Kao predavač sudjeluje u tečajevima trajne edukacije te u održavanju teorijske i praktične nastave na poslijediplomskom studiju "Ultrazvuk u kliničkoj medicini".

Član je više znanstveno-stručnih društava. Autor je 15 poglavlja u knjigama.

Oženjen je i otac troje djece.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje citira baza *Current Contents*:

1. **Bauman R**, Mihaljevic, D, Kupesic S, Kurjak A. In vitro fertilization in spontaneous cycles – our experience. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002;102:184-187
2. Sparac V, Stilinovic K, Ilijas M, Barcot Z, Kupesic S, Prka M, **Bauman R**, Kurjak A. Vaginal aplasia associated with anatomically and functionally normal uterus. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 115:110-112
3. **Bauman R**, Vujisic S, Tripalo A, Aksamija A, Hafner D, Emedi I, Kupesic S. Influence of hormonal stimulation on in vitro fertilization/embryo transfer outcome. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005;119:94-102
4. Vujisic S, Stipoljev F, **Bauman R**, Dmitrovic R, Jezek D. Pericentric inversion of chromosome 2 in a patient with the empty follicle syndrome: Case report.. *Human Reproduction* 2005; 20(9): 2552-2555
5. Dmitrovic R, Klobucar A, **Bauman R**, Cvitkovic-Kuzmic A, Skalko D, Sonicki Z. Long term treatment with vaginal estradiol tablets-an impact on uterine artery blood flow. *Maturitas* 2005;11;50(4): 300-4
6. Vujisic S, Zidovec-Lepej S, Emedi I, **Bauman R**, Remenar A, Kujundzic Tiljak M. Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23. *Human Reproduction* 2006;21(10):2650-5

Ostali znanstveni radovi:

1. Mihaljevic D, Vujisic S, Kupesic S, **Bauman R**, Olujic B, Buljan J, Kurjak A. Učestalost opstetričkih komplikacija trudnoća začetih postupkom izvantjelesne oplodnje. *Gynaecologia et perinatologia* 2000; 9(3):94-97
2. Mihaljevic D, Vujisic S, Kupesic S, **Bauman R**, Kurjak A. Predviđanje ishoda postupka izvantjelesne oplodnje prema kvaliteti zametka i zrelosti sluznice materišta. *Gynaecologia et perinatologia* 2000; 9(1):7-11
3. **Bauman R**, Kupesic S, Kurjak A. Transperinealni i introitus ultrazvuk u obradi inkontinencije. *Glasnik Hrvatskog društva za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju i Hrvatskog društva za menopauzu – HLZ II* 2001;5: 8-12
4. **Bauman R**, Stilinovic K, Bekavac-Misak V, Vujisic S, Dmitrovic R, Ujevic B, Kupesic S. Prikaz teškog oblika sindroma hiperstimulacije jajnika u postupku pomognute oplodnje. *Gynaecologia et Perinatologia* 2004;13:89-91
5. Skenderović S, Kurjak A, Kupesic S, **Bauman R**, Prka M. Utjecaj histeroskopske metroplastike na nastanak, tijek i ishod trudnoće. *Gynaecologia et perinatologia* 2004;13(2): 52-61
7. **Bauman R**, Ilijas M, Hafner D, Ujevic B, Vujisic S, Stilinovic K, Sparac V, Kupesic S. Konzervativna terapija cervikalne trudnoće. *Gynaecologia et perinatologia* 2008;17:37-41
8. Habek D, Horvat G, Kulas T, Bednas-Janiska I, Stanojevic M, **Bauman R**, Hafner T. Refractory shoulder dystotia in term macrosomic newborn with verified complete meningoencephalomyelocele. *Central European Journal of Medicine* 2008;3(1):115-117
9. Horvat G, **Bauman R**, Vidović L, Ujević B, Mišković B. Ultrazvučna procjena duljine cerviksa transperinealnim putem u drugom i trećem trimestru trudnoće. *Gynaecologia et perinatologia* 2008;17:169-72
10. **Bauman R**. Obrada i terapija neplodnosti. *Medicina* 2009;4: 300-312
11. Hafner T, Ivković IE, Šerman A, **Bauman R**, Ujevic B, Vujisic S, Hafner D, Miskovic B. Modification of conservative treatment of heterotopic cervical pregnancy by Foley catheter balloon fixation with cerclage sutures at the level of the external cervical os: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2010;4:212
12. Habek D, Marton I, **Bauman R**, Prka M, Bobić MV. Ruptured ovarian metastatic malignant melanoma caused acute abdomen. *Central European Journal of Medicine* 2011;7(2): 241-244
13. Habek D, Ujević B, Turudić TP, **Bauman R**, Horvat G, Marton I. Laparoskopski asistirana neovaginoplastika po Davydovu. *Gynaecologia et Perinatologia* 2011;20(1):35-39

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

POVEZANOST POLIMORFIZMA Asn^{680}/Ser^{680} RECEPTORA ZA FSH I ODGOVORA NA KONTROLIRANU STIMULACIJU JAJNIKA KOD ŽENA U POSTUPKU IZVANTJELESNE OPLODNJE

Renato Bauman

Klinika za ginekologiju Kliničke bolnice "Sveti Duh", Zagreb

Uspješnost postupka izvantjelesne oplodnje (IVF) uvelike ovisi o odgovoru jajnika na kontroliranu stimulaciju čija se adekvatnost povezuje s prisutnošću polimorfizma 2039G>A u genu za receptor folikul stimulirajućeg hormona (FSHR) kao i bazalnom koncentracijom FSH, luteinizirajućeg hormona (LH), estradioala (E2), hormona koji stimulira tireoideu (TSH) i prolaktina. Polimorfizam jedne baze (SNP) rezultira zamjenom asparagina serinom na položaju 680 u FSHR (Asn^{680}/Ser^{680}). Kako bi se pridonijelo rasvjetljavanju korisnosti ovog polimorfizma u predviđanju odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, analiziran je genotip 211 žena podvrgnutih postupku izvantjelesne oplodnje te im je uz hormonski status određeni broj antralnih folikula. Primjenom odgovarajućih statističkih testova utvrđeno je da genotip za SNP Asn^{680}/Ser^{680} u genu *FSHR* nije dobar prediktor ovarijske rezerve niti odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju, pa se genskim probirom ne mogu jednoznačno identificirati ispitanice s mogućim lošijim odgovorom na COS. Ipak, nađeno je da genotipizacija za SNP Asn^{680}/Ser^{680} ima potencijalnu vrijednost za identifikaciju ispitanica mlađe dobi genotipa Ser^{680}/Ser^{680} koje su predisponirane za pojačan odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju. Utvrđeno je također, da je najbolji neovisan prediktor ovarijske rezerve i odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika (*eng.* controlled ovarian stimulation, COS) mjeran prije započinjanja terapije, broj antralnih folikula, a da predikcijski model formiran na temelju parametara određenih prije početka COS (broj antralnih folikula, dob, indeks tjelesne mase, bazalne koncentracije FSH, E2 i TSH) zbog svoje dijagnostičke točnosti veće od dijagnostičke točnosti broja antralnih folikula (AUC 0,89 vs. 0,84) može značajno pridonijeti procjeni odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju. Koncentracija E2 izmjerena na dan primjene humanog korionskog gonadotropina za stimulaciju ovulacije uz veliku dijagnostičku točnost (AUC = 0,91) najbolji je neovisni prediktor odgovora na COS.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 126 stranica, 19 slika, 38 tablica i 135 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: izvantjelesna oplodnja; receptor za folikul-stimulirajući hormon; polimorfizam jedne baze Asn^{680}/Ser^{680} u genu *FSHR*

Mentor: **Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić**, red. prof., *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tihana Žanić Grubišić**, red. prof., *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.

Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić, red. prof., *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.

Dr. sc. Dunja Rogić, znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Zagreb

Rad prihvaćen: 20. lipnja 2012. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

THE IMPACT OF FSH RECEPTOR POLIMORPHYSM Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ ON CONTROLLED OVARIAN STIMULATION RESPONSE IN WOMEN UNDERGOING IN VITRO FERTILISATION

Renato Bauman

Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital "Sveti Duh",
School of Medicine, University of Zagreb

The successfulness of the *in vitro* fertilization (IVF) largely depends on the women's response to the controlled ovarian stimulation which adequateness has been assumed to be connected to the single nucleotide polymorphism (SNP) 2039G>A in follicle-stimulating hormone receptor gene, as well as the basal concentration of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), thyroid-stimulating hormone (TSH) and prolactin. With the purpose to contribute to the evaluation of SNP 2039G>A in a prediction of ovarian response to the controlled stimulation, 211 women undergoing IVF were genotyped. In addition to the hormonal status determination, the number of antral follicles was estimated. Using appropriate statistical analyses it was found that genotype of SNP Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ in *FSHR* gene is neither a good predictor of ovarian reserve nor ovarian response to the controlled stimulation. Thus, genetic screening for poor responders to the controlled ovarian stimulation (COS) is not diagnostically valuable. However, it was found that genotyping of this SNP could be potentially useful for identification of women of younger age (< 32 years) with Ser⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ genotype predisposed for hyperresponse to the controlled stimulation. It was also found that the best independent predictor of ovarian reserve and response to COS determined before the therapy application is antral follicle count (AFC), while the prediction model formed of the parameters determined before the therapy application (AFC, age, body mass index, basal concentration of FSH, E2 and TSH) based on higher diagnostic accuracy than AFC (AUC 0,89 vs. 0,84) could significantly contribute to the prediction of ovarian response to COS. E2 concentration measured on the day of the application of human chorionic gonadotropine for the stimulation of ovulation with the highest diagnostic accuracy (AUC = 0,91) is the best independent predictor of ovarian response to the controlled stimulation.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

- Thesis includes: 126 pages, 19 figures, 38 tables and 135 references. Original is in Croatian language.
- Keywords: *in vitro* fertilisation; follicle stimulating hormone receptor, single nucleotide polymorphism Asn⁶⁸⁰/Ser⁶⁸⁰ *FSHR* gene
- Menthor: **Jerka Dumić Belamarić**, Ph.D. *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
- Reviewers: **Tihana Žanić Grubišić**, Ph.D. *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Jerka Dumić Belamarić, Ph.D. *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Dunja Rogić, Ph.D. *Assistant Professor, Clinical Hospital Centre Zagreb*

The thesis accepted: June 20, 2012.