

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jovana D. Radaković Ćosić

**EFEKTI KONTROLISANE OVARIJALNE
STIMULACIJE NA NIVO AZOT-MONOKSIDA
U SERUMU I FOLIKULARNOJ TEČNOSTI
PACIJENTKINJA U PROCESU
VANTELESNE OPLODNJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jovana D. Radaković Ćosić

**THE EFFECTS OF CONTROLLED OVARIAN
STIMULATION ON THE LEVEL OF NITRIC
OXIDE IN THE SERUM AND FOLLICULAR
FLUID OF FEMALE PATIENTS IN THE
PROCESS OF IN VITRO FERTILIZATION**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI:

Prof. dr Željko Miković, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, subspecialista perinatologije, Ginekološko-akušerska Klinika „Narodni Front”

Prim. dr sci. med. Milan Perović, viši naučni saradnik, klinički asistent, subspecialista fertiliteta i steriliteta, Ginekološko-akušerska Klinika „Narodni front”, Odeljenje za artificijalne reproduktivne tehnike sa dnevnom bolnicom

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata dr Jovane Radaković Ćosić, izabrana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetlana Dragojević Dikić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, Ginekološko-akušerska Klinika „Narodni Front”
2. Doc. dr Lidija Tulić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu, Klinički Centar Srbije, Klinika za ginekologiju i akušerstvo
3. Doc. dr Jovana Paunović Pantić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu, Institut za patološku fiziologiju
4. Esma Isenović, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za RS, Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Artur Bjelica, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Klinički centar Vojvodine, Klinika za ginekologiju i akušerstvo

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se svojim mentorima na nesebičnoj podršci, dragocenim savetima i entuzijazmu utkanom u redove ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se članovima komisije za ocenu doktorske disertacije na uloženom vremenu i strpljenju. Zahvaljujem se članovima laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Institutu od nacionalnog značaja za RS na podršci i velikoj pomoći. Zahvaljujem se svim lekarima, embriolozima i medicinskim sestrama odeljenja za arteficialne reproduktivne tehnike Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front” koji su mi pomogli na prvom koraku ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se kolektivu laboratorije odeljenja medicinske biohemije Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front”. Zahvaljujem se službi za naučno istraživački rad Medicinskog fakulteta u Beogradu na konstantnoj pomoći tokom svih ovih godina doktorskih akademskih studija.

Zahvaljujem svojim prijateljima za sav „vetar u leđa” koji dobijam kada pomislim da zastanem. Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici jer su verovali u mene sve ove godine i omogućili mi da uz njihovu svakodnevnu pomoć i razumevanje uspešno stignem do cilja.

Takođe se zahvaljujem koautorima u radovima koji su nastali kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

Naslov doktorske disertacije: „Efekti kontrolisane ovarijume stimulacije na nivo azot-monoksida u serumu i folikulskoj tečnosti pacijentkinja u procesu vantelesne oplodnje”

SAŽETAK

Uvod: Infertilitet predstavlja globalni, konstatno rastući zdravstveni problem koji obuhvata oko 9% parova. Jedna od asistiranih reproduktivnih tehnika za tretman infertilnih parova je i *in vitro* fertilizacija (IVF), koja se sprovodi u nekoliko faza. Kontrolisana ovarijalna stimulacija (KOS) je prva faza, čiji je cilj multifolikularni rast i maturacija što većeg broja jajnih ćelija koje će se nakon aspiracije podvrgnuti fertilizaciji, a sprovodi se različitim protokolima: dugim GnRH agonist i kratkim GnRH antagonist protokolima. Folikularna tečnost (FT) je mikrosredina za razvoj jajnih ćelija tokom procesa folikulogeneze i sadrži neophodne materije za sve faze razvoja jajnih ćelija. Sadržaj FT oslikava stadijum razvoja i maturacije folikula, tako da ispitivanje njenog sastava može ukazati na, kako maturaciju i kvalitet folikula, tako i kvalitet jajnih ćelija. Primena GnRHa/an u okviru protokola KOS uslovljava dinamične promene u sastavu FT, koja predstavlja svojevrsan inflamatorni odgovor organizma i jajnika na KOS, posmatran kroz promene u koncentraciji NO u serumu i FT.

Cilj: Cilj ove studije je analiza koncentracija serumskog NO pre KOS, kao i u serumu i FT posle KOS indukovane različitim protokolima u ispitivanoj populaciji i unutargrupno, kao i uticaja njihovih koncentracija na karakteristike aspiriranih jajnih ćelija, embriona, kao i ishoda IVF procedure u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.

Materijal i metode: Studija preseka je obuhvatila 94 infertilnih parova, podeljenih u dve grupe na osnovu primenjenog protokola KOS (dug, n=35; kratak, n=59), prosečnog trajanja infertiliteta 5 godina. Analizirane su vrednosti serumskog NO pre i nakon KOS, vrednosti NO u FT nakon KOS i vrednost serumskog E2. Kod svih ispitanica su praćene karakteristike jajnih ćelija (ukupan broj i broj kvalitetnih jajnih ćelija), embriona (broj dobijenih, kvalitetnih i vraćenih embriona), kao i ishodi IVF procedura (biohemijska, klinička trudnoća, klinička trudnoća nakon 12. nedelje gestacije, kao i stopa živorođene dece).

Rezultati: Prosečne vrednosti serumskog NO pre i nakon KOS, kao i u FT se razlikuju među protokolima KOS. Beleži se porast u prosečnim vrednostima serumskog NO nakon KOS u oba protokola. Bazalne vrednosti serumskog NO pre KOS, kao i vrednosti nakon KOS, ali i u FT su naglašenije u kratkom protokolu KOS u odnosu na dugi protokol. Beleži se pozitivan uticaj serumskog NO pre KOS na vrednosti serumskog NO posle KOS i vrednosti NO u FT, kao i pozitivan uticaj vrednosti serumskog NO nakon KOS na NO u FT u ispitivanoj populaciji. Nije zabeležena korelacija serumskog NO pre i nakon KOS i vrednosti NO u FT sa karakteristikama aspiriranih jajnih ćelija i dobijenih embriona, kao i ishodima IVF procedure u ispitivanoj populaciji. Unutargrupnom analizom se u obe grupe ispitanica tretiranih dugim i kratkim protokolima, izdvaja identično pozitivan uticaj serumskog NO pre KOS na vrednosti serumskog NO posle KOS i vrednosti NO u FT, kao i pozitivan uticaj vrednosti serumskog NO nakon KOS na NO u FT. Pozitivna korelacija vrednosti serumskog NO nakon KOS na NO u FT u ispitivanoj populaciji registruje se u grupi pacijentkinja sa dugim protokolom KOS, dok u grupi

žena sa kratkim protokolom KOS posmatrana korelacija je slaba i nije dostigla statističku značajnost. Kod ispitanica tretiranih dugim protokolom KOS nije zabeležena korelacija serumskog NO pre i nakon KOS i vrednosti NO u FT sa brojem i karakteristikama aspiriranih jajnih ćelija i dobijenih embriona, kao i ishoda IVF procedure. U grupi žena tretiranih kratkim protokolom KOS postoji pozitivna korelacija serumskih vrednosti NO posle KOS sa brojem dobijenih jajnih ćelija, brojem kvalitetnih jajnih ćelija i brojem dobijenih embriona, ali ne i dobijenih kvalitetnih embriona i ishoda IVF procedure. U ispitivanoj populaciji se registruje značajan negativan trend korelacije između vrednosti serumskog NO pre i nakon KOS i NO u FT sa vrednostima serumskog E2. Vrednosti serumskog E2 pozitivno koreliraju sa karakteristikama jajnih ćelija, kao i sa ukupnim brojem i brojem kvalitetnih, ali ne i vraćenih embriona, kao i ishoda IVF procedure u ispitivanoj populaciji. Unutargrupnom analizom, detektuje se da vrednosti serumskog E2 pozitivno korelišu samo sa brojem jajnih ćelija, ali ne i ostalim karakteristikama jajnih ćelija i embriona kod ispitanica tretiranih dugim protokolom. Kod ispitanica tretiranih kratkim protokolom, vrednosti serumskog E2 pozitivno korelišu sa svim karakteristikama jajnih ćelija i embriona.

Zaključak: Dokazano je postojanje jake pozitivne korelacije između serumskih vrednosti NO pre KOS i serumskih vrednosti NO nakon KOS u celokupnoj populaciji ispitanica, ali i unutargrupno. Jaka pozitivna korelacija je takođe zabeležena između serumskih vrednosti NO pre KOS i nivoa NO u FT, kako u celokupnoj populaciji, tako i u obe studijske podgrupe (ispitanice stimulisane kratkim GnRH antagonist i dugim GnRH agonist protokolom). Snačajna pozitivna korelacija postoji između serumskih vrednosti NO nakon KOS i broja dobijenih jajnih ćelija i dobijenih jajnih ćelija dobrog kvaliteta, kao i broja dobijenih embriona kod žena stimulisanih kratkim protokolom. Sastav komponenti seruma se menja tokom KOS, menjajući i sastav FT. Rezultati disertacije sugerišu da izbor protokola stimulacije utiče na ishod KOS i VTO. Nakon KOS u kratkom protokolu se ostvaruju serumski nivoi NO koji pozitivno koreliraju sa brojem dobijenih jajnih ćelija i dobijenih jajnih ćelija dobrog kvaliteta i brojem dobijenih embriona. Ukratko, praćenje nivoa serumskih vrednosti NO pre, tokom i nakon KOS može biti koristan prediktor ishoda KOS i VTO u savremenim programima asistiranih reproduktivnih tehnika. Takođe, sa ciljem postizanja željenih serumskih nivoa NO, a koje pozitivno korelišu sa nivoima estradiola i ishoda KOS i VTO, potrebno je koristiti GnRH antagonist protokole.

Ključne reči: neplodnost, vantelesna oplodnja, kontrolisana ovarijalna stimulacija, azot-monoksid, folikularna tečnost, oocite

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Ginekologija i akušerstvo

UDK broj: _____

Title of doctoral dissertation: „**The effects of controlled ovarian stimulation on the level of nitric oxide in the serum and follicular fluid of female patients in the process of in vitro fertilization**”

ABSTRACT

Introduction: Infertility is growing global health concern that affects approximately 9% of couples. In vitro fertilization (IVF) is method of assisted reproductive treatment (ART) used to treat infertile couples and it is performed through different stages. Controlled ovarian stimulation (COS) is the first phase, intending to induce multifollicular growth and to achieve multiple mature oocytes which later will undergo oocytes retrieval and fertilisation. There are several protocols for COS and most widely used are long agonist and short antagonist GnRH protocols. Follicular fluid (FF), as a microenvironment, contains all elements required for oocytes development throughout the process of folliculogenesis. Since the content of FF reflects the stages of development and maturation of both follicles and oocytes, its composition indicates the maturity and quality of follicles and the quality of oocytes. When GnRH_a and GnRH_{an} are used in the COS protocols, dynamic changes in the composition of FF occurs, and which are representing a type of inflammatory response in organism and ovaries. These inflammatory responses to COS could also be seen through changes of NO levels in serum and FF. This study aimed to evaluate NO levels in serum before and after COS and NO levels in FF after COS, and to compare changes in those levels induced by different COS protocols both in the entire study population and within the groups of study participants stimulated by long GnRH_a and short GnRH_{an} protocols. Furthermore, the study aimed to compare the effects of those levels on the characteristics of retrieved oocytes, obtained embryos, and the IVF outcomes both in in the entire study population and within the groups of study participants stimulated by long GnRH_a and short GnRH_{an} protocols.

Material and Methods: Based on the protocol of COS, the 94 infertile couples were enrolled in this cross-sectional study into two study groups (long agonist group, n=35; short antagonist group, n=59). We have measured serum NO levels before and after COS, and NO levels in FF after COS, as well as estradiol levels. Furthermore, we have evaluated the outcomes of COS and IVF, such as total number of retrieved oocytes, and number of retrieved good quality oocytes, total number of obtained embryos, and number of obtained good quality embryos, and number of transferred embryos, biochemical, clinical and ongoing pregnancy rates, and live birth rate.

Results: An average duration of infertility was 5 years. Mean serum NO levels before and after COS, and in FF after COS were different between study groups. In both study groups, increased serum NO levels after COS were observed. Initial serum NO levels before COS, then serum NO levels after COS and NO levels in FF after COS were significantly higher in group treated with short GnRH antagonist protocol compared to those treated with long GnRH agonist protocol. Positive correlation between serum NO levels before COS and serum NO levels after COS was detected. Furthermore, positive correlation between serum NO levels before COS and NO levels in FF was observed. In addition, positive correlation between serum NO levels after COS and NO levels in FF was observed. Positive correlation

between serum NO levels after COS and NO levels in FF was observed in group with long GnRH agonist protocol, while the observed correlation in short GnRH antagonist group was weak, without reaching the significant levels. In long GnRH agonist protocol group correlation between serum NO levels before and after COS and NO levels in FF on the one hand and number of retrieved oocytes, good quality oocytes, number of obtained embryos, good quality embryos and IVF outcomes (pregnancy and live birth rates) was not observed. However, in short GnRH antagonist group positive correlation between NO levels post COS with number of retrieved oocytes, good quality oocytes and the number of obtained embryos was found. Still, in the same group correlation between those NO levels on one hand and IVF outcomes on other hand was not found. In whole study population negative correlation between serum NO levels before and after COS and NO levels in FF on one hand and serum estradiol levels on the other hand was detected. Serum E2 levels after COS positively correlates with characteristics of retrieved oocytes (total number of retrieved oocytes, good quality oocytes, number of obtained embryos, good quality embryos and IVF outcomes (pregnancy and live birth rates)). Analysis performed in long GnRH agonist group revealed positive correlation only between E2 with total number of retrieved oocytes. In contrast, positive correlation between E2 levels and all outcomes (total number of oocytes, good quality oocytes, obtained embryos, good quality embryos, pregnancy and live birth rates) was detected.

Conclusions: Strong positive correlation between serum NO levels before COS and NO levels post COS was found in the entire study population but also in both study groups. Strong positive correlation between serum NO levels before COS and NO levels in FF was found in the entire study population but also in both study groups. Significant positive correlation was observed between serum NO levels post COS and number of retrieved oocytes, good quality oocytes and number of obtained embryos in short GnRH antagonist group. During COS, the composition of serum is changed, which causes the changes in FF. Our findings could suggest that type of applied protocol of COS could influence the COS and IVF outcomes. Furthermore, short GnRH antagonist protocol is achieving those serum NO levels after COS which positively correlate with number of retrieved oocytes, good quality oocytes and number of obtained embryos. To sum up, serum NO levels could be monitored in order to serve as predictor and indicator the outcomes of COS and IVF in the currently used assisted reproduction programs. Furthermore, in order to accomplish the preferred serum NO levels that positively correlates with estradiol levels and with COS and IVF outcomes, short GnRH antagonist protocols should be used.

Key words: infertility, in vitro fertilization, controlled ovarian stimulation, nitrogen monoxide, follicular texture, oocytes

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Gynecology and obstetrics

UDC number: _____

Spisak skraćenica

AFC - broj antralnih folikula

AMA - Američko medicinsko udruženje

ART - asistirana reproduktivna tehnologija

ASRM - Američko društvo za reproduktivnu medicine

bFGF - faktor rasta fibroblasta

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CC - cumulus oophorus cells

cGMP - ciklični guanozin monofosfat

COC - kumulus-oocitni kompleks

DDT - 1,1,1-trihloro-2,2,2-bis(p-hlorofenil)etan

ESHRE - Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju

FET - frozen embryo transfera

FSH - folikulostimulirajući hormon

FT - folikularna tečnost

GnRH - gonadotropin-oslobađajući hormon

GnRHa - GnRH agonisti

GnRHan – GnRH antagonisti

GV - germinativna vezikula

HR - high responder

ICMART - Međunarodni komitet za praćenje asistiranih reproduktivnih tehnologija

ICSI - intracitoplazmatska injekcija spermatozoida

IFFS - Međunarodna federacija društava za plodnost

ITM - index telesne mase

IUI - intrauterina inseminacija

IVF - in vitro fertilization

KOS - kontrolisana ovarijalna stimulacija

LH - luteinizirajući hormon

LNAME - N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester

MI - metafaza I
MII - metafaza II
NO - azot-monooksid
NOC12 - dietil-2-hidroksi-2-nitrozohidrazin
NOS - azot oksid sintaza
O₂⁻ - superoksid anjon
OHSS - sindrom hiperstimulacije jajnika
ONOO⁻ - peroksinitrit
PB - polar body
PCB - polihlorovani bifenili
PCOS - sindroma policističnih jajnika
PG - prostaglandini
PGC - primordijalne germinativne ćelije
PGT - preimplantacijsko genetsko testiranje
PID - Inflamatorna bolest karlice
PIP2 - fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
PN - pronucleus
PR - poor responder
RFZO - Republički fond zdravstvenog osiguranja
SF-1 - steroidogeni faktor-1
sGC - gvanilat ciklaza
SNAP - S-nitrozo-L-acetil penicilamin
SNP - natrijum nitroprusid
STDs - polno prenosive bolesti
SZO - Svetska zdravstvena organizacija
VTO - vantelesna oplodnja
ZP - zona pellucida

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Neplodnost.....	1
1.1.1. Definicija i tipovi neplodnosti.....	1
1.1.2. Epidemiologija neplodnosti.....	3
1.2. Faktori koji utiču na neplodnost.....	4
1.2.1. Polno prenosive bolesti (STDs)	4
1.2.2. Uloga genetike.....	5
1.2.3. Uloga endokrinoloških i imunoloških oboljenja i egzogenih disruptora.....	5
1.3. Uzroci neplodnosti.....	5
1.3.1. Uzroci neplodnosti kod žena.....	5
1.3.2. Uzroci neplodnosti kod muškaraca.....	6
1.3.3. Uzroci neplodnosti kod žena i muškaraca.....	7
1.4. Dijagnostikovanje neplodnosti.....	7
1.5. Lečenje neplodnosti.....	8
1.5.1. Lečenje neplodnosti muškaraca.....	8
1.5.2. Lečenje neplodnosti žena.....	8
1.5.3. Asistirana ili arteficialna reproduktivna tehnologija (ART).....	9
1.5.3.1. Vantelesna oplodnja (VTO)	10
1.5.3.2. Kratak istorijat razvoja VTO.....	11
1.5.3.3. Postupci VTO.....	11
1.5.3.4. Koraci VTO.....	13
1.5.3.5. Rezultati VTO i verovatnoća uspeha.....	14
1.5.3.6. KOS.....	15
1.5.3.7. KOS korak po korak.....	16
1.5.3.8. Kontrola KOS.....	18
1.5.4. Parametri kvaliteta oocita.....	21
1.5.4.1. Morfološki kriterijumi kvaliteta oocita.....	22
1.5.4.2. Analiza ekspresije gena.....	24
1.5.4.3. Neinvazivne metode za identifikaciju biomarkera kvaliteta oocita.....	24
1.6. Ovarijalni i endometrijalni ciklus.....	25
1.6.1. Folikulogeneza.....	25

1.6.2. Oogeneza.....	27
1.6.3. Faza proliferacije.....	27
1.6.4. Rast oocita.....	28
1.6.5. Sazrevanje oocita.....	29
1.7. Azot monoksid (NO) i njegova uloga u regulaciji reprodukcije.....	30
1.7.1. Azot monoksid (NO).....	30
1.7.1.1. Osobine i sinteza NO.....	31
1.7.1.2. Fiziološki i patološki efekti NO.....	31
1.7.1.3. Mehanizam delovanja NO.....	32
1.7.2. NO kao regulator fiziologije i biologije reproduktivnog sistema.....	33
1.7.2.1. NO u jajnicima.....	34
1.7.3. NO i spermatozoidi.....	35
1.7.4. NO i steroidogeneza.....	35
1.7.5. NO i mejotičko sazrevanje jajnih ćelija.....	36
1.7.5.1. NO i rast i razvoj preantralnih folikula.....	37
1.7.6. NO i ovulacija.....	37
1.7.6.1. NO i folikularna atrezija.....	38
1.7.7. NO i embrionalni razvoj.....	39
1.7.7.1. NO u kompetenciji oocita.....	39
1.7.8. NO i VTO.....	40
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
3. MATERIJAL I METODE.....	43
3.1. Protokol.....	43
3.2. Uzorkovanje biološkog materijala i primenjene laboratorijske metode.....	44
3.3. Dug i kratak protokol KOS.....	45
3.4. Statistika.....	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. Rezultati studije vezani za ukupnu populaciju ispitanica.....	47
4.1.1. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT u ispitivanoj populaciji.....	49
4.1.2. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT i karakteristika jajnih ćelija u ispitivanoj populaciji.....	53

4.1.3. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT na ishode IVF procedure u ispitivanoj populaciji.....	55
4.2. Rezultati studije vezani za ispitanice podeljene po vrstama protokola KOS.....	55
4.2.1. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom.....	58
4.2.2. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT i karakteristika jajnih ćelija kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom.....	61
4.2.3. Uticaj nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT na ishode IVF kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom.....	66
4.3. Rezultati studije vezani za ispitanike.....	66
5. DISKUSIJA.....	68
6. ZAKLJUČCI.....	78
7. LITERATURA.....	80

1. UVOD

1.1. Neplodnost

Neplodnost predstavlja globalni kako zdravstveni, tako i psihološki, sociološki i ekonomski problem u konstantnom porastu i na globalnom nivou se javlja aproksimativno u 9% svih parova. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) neplodnost kategorizuje kao bolest, što je takođe podržano od strane brojnih stručnih udruženja, uključujući Američko medicinsko udruženje, *engl. American Medical Association (AMA)*, Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju, *engl. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*, Međunarodni komitet za praćenje asistiranih reproduktivnih tehnologija, *engl. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART)* i Američko društvo za reproduktivnu medicinu, *engl. American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* [1-4]. Nastanak neplodnosti je često multifaktorski (Slika 1), uzrokovan postojanjem jednog ili više patoloških stanja, kao što su: ovarijalna disfunkcija, okluzija ili adhezije jajovoda, endometrioza, faktori od strane materice i/ili grlića materice, ali i muški faktori [1, 5].

1.1.1. Definicija i tipovi neplodnosti

Demografi imaju tendenciju da tumače i definišu neplodnost kao nemogućnost začeća u populaciji žena u njihovom reproduktivnom dobu, dok se epidemiološka definicija odnosi na „pokušavanje“ ili „vreme potrebno za ostvarivanje“ trudnoće u populaciji žena izloženih verovatnoći začeća [6]. Žena je najplodnija u životnoj dobi od 24. godine, a plodnost se smanjuje nakon 35 godine života. Trudnoća se retko ostvaruje nakon 50. godine života [7]. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze neplodnosti se u mnogome razlikuju u odnosu na karakteristike posmatrane populacije od kojih je najznačajnija starosna dob žene. U mnogobrojnim postojećim definicijama neplodnosti nedostaje uniformnost, što znatno otežava poređenja prevalencije infertiliteta između različitih zemalja i društava. Stoga se literaturni podaci o prevalenciji neplodnosti međusobno značajno razlikuju [6]. Za par koji bezuspešno pokušava da dobije potomstvo posle određenog vremenskog perioda (često kratkog, po definiciji variraju) se kaže da je subfertilan, odnosno manje plodan od tipičnog para. Kako se neplodnost i subfertilitet definišu kao nemogućnost začeća nakon određenog vremenskog perioda, jasno je da se ova dva termina delimično preklapaju [6].



Slika 1. Neplodnost u svetu (prema podacima SZO).

Klinička definicija neplodnosti predstavlja nemogućnost začeća tokom nezaštićenog polnog odnosa u periodu od najmanje 12 meseci [8], i ona je zasnovana na biološkim i kliničkim istraživanjima koja ukazuju da 85-90% parova koji ne koriste kontracepciju tokom odnosa imaju prirodno začeće u periodu od godinu dana [5]. Takođe, 95% parova ostvariće trudnoću u periodu od dve godine pokušavanja začeća [9]. Procena je da će 80% parova ostvariti prirodno začeće u prvoj godini ukoliko je žena mlađa od 39 godina, dok će 85% parova uspeti da ostvari trudnoću ukoliko je žena mlađa od 35 godina [9]. Shodno tome, pojedini kliničari, epidemiolozi i demografi uvode izmene definicije neplodnosti, tako da se vreme pokušaja začeća skraćuje na 6 meseci ili produžava na 2-5 godina u zavisnosti od starosne grupe i populacije koja se proučava [10, 11]. Tako se za žene mlađe od 35 godina koristi vremenski okvir od 12 meseci, dok se kod žena starijih od 35 godina uzima period od 6 meseci [10, 11].

Neplodnost se klasifikuje kao primarna ili sekundarna (Slika 2). Primarna neplodnost je situacija u kojoj žena nikada u životu nije ostvarila trudnoću uprkos redovnim nezaštićenim seksualnim odnosima. Sekundarna neplodnost predstavlja nemogućnost ponovnog začeća, a nakon prethodno ostvarene trudnoće, bez obzira na ishod iste. Dijagnostikovanje i lečenje parova sa primarnim i sekundarnim infertilitetom, uglavnom podrazumeva sličan pristup [12].

Tipovi neplodnosti

Primarna neplodnost

nemogućnost prvog začeća i održavanja trudnoće.



Sekundarna neplodnost

nemogućnost ponovnog začeća, nakon prethodno uspele trudnoće.

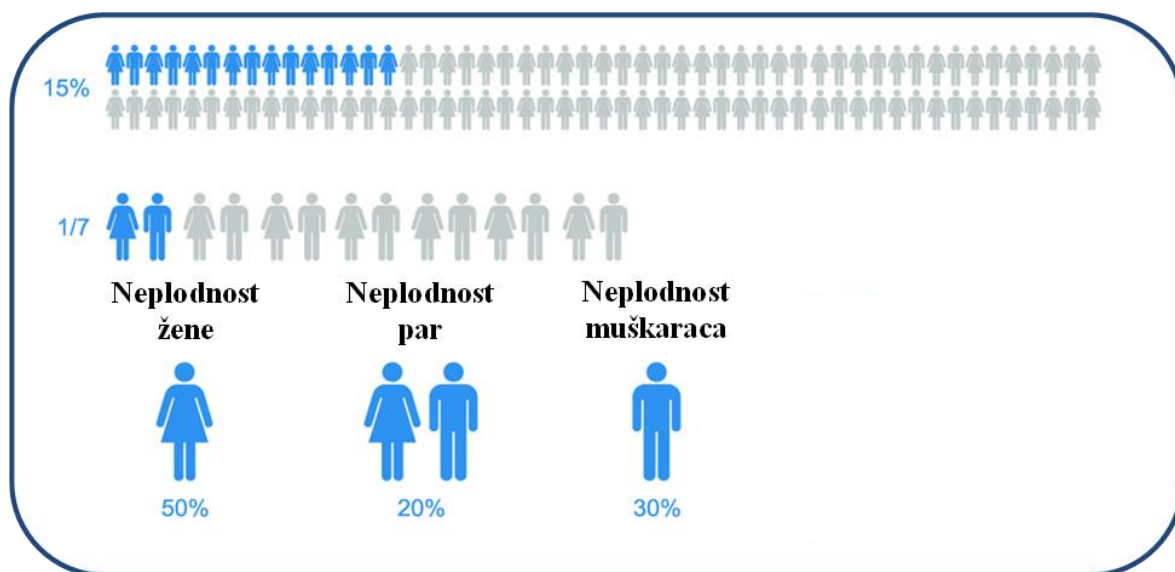


Slika 2. Tipovi neplodnosti.

1.1.2 Epidemiologija neplodnosti

Prema podacima SZO, širom sveta čak 48 miliona parova i 186 miliona pojedinaca, odnosno 15% reproduktivno sposobne populacije ima problem sa neplodnošću (Slika 3) [1]. Na ozbiljnost problema ukazuju stope neplodnosti koje dostižu čak 30% u populacijama pojedinih regiona južne Azije, podsaharske Afrike, Bliskog istoka, severne Afrike, centralne i istočne Evrope i centralne Azije [10, 11].

Tri velika demografska istraživanja su pokazala da neplodnost pogađa milione ljudi na globalnom nivou. U studiji sprovedenoj u 47 zemlja u razvoju (nije obuhvaćena Narodna republika Kina, koja je tada svrstavana u zemlje u razvoju), pokazano je da je u 2002. godini više od 186 miliona žena uzrasta 15-49 godina bilo neplodno zbog primarne ili sekundarne neplodnosti, što predstavlja više od 25% od ukupnog broja žena u reproduktivnom periodu [13]. Druga velika studija je izučavala stope neplodnosti u 25 zemalja tokom 2007. godine, i procenila je da je od 72,4 miliona neplodnih žena, svega njih 40,5 miliona (56%) potražilo stručnu pomoć [14]. Na osnovu rezultata još jedne studije u kojoj su analizirani podaci o reproduktivnom i zdravstvenom stanju u periodu 1990–2010. godine iz 190 zemalja, procenjeno je da je krajem 2010. godine čak 48,5 miliona parova imalo problem sa neplodnošću [10]. Sekundarna neplodnost, koju najčešće uzrokuju infekcije reproduktivnog trakta, često je prisutna u siromašnim zemljama sveta, gde je učestalost neplodnosti veća od 30% [13, 15]. Velike varijacije u prevalenci neplodnosti, pokazane u različitim studijama posledica su različitih metodoloških pristupa, koje se pre svega odnose na varijacije u definiciji neplodnosti i minimalnom periodu do ostvarivanja prirodnog začeća.



Slika 3. Učestalost neplodnosti.

U Srbiji neplodnost pogađa 16-18% parova, što je približno proseku na globalnom nivou [16, 17]. Međutim, na ozbiljnost problema neplodnosti u našoj zemlji dodatno utiče demografska situacija, imajući u vidu da višedecinijski negativan prirodni priraštaj ukazuje na jasan pravac kretanja ka depopulizaciji. U prilog tome ukazuju podaci da je totalna stopa plodnosti u Srbiji 1.5, što je daleko ispod minimuma od 2.33 neophodnog za stabilno obnavljanje populacije [18].

Kako bi se promenila nezavidna demografska situacija, Međunarodna federacija društava za plodnost (IFFS, *engl. International Federation of Fertility Societies*) je još davne 1998. godine započela međunarodni projekat koji ima za cilj da nadzire broj klinika za vantelesnu oplodnju (VTO) u svakoj zemlji, kao i da evaluira vrstu i kvalitet usluga koje pružaju, kao i da analizira donošenje i primenu zakona i regulativa u procesu VTO [19]. Do 2000. godine, VTO klinike su bile dostupne samo u 45 od 191 države članice SZO (24%) [20]. U prvoj deceniji XXI veka dolazi do velikog razvoja VTO klinika širom sveta, da bi 2010. godine, više od polovine zemalja (105 od 191) imalo nacionalni program VTO [19, 21].

1.2. Faktori koji utiču na neplodnost

Postoji nekoliko faktora koji doprinose ili uzrokuju neplodnost, a koji uključuju: abnormalan spermogram, polno prenosive bolesti (STDs, *engl. Sexual Transmitted Diseases*), hormonalni poremećaji, urođene i stečene morfološke promene genitalnih organa i idiopatski sterilitet.

1.2.1. Polno prenosive bolesti (STDs)

Infekcije sa sledećim polno prenosivim patogenima imaju negativan uticaj na plodnost: *Chlamidia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*. Postoji konzistentna povezanost infekcije genitalnim mikoplazmama i ureaplazmama sa povećanim rizikom od neplodnosti [1].

1.2.2. Uloga genetike

Robertsonova translokacija kod bilo kog partnera može izazvati ponavljajuće spontane abortuse ili potpunu neplodnost. Mutacije gena NR5A1 koji kodira steroidogeni faktor-1 (SF-1) čest je uzrok poremećenog reproduktivnog razvoja, često fenotipski manifestovanog kao neplodnost [22]. Rezultati kohortne studije koja je uključivala 315 muškaraca sa nepoznatim uzrokom neplodnosti, pokazali su da kod 7 muškaraca postoje mutacije NR5A1 gena koji kodira SF-1, koje se dovode u vezu sa azoospermijom, oligospermijom i u nekoliko slučajeva nađeni su povišeni gonadotropini i nizak testosteron [23]. Oštećenje DNK smanjuje plodnost ženskih oocita, što je uzrokovano pušenjem [24]. Oštećenje DNK smanjuje plodnost muške sperme, uzrokovano oksidativnim oštećenjem DNK [25].

1.2.3. Uloga endokrinoloških i imunoloških oboljenja i egzogenih disruptora

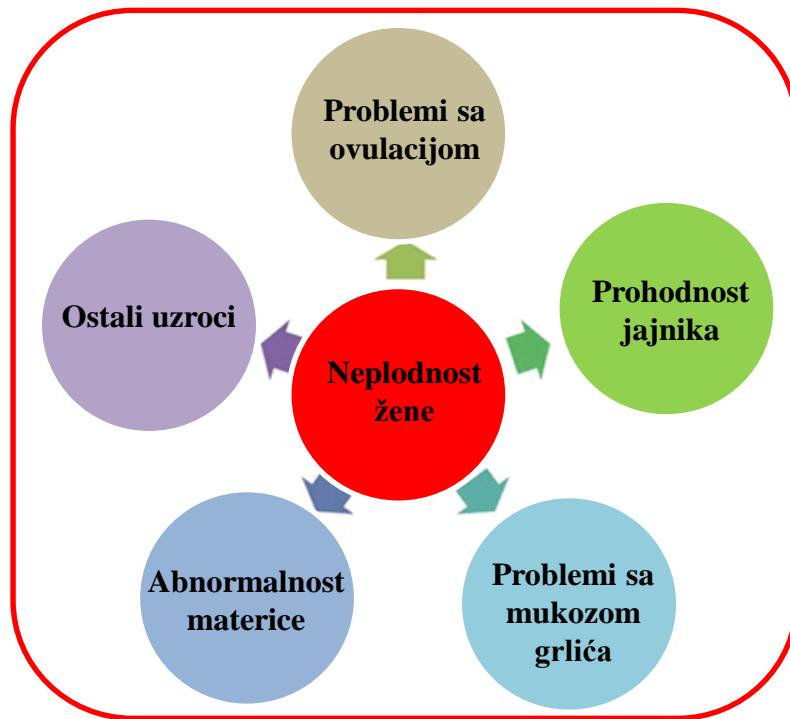
Šećerna bolest, poremećaji funkcije štitaste žlezde, nedijagnostikovana i nelečena celijakija, kao i bolesti nadbubrežnih žlezda često uzrokuju infertilitet [26-28]. Hipotalamički i hipofizni faktori, hiperprolaktinemija, hipopituitarizam i prisustvo antitiroidnih antitela, bilo samostalno ili udruženo, mogu doprineti nastanku infertiliteta [29]. Egzogeni disruptori, poput toksina (lekovi, isparljivi organski rastvarači, silikoni, hemijska prašina i pesticidi) mogu biti značajan doprinoseći faktor u nastanku infertiliteta, posebno u slučajevima produžene ili ponavljane ekspozicije [30]. Takođe, prisustvo antitela protiv spermatozoida može doprineti imunski-posredovanoj neplodnosti [31].

1.3. Uzroci neplodnosti

1.3.1. Uzroci neplodnosti kod žena

Kako bi došlo do spontanog začeća neophodno je da: seksualni odnos bude u približno vreme kada se oocita oslobodi iz jajnika; oocita bude dobrog kvaliteta i svi reproduktivni hormoni izbalansirani [7]. Kod žena, problemi sa oplodnjom nastaju uglavnom zbog morfoanatomskih problema u jajovodu ili materici ili problema sa oslobađanjem oocita (Slika 4). Neplodnost može biti uzrokovana opstrukcijom jajovoda zbog malformacija, infekcija (uzrokovana npr. hlamidijom) ili prisustvom ožiljnog tkiva. Endometrioza je relativno česta bolest kod žena nakon dvadesete godine života. Ona može da uzrokuje neplodnost distorzijom anatomskih odnosa organa karlice i mehaničkim sprečavanjem kontakta jajne ćelije i spermatozoida (usled priraslica i okluzije jajovoda), promenom biohemijskog, imunološkog, inflamatornog miljea, promenom hormonskog okruženja jajnih ćelija, otežanom implantacijom blastociste i narušenim kvalitetom jajne ćelije. [32]. Čest uzrok neplodnosti kod žena je izostanak ovulacije. Kod sindroma policističnih jajnika (engl. polycystic ovary syndrome - PCOS) su ciklusi često anovulatorni usled insulinske rezistencije i/ili povećane produkcije ovarijalnih androgena [33, 34]. Preciznije rečeno, uobičajeni faktori koji doprinose neplodnosti kod žena uključuju:

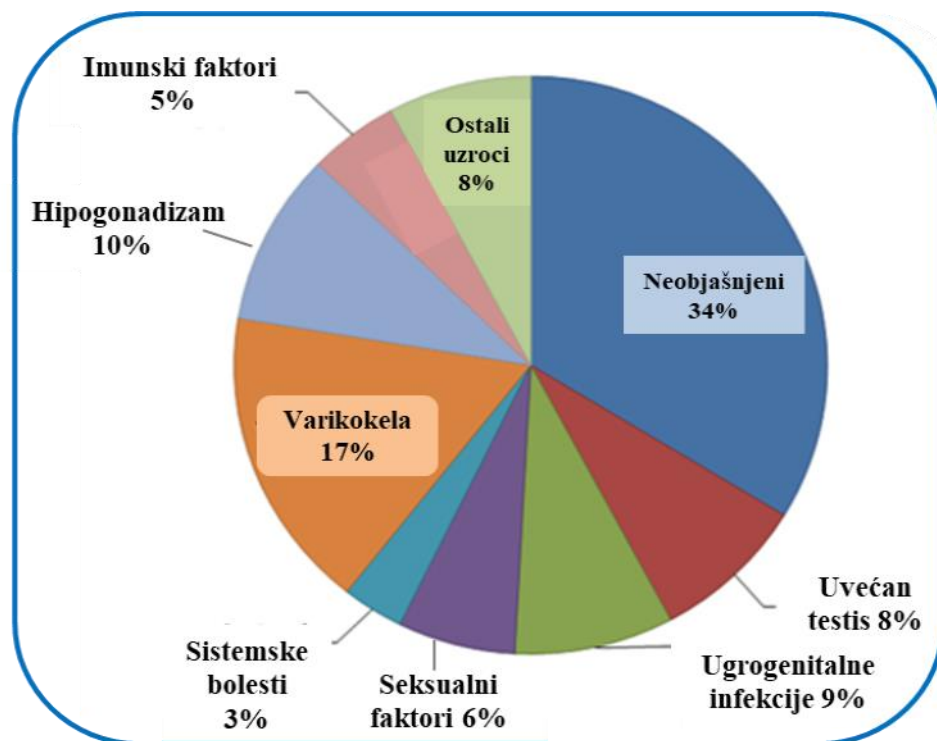
- a) Uzroci od strane jajnika (npr. PCOS, endometrioza),
- b) Uzroci od strane jajovoda,
- c) Inflamatorna bolest karlice (engl. Pelvic inflammatory disease- PID) uzrokovana infekcijama (npr. *Chlamydia trachomatis*),
- d) Uzroci povezani sa godinama života potencijalne majke,
- e) Uzroci od strane materice.



Slika 4. Uzroci neplodnosti kod žena.

1.3.2. Uzroci neplodnosti kod muškaraca

Glavni uzrok muške neplodnosti je neadekvatan kvalitet sperme. Kod muškaraca koji imaju reproduktivne organe, neplodnost može biti uzrokovana kvantitativnim i kvalitativnim poremećajima spermatozoida uzrokovanih raznim endokrinim bolestima, primenom određenih lekova, zračenjem ili infekcijama (Slika 5). Takođe, uzroci mogu biti i urođeni (malformacije testisa), ali i uzrokovani hormonskim disbalansom ili stenozom uretre. Iako se mnogi od ovih uzroka neplodnosti mogu lečiti hirurški ili medikamentozno, nemali broj njih je idiopatski [35]. Neplodnost povezana sa promenama u pokretljivosti spermatozoida može biti uzrokovana primarnom cilijarnom diskinezijom (Kartagenerov sindrom) [36]. Faktori životne sredine, kao što su izlaganje hemijskoj prašini i pesticidima imaju negativan efekat na plodnost muškaraca [30]. Brojni egzogeni zagađivači, poput pesticida (npr. DDT (1,1,1-trihloro-2,2,2-bis(p-hlorofenil)etan), hemikalija iz industrije (npr. PCB (polihlorovani bifenili), dioksin), lekova (npr. citostatici, imunosupresivi) samostalno ili udruženo mogu doprineti smanjenoj plodnosti muškarca [37]. Hossaini i saradnici su takođe pokazali da upotreba pesticida utiče na kvalitet sperme kod ljudi i definisali su indeks fertiliteta eksponiranih subjekata [38].



Slika 5. Uzroci neplodnosti kod muškaraca.

1.3.3. Uzroci neplodnosti kod žena i muškaraca

Nemogućnost začeća kod parova, najčešće je posledica neplodnosti žene ili muškarca. Takođe, u nekim slučajevima i muškarac i žena mogu biti neplodni, te neplodnost para proizilazi iz kombinacije ovih stanja. U retkim slučajevima, iako je svaki partner plodan nemogućnost začeća može biti posledica imunoloških ili genetskih faktora [36].

Neplodnost nepoznatog uzroka (idiopatska) javlja se kod 20% neplodnih parova [18]. Idiopatska neplodnost uzrokovana je različitim abnormalnostima, s tim što standardne dijagnostičke metode nisu dovoljno specifične i senzitivne da bi otkrile uzrok. Mogući problemi mogu biti da se oocita ne oslobodi u vremenu optimalnom za njenu oplodnju, potom da oocita ne ulazi u jajovod, zatim da spermatozoidi ne dosežu do oocita i da ne dođe do oplodnje, ali i da transport zigota može biti poremećen ili da implantacija ne uspe. Sve je više zagovornika o važnosti jednakosti kvaliteta oocita, jer žene u starijem reproduktivnom dobu imaju oocite smanjenog reproduktivnog kapaciteta. Takođe, polimorfizmi u genima uključenim u metabolizam folata mogu biti jedan od razloga za komplikacije plodnosti kod nekih žena sa neobjašnjivom neplodnošću [39]. Međutim, sve veći broj dokaza sugerira da i epigenetske modifikacije u spermatozoidima mogu delimično biti odgovorne [40].

1.4. Dijagnostikovanje neplodnosti

Ako su oba partnera mlada i zdrava i bezuspešno pokušavaju da ostvare trudnoću godinu dana ili više, savetuje se poseta ginekologu subspecijalisti fertiliteta i steriliteta. Čak i neke jednostavne promene u načinu života mogu povećati šanse za začeće [41]. Žena starija od 35 godina bi trebalo da poseti ginekologa nakon šest meseci neostvarivanja trudnoće, jer dijagnostičke procedure za ispitivanje infertiliteta mogu da potraju neko vreme, a starost može uticati na

dostupne opcije lečenja. Nakon uzimanja anamneze i ginekološkog pregleda, pravi se dijagnostički algoritam prilagođen svakom paru. Rezultati primenjenih dijagnostičkih procedura pomažu u određivanju najboljeg tretmana plodnosti [41].

1.5. Lečenje neplodnosti

Lečenje neplodnosti zavisi od mnogih faktora, kao što su: uzrok i trajanje neplodnosti, godine života pacijenata, kao i lične preferencije. Neki uzroci koji dovode do neplodnosti se, na žalost, ne mogu lečiti.

1.5.1. Lečenje neplodnosti muškaraca

Tretman uzroka muške neplodnosti može uključivati [42, 43]:

- *Promenu načina života.* Poboljšanje načina života i određenog ponašanja mogu poboljšati šanse za ostvarivanje trudnoće, uključujući prestanak uzimanja određenih lekova (ili njihova zamena onim koji ne utiču ili manje utiču na neplodnost), smanjenje ili eliminisanje štetnih supstanci, poboljšanje učestalosti i vremena snošaja, redovno vežbanje i optimizaciju drugih faktora koji bi inače mogli da ugroze plodnost.
- *Lekove.* Određeni lekovi mogu poboljšati broj spermatozoida i verovatnoću za postizanje uspešne trudnoće. Ovi lekovi mogu povećati aktivnost testisa, uključujući proizvodnju i kvalitet sperme.
- *Hirurške intervencije.* Za neke uzroke, hirurško lečenje može povratiti regularni protok sperme i vratiti plodnost. U drugim slučajevima, operativni tretman varikokele može poboljšati ukupne šanse za ostvarivanje trudnoće.
- *Uzimanje spermatozoida hirurškim putem iz epididimisa (engl. Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration- PESA ili Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration- MESA) ili iz testisa (engl. testicular sperm extraction- TESE i engl. Testicular sperm aspiration- TESA).* Uzimanje spermatozoida hirurškim putem se primenjuje isključivo kada je planirana vantelesna oplodnja i to u situacijama kada je ejakulacija nemoguća, kada nema živih spermatozoida u ejakulatu, ili kada je broj spermatozoida u ejakulatu nedovoljan ili su spermatozoidi kvalitativno izmenjeni [42, 43].

1.5.2. Lečenje neplodnosti žena

Tretman neplodnosti žena treba biti individualizovan. Naime, nekim ženama je potrebna samo jedna ili dve terapije da bi se plodnost poboljšala, dok je kod drugih žena možda potrebno nekoliko različitih vrsta lečenja da bi postigle trudnoću [44]. Neki od tretmana su: stimulacija ovulacije, primena intrauterine inseminacije (IUI), kao i primena različitih hirurških procedura u tretmanu pojedinih uzroka neplodnosti [12, 44].

- *Stimulacija ovulacije.* Stimulacija ovulacije je glavni tretman za žene koje su neplodne zbog poremećaja ovulacije. Lekovi koji se najčešće koriste za regulisanje ili indukovanje ovulacije su letrozol i clomiphene citrate [12, 44].
- *IUI.* Tokom IUI, obrađena sperma se ubrizgava direktno u matericu u vreme kada jajnik oslobodi jedno ili više oocita koje bi trebalo da budu oplođene. U zavisnosti od uzroka neplodnosti, vreme IUI se može uskladiti sa normalnim (nestimulisanim) ciklusom ili primeniti u ciklusima koji su stimulisani lekovima [12, 44].
- *Hirurško lečenje neplodnosti.* Patološka stanja materice, koja uzrokuju neplodnost, kao što su endometrijalni polipi, septum materice, intrauterine adhezije, kao i

submukozni miomi materice mogu se lečiti histeroskopskim operacijama. Endometrioza, prisustvo adhezija u maloj karlici i veći miomi mogu zahtevati laparoskopsku operaciju ili otovoren operativni pristup [12, 44].

U slučajevima kada se, uprkos primeni pomenutih tretmana, ne ostvari spontana trudnoća, parovi ipak mogu postići trudnoću korišćenjem asistirane reproduktivne tehnologije (ART) [44].

1.5.3. Asistirana ili arteficialna reproduktivna tehnologija (ART)

ART je svaki tretman neplodnosti u kojem se upravlja oocitima ili spermom. ART je pružila veliku nadu milionima neplodnih parova širom sveta. ART tretman obuhvata grupu procedura koje uključuju *in vitro* rukovanje ljudskim gametima (oocite i spermatozoidi) ili embriona u svrhu ostvarivanja trudnoće [45, 46]. Od Luiz Braun, prve bebe na svetu rođene iz programa VTO, 1978. godine, više od 6 miliona beba je rođeno nakon ART tretmana do 2013. godine [47, 48]. Poslednjih godina u Srbiji Republički fond zdravstvenog osiguranja godišnje finansira preko 4000 postupaka vantelesne oplodnje, a broj postupaka koji pacijenti sami finansiraju na godišnjem nivou je nepoznat [49].

Tipičan postupak VTO se sastoji iz sledećih koraka [46]:

1. **Kontrolisana ovarijalna stimulacija (KOS) i sazrevanje oocita:** Režim KOS, tj. hormonski tretman korišćenjem folikulostimulišućeg hormona (FSH), se primenjuje da bi se indukovalo sazrevanje više oocita,
2. **Uzimanje oocita i priprema sperme:** oocite se aspiriraju iz folikula jajnika (ultrazvučno vođena transvaginalna aspiracija); izdvajanje i priprema spermatozoida dobijenih ejakulacijom ili hirurškim zahvatima,
3. **Oplodnja:** Oocita se oploduje korišćenjem tehnike VTO, gde se sperma dodaje svakoj oociti u tečnom medijumu u laboratoriji, ili intracitoplazmatskom injekcijom spermatozoida (ICSI; engl. *intracytoplasmic sperm injection*), gde se odabrani spermatozoid ubrizgava direktno u svaku oocitu,
4. **Sazrevanje embriona:** Oplodene oocite se kultivišu 2-3 dana u cilju formiranja embriona u *cleavage* fazi umnožavanja kada se tipično sastoje od dve do 128 ćelija ili 5-6 dana, do formiranja blastociste, kada embrion sačinjava 70-100 ćelija.
5. **Embriotransfer:** Jedan ili više svežih ili zamrznuto-odmrznutih embriona u fazi cleavage ili blastociste se specijalnim kateterom pod kontrolom ultrazvuka prenose u šupljinu materice sa ciljem implantacije embriona i postizanju trudnoće.

Kroz istoriju ART tretman je više puta optimiziran i u njega su inkorporirane brojne inovacije (ICSI, unapređen kvalitet medijuma za kulturu embriona, krioprezervacija oocita i embriona, preimplantacijsko genetsko testiranje (*engl. preimplantation genetic testing*- PGT), time-lapse sistemi za inkubaciju i procenu embriona, a značajan je napredak postignut i u domenu protokola KOS [50, 51].

Klasični IVF (engl. In vitro fertilization) je postupak u VTO koji uključuje kontrolisanu ovarijalnu stimulaciju i aspiraciju više oocita, njihovu oplodnju spermom u specijalnoj posudi u laboratoriji za vantelesnu oplodnju. U slučaju uspeha klasičnog IVF-a (dobijanje kvalitetnih embriona) embriotransfer se obavlja drugog, trećeg ili petog dana nakon oplodnje oocite [46, 52].

Pored klasičnog IVF-a u postupku VTO se koriste i druge tehnike [42, 52, 53], poput:

- *ICSI*. Jedan spermatozoid adekvatnog kvaliteta se pod kontrolom mikroskopa i uz pomoć mikromanipulatora ubrizgava direktno u zrele oocite. ICSI se često koristi kada postoji loš kvalitet i/ili smanjena količina sperme, ali i ako pokušaji oplodnje tokom prethodnih klasičnih IVF ciklusa nisu uspjeli.
- *Potpomognuto otvaranje zone pelucide embriona* (engl. *Assisted Hatching*) je embriološka tehnika kojom se na mehanički, laserski ili hemijski način pomaže embrionu da se implantira u sluzokožu materice [54].
- *Donorske oocite ili spermatozoidi*. Većina ART-a se radi korišćenjem sopstvenih oocita i spermatozoida partnera. Međutim, ako postoji nedostatak ili neki ozbiljan problem sa oocitama ili spermom, mogu se koristiti oocite, spermatozoidi ili embrioni od poznatog ili anonimnog donora, uz saglasnost para.
- *Surogatmaterinstvo*. Žene bez funkcionalne materice ili one kod kojih bi trudnoća predstavljala ozbiljan zdravstveni rizik mogu izabrati postupak VTO u kome se embrion para implantira u matericu gestacijskog surogata. Gestacijski surogat je zdrava žena koja dobrovoljno uz naknadu ili bez nje pristaje da nosi plod i koja se odriče roditeljstva nad budućim potomstvom u korist para kod koga su jedan ili oba člana dali gamet koji je korišćen u procesu oplodnje [55]. Surogatmaterinstvo nije prihvaćeno, niti zakonom jednako uređeno u svim državama sveta.

1.5.3.1. Vantelesna oplodnja (VTO)

Definicija VTO

VTO je ART koja uključuje uzimanje oocita iz jajnika žene putem punkcije i aspiracije folikula. Oocite dobijene procesom aspiracije će u laboratoriji biti oplodene pomoću spermatozoida partnera ili donora. Po oplodnji oocita prati se razvoj nastalih embriona koji se u slučaju adekvatnog kvaliteta prenose u matericu žene drugog ili trećeg dana po oplodnji (cleavage stadium) ili petog ili šestog dana (stadijumu blastociste). Krajnji cilj VTO je ostvarivanje zdrave trudnoće [56].

VTO se sa tehničkog stanovišta koristi za pomoć parovima ili ženama koje imaju problema sa začećem. Stope uspeha VTO zavise od više faktora, ali su nesumnjivo godine života potencijalne majke ključni faktor. Takođe, kvalitet upotrebljene sperme igra glavnu ulogu kada je u pitanju određivanje šansi za trudnoću sa VTO. Ukupni troškovi postupaka VTO su prilično visoki iz dva glavna razloga: s jedne strane zbog hormonskih lekova koji se koriste za KOS, a s druge strane, zbog raznovrsnog spektra savremenih tehnologija i laboratorijske opreme koja se koristi [57]. U zavisnosti od toga kako su oocita i spermatozoid zajedno spojeni, razlikuju se dva tipa VTO-a: konvencionalna VTO (IVF) i ICSI (Slika 6) [58].

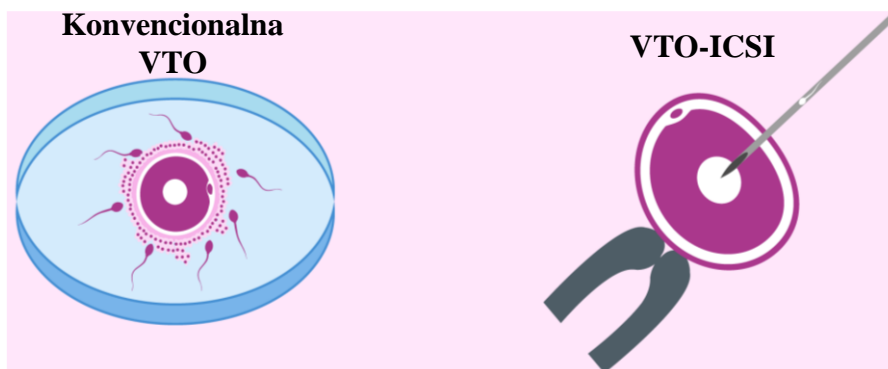
Konvencionalna VTO (IVF): Obe reproduktivne ćelije se dovode u kontakt u Petrijevoj šolji i očekuje se da će se same spojiti.

ICSI: Tehnika kojom se spermatozoid ručno, uz pomoć mikromanipulatora injekcijom ubacuje u oocite mikroinjektiranjem.

Izbor između prvog ili drugog zavisi od uzroka neplodnosti ali i od iskustva embriologa. Iako se proces oplodnje razlikuje, koraci koji predhode konvencionalnoj VTO i ICSI su isti [46].

Razlika između VTO i IUI

IUI je još jedan vid tretmana neplodnosti, tehnički manje izazovan od VTO. Sa IUI, obrađena sperma se ubacuje u matericu žene, a oplodnja se dešava unutar ženskog reproduktivnog trakta, kao što bi to bilo seksualnim odnosom, bez daljeg medicinskog angažovanja.



Slika 6. Tipovi VTO.

1.5.3.2. Kratak istorijat razvoja VTO

VTO oplodnja, kao oblik ART-a, uspešno se koristi u ljudskim i životinjskim populacijama već nekoliko decenija [48, 59]. Primena VTO kod životinja datira mnogo dalje nego kod ljudi, Chang i saradnici u studiji publikovanoj 1959. godine detaljno opisuju proces VTO na zečevima i sledstveno uspešno rađanje 15 zdravih zečeva [59]. Skoro dve decenije kasnije, Steptoe i Edvards (1978) su bili prvi koji su postigli živorođenje kroz proces humane VTO; Louise Brown se smatra prvom bebom na svetu rođenom iz procesa VTO dalekog 25. jula 1978. godine u Engleskoj [48]. Svedoci smo značajnih pomaka u oblasti reproduktivne medicine u poslednje četiri decenije, s tim što su ekonomski momenat i pristupačnost i dalje ograničavajući faktor VTO.

U prvim godinama VTO, tehnika je bila ograničena na lečenje neplodnosti kod žena uzrokovanim različitim problemima jajovoda. Vremenom su se indikacije za VTO proširile na mušku neplodnost, endometriozu i subfertilnost nepoznatog uzroka, tzv. „idiopatsku” subfertilnost. Od ranih 1990-ih, čak i parovi sa teškom muškom neplodnošću mogu se lečiti VTO u kombinaciji sa ICSI [60]. Širom sveta, 500 000 IVF i ICSI ciklusa se izvodi svake godine, što rezultira rođenjem 20 000 beba. U Republici Srbiji od 64 717 živorođenih beba 2019. godine, njih 2401 (3,71%) je začeto putem VTO [61].

Prvi uspešan pokušaj VTO urađen je u spontanom ciklusu, dok se danas žene rutinski podvrgavaju KOS [48]. Poboljšani režimi KOS doveli su do povećanja šansi za trudnoću i poboljšane bezbednosti i konfora pacijenata [62].

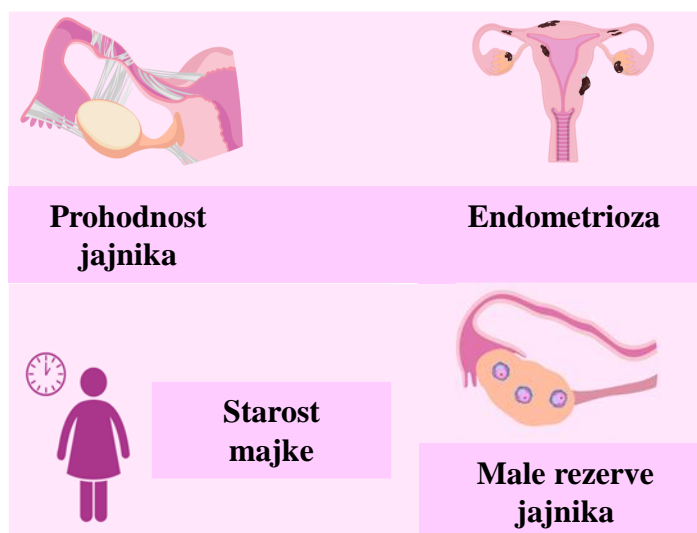
1.5.3.3. Postupci VTO

VTO podrazumeva veći stepen složenosti od IUI ne samo zbog veće kompleksnosti procedure, već i zbog obimnijeg angažmana osoblja [52]. Međutim, stope uspešnosti VTO su veće u poređenju sa IUI, što je i dodatni razlog zašto je VTO u većini slučajeva tretman izbora [56], iako se u praksi IUI izvodi kod nekih parova u toku pripreme dokumentacije za VTO.

Indikacije za IVF podrazumevaju širok spektar mogućih pojedinačnih uzroka ili kombinacije više mogućih uzroka. Najčešće indikacije za VTO su:

Muška neplodnost: umereni do teški slučajevi muške neplodnosti: oligozoospermija, astenozoospermija, teratozoospermija, kriptozoospermija, oligoastenoteratospermija [41, 63].

Ženska neplodnost: može biti uzrokovana jajnicima (anovulacije i endokrini poremećaji), jajovodima (okluzija ili nepostojanje jajovoda), matericom (malformacije, tumori, adenomioza, promene grlića materice koje mehanički ili imunološki otežavaju prolaz spermatozoida) [41, 44], što je u nastavku ilustrativno prikazano (Slika 7).



Slika 7. Indikacije za neplodnost kod žena.

Preduslovi za izvođenje VTO: Iako je VTO rasprostranjena tehnika koja može pomoći mnogim pacijentima, istina je da ona ima neke preduslove koji moraju biti ispunjeni.

Preduslovi kod žena: Da bi se izvršila VTO, neophodno je da žena bude sposobna da proizvodi zrele oocite. Pored toga, neophodno je da pacijentkinja nema bolesti materice ili druge anomalije, koje bi sprečile implantaciju embriona ili evoluciju gestacije. S druge strane, ako žena ima smanjenu ovarijalnu rezervu i nije moguće od nje dobiti zrele oocite, moguće je uraditi VTO sa donorskim oocitama [41, 44].

Preduslovi kod muškaraca: U zavisnosti od kvaliteta sperme izvode se konvencionalna VTO ili ICSI. Ukoliko muški partner ima ozbiljne probleme sa pokretljivošću, morfoloijom ili koncentracijom spermatozoida u ejakulatu, koristi se ICSI tehnika. Čak i ako su ispunjeni uslovi za konvencionalnu VTO, pojedini embriolozi radije primenjuju ICSI. S druge strane, kada spermatozoidi ne dolaze iz ejakulata, kao u slučaju biopsije testisa, takođe se radi ICSI, jer je njihov kvalitet obično slabiji ili veoma nizak. Isto se može desiti kada se koristi zamrznuta sperma. Moguća je i VTO sa donorskom spermom u slučajevima azoospermije ili nepostojanja muškog partnera, pa čak i VTO sa dvostrukom donacijom, odnosno sa doniranim oocitama i spermatozoidima [41, 63].

1.5.3.4. Koraci VTO

Proces VTO obuhvata više različitih koraka (Slika 8) [64, 65].

- 1. KOS:** Primena gonadotropina u prosečnom trajanju oko 10 dana ima za cilj dobijanje što većeg broja zrelih oocita. Serumskim određivanjem koncentracija polnih hormona i ultrazvučnim merenjem veličine folikula se procenjuje stepen zrelosti jajnih ćelija i tako se povećava šansa da što veći broj aspiriranih oocita bude zrelo, sa dobrim potencijalom za oplodnju.
- 2. Punkcija folikula i aspiracija oocita** je hirurška intervencija kojom se pod ultrazvučnom kontrolom specijalnom iglom aspiriraju oocite. Sprovodi se aspiracionom tehnikom pomoću specijalizovane igle, pod kontrolom ultrazvuka, a traje 20-30 minuta i zahteva opštu anesteziju.
- 3. Sakupljanje i kapacitacija sperme:** Uzorci sperme se prikupljaju masturbacijom, ili aspiracijom epididimalne sperme ili biopsijom testisa. Uzorci prolaze kroz proces prečišćavanja sperme kako bi se povećao njihov potencijal oplodnje.
- 4. Oplodnja:** Vezivanje oocite i spermatozoida se odvija u trenutku oplodnje (konvencionalna VTO) ili putem mikroinjekcije (ICSI) [64, 65].
- 5. Kultura embriona:** Kada se oocita oplodi, prati se razvoj embriona. Plasiranje embriona u matericu procesom embriotransfera se vrši 2 do 5 dana od aspiracije, odnosno oplodnje oocita, a eventualni višak embriona se zamrzava. Od momenta oplodnje pa do embriotransfera ili zamrzavanja embrioni se uzgajaju u specijalnim medijumima i u inkubatorima VTO laboratorija, koji simuliraju optimalne uslove razvoja.
- 6. Priprema materice za embriotransfer:** Primenom gonadotropina u KOS ili hormonskom pripremom endometrijuma kod frozen embryo transfera (FET) obezbeđuje se adekvatna pripremljenost endometrijuma i tako povećava šansa za implantaciju embriona.
- 7. Ebriotransfer:** Nakon kultivisanja, za ebriotransfer se biraju najkvalitetniji embrioni. Najčešće se prenosi jedan embrion, mada se mogu transferisati najviše do 3 embriona u zavisnosti od toga šta je zakonom utvrđeno u zemlji u kojoj se transfer odvija.
- 8. Zamrzavanje embriona:** Visokokvalitetni neiskorišćeni embrioni se kriokonzerviraju najčešće procesom vitrifikacije i mogu biti kasnije eventualno upotrebljeni.
- 9. Test trudnoće:** U roku od 10 do 15 dana nakon embriotransfera radi se test na trudnoću (najčešće određivanjem serumskih nivoa beta-hCG-a), a koji je pozitivan u slučaju uspešne implantacija embriona, odnosno ostvarivanja trudnoće [64, 65].



Slika 8. Koraci u VTO.

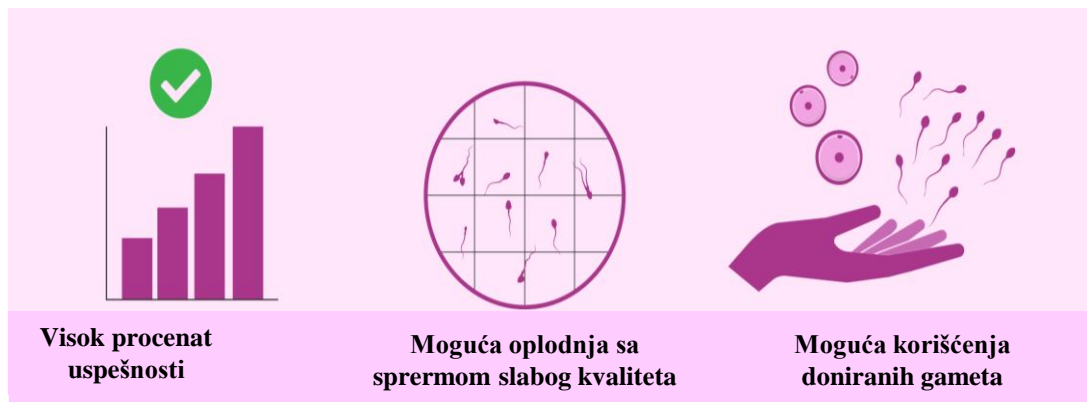
1.5.3.5 Rezultati VTO i verovatnoća uspeha

Kao i druge ART, stopa uspeha VTO-a zavisi od nekoliko faktora, od kojih je starosna dob žene jedan od najznačajnijih [66]. Verovatnoća uspeha VTO iznosi oko:

- 40% kod žena ispod 35 godina
- Između 27-36% kod žena između 35 i 37 godina
- Između 20-26% kod žena između 38 i 40 godina
- Između 10-13% kod žena starijih od 40 godina

Procena uspeha VTO bi trebalo da bude zasnovana na stopi živorođenosti, a ne samo na stopi kliničkih trudnoća ostvarenih VTO, jer treba uzeti u obzir da svaka klinička trudnoća nije krunisana uspehom jer je ishod nekih od njih ektopični graviditet ili spontani pobačaj.

Prednosti VTO (Slika 9): Kao i svaki drugi medicinski tretman postupci VTO imaju niz prednosti i nedostataka. Prednosti VTO su: visoka stopa uspešnosti, metode i davanje mogućnosti parovima sa teškim problemima neplodnosti da ostvare trudnoću. Posebno, ICSI nudi mogućnost postizanja oplodnje čak i u slučajevima teške muške neplodnosti, kao što je opstruktivna azoospermija. Moguća je upotreba i doniranih oocita i spermatozoida, što povećava šanse za ostvarivanje trudnoće neplodnih parova. Uopšteno govoreći, potencijalni neželjeni efekti VTO najčešće nisu ozbiljni [64, 67].



Slika 9. Prednosti VTO.

Nedostaci VTO (Slika 10): U nemalom broju zemalja, pacijenti u potpunosti ili delimično finansiraju ovu skupu proceduru, a često su i primorani da sami sebi daju lekove tokom KOS, što može dovesti do pojave komplikacija. Aspiracija oocita je invazivna procedura koja nosi određene rizike, a zbog njene bolnosti često se izvodi u sklopu kratkotrajne intravenske anestezije [64, 67].

Potencijalni neželjeni efekti i rizici od VTO: KOS i punkcija folikula mogu izazvati niz neželjenih reakcija. Pacijente treba obavestiti o svim ovim potencijalnim rizicima pre nego što počnu sa lečenjem. Za sve invazivne procedure u sklopu VTO-a, kao i za samu VTO, potrebno je obezbediti potpisan informisan pristanak para.

- **Sindrom hiperstimulacije jajnika (OHSS)** izaziva povećanje jajnika i ekstravazaciju tečnosti usled povećane propustljivosti kapilarnih krvnih sudova.

U najtežim slučajevima može doći do hepatične, respiratorne i bubrežne insuficijencije [68].

- **Višestruka trudnoća:** Rizik od blizanačke trudnoće sa elektivnim embriotrasferom (engl. elective single embryo transfer, eSET) je identičan onom kada trudnoća nastaje prirodnim putem. U ciklusima u kojima se prenose dva embriona, verovatnoća blizanačke trudnoće iznosi oko 6%. Ako se prenese tri embriona, šansa za blizanačku trudnoću se povećava i do 12%, dok se triplodna trudnoća javlja u 3% slučajeva. Ove verovatnoće ne zavise samo od broja vraćenih embriona već i od drugih faktora kao što su godine života žene i kvalitet endometrijuma [69].



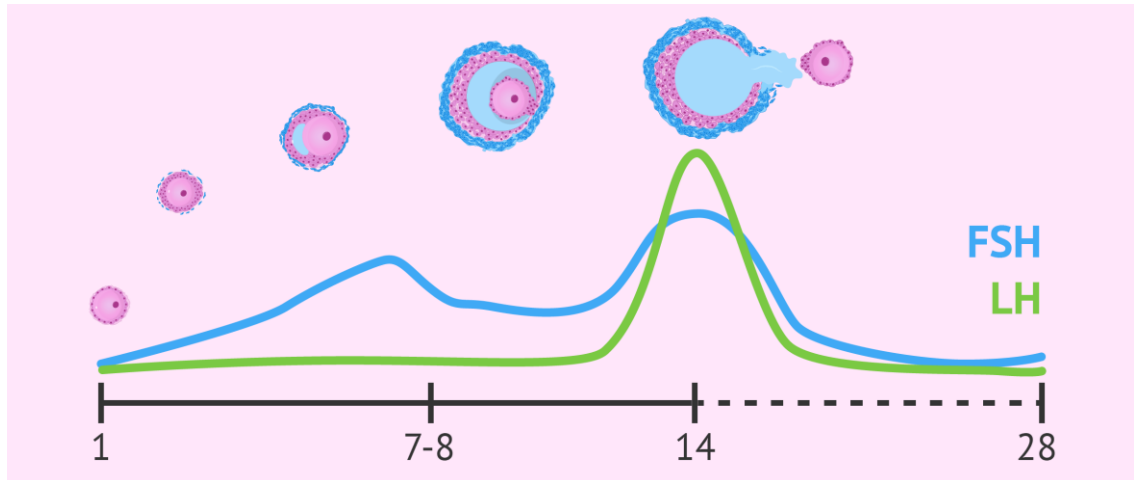
Slika 10. Nedostaci VTO.

- **Pobačaj:** Svaka peta trudnoća ostvarena procesom VTO se završi pobačajem, obično u ranim fazama trudnoće. Stopa pobačaja kod trudnoća ostvarenih procesom VTO zavisi od brojnih faktora kao što su godine starosti žene i njenih individualnih karakteristika ili zajedničkih karakteristika neplodnog para [70].
- **Ektopična trudnoća:** Nastaje kada se embrion implantira na drugom mestu osim u materici. Ektopična trudnoća se javlja kod 2-5% žena podvrgnutih VTO proceduri, što je nešto više u odnosu na učestalost ektopičnih trudnoća (oko 1%) iz prirodnog začeća [70].

1.5.3.6. KOS

KOS je prvi korak ka potpomognutom reproduktivnom tretmanu [62, 71]. Pored toga, KOS je neophodna i kada žena želi da prezervira svoje oocite radi očuvanja plodnosti (npr. pre primene određene citostatske terapije), kao i za žene koje će biti donori oocita. Svrha stimulacije jajnika je da se umesto sazrevanja jednog folikula i jajne ćelije, postigne istovremeno sazrevanje nekoliko folikula u jajnicima [62, 71]. Time se povećava broj oocita za oplodnju, a time i broj embriona i mogućnost postizanja trudnoće. U prirodnom ciklusu, regrutacija folikula se odvija u zavisnosti od nivoa gonadotropina, posebno od FSH koji je odgovoran za stimulaciju razvoja folikula (Slika 11). Nivo gonadotropina je determinisan pulzatilnom sekrecijom gonadotropin-oslobađajućeg hormona, engl. gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Nakon 7-8 dana rasta folikula, nivo FSH se smanjuje i samo jedan folikul može da preživi i nastavi sazrevanje u *preovulatorni folukul* [72]. Preostali folikuli koji su započeli svoj razvoj degenerišu, a oocite koje su bile u njima su izgubljene. U sredini ovarijalnog ciklusa, oko 14. dana, dolazi do porasta nivoa luteinizirajućeg hormona (LH), poznatog kao LH pik, koji pokreće *ovulaciju*.

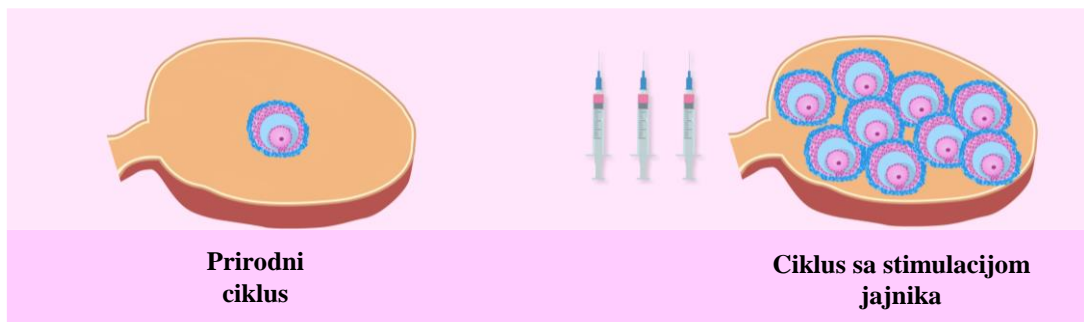
Dakle, periovulatorni folikul jajnika puca, a oocita se izbacuje u jajovod, gde je podložna oplodnji [71].



Slika 11. Nivoi FSH i LH u toku ciklusa.

1.5.3.7. KOS korak po korak

U tretmanima asistirane reprodukcije, cilj je oponašanje onog što se dešava u prirodnom menstrualnom ciklusu, ali u većem obimu. Iz tog razloga se sprovodi KOS, sa ciljem sazrevanja više jajnih ćelija istovremeno (Slika 12). Pored toga, KOS je bilateralna jer folikuli rastu u oba jajnika [72].



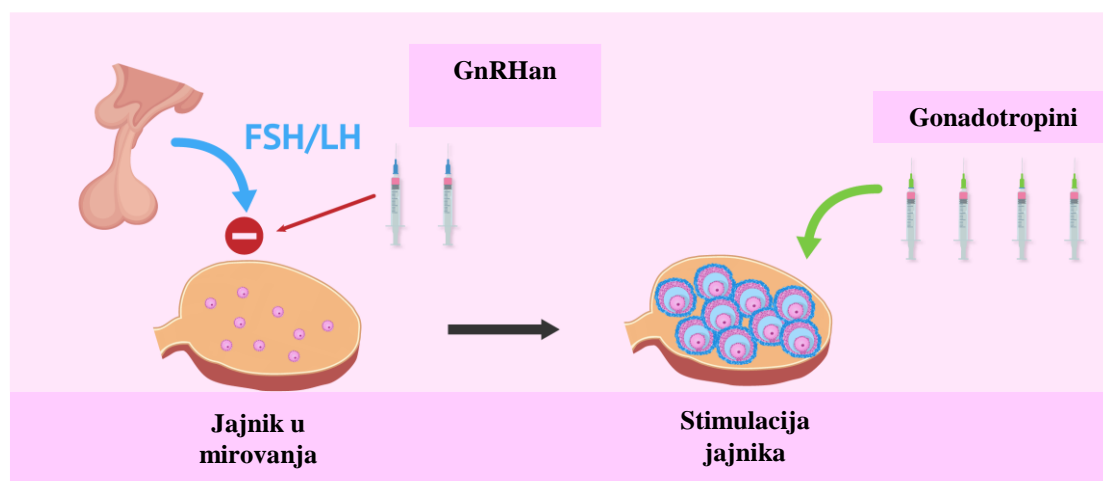
Slika 12. Fiziološki i stimulisani ciklus.

Konkretno, KOS se sastoji od nekoliko faza, a njihov broj zavisi od vrste primenjenog protokola. Kod dugog protokola sa agonistima hormona koji oslobađa gonadotropin (*engl. gonadotropin-releasing hormone* GnRH) agonistima postoje tri faze koje karakteriše primena različitih lekova (Slika 13) [62, 71]:

1. **Supresija hipofize:** GnRH agonisti (GnRHa) se primenjuju u cilju blokiranja hipotalamo-hipofizno-ovarijalne osovine. Kontinuirana primena GnRH agonista će nakon inicijalne aktivacije GnRH receptora dovesti do pojave neosetljivosti (desenzibilizacije) GnRH receptora. Desenzibilizacija GnRH receptora smanjuje sintezu i oslobađanje endogenih gonadotropina, što nazivamo „*down-regulacijom*“. Nakon postizanja iste, endogena proizvodnja

gonadotropina (FSH i LH) u jajnicima prestaje i jajnici su u stanju mirovanja [73],

2. **Višestruki razvoj folikula:** Nakon supresije hipofize neophodno je primeniti egzogene gonadotropine da bi se postigao kontrolisan razvoj folikula. Cilj njihove primene je da se sinhronizuje cela kohorta folikula i da svi istovremeno rastu, sve dok se ne postigne njihova adekvatna veličina,
3. **Finalno sazrevanje folikula:** Ova faza se sastoji od davanja takozvane stop ili trigger injekcije, a koja predstavlja zamenu za prirodni porast LH u sredini ovarijalnog ciklusa. Kako se kod KOS primenom GnRH analoga (bilo agonista ili antagonista) sprečava endogeni LH skok primena trigger injekcije ipak omogućava pojavu naglog porasta koncentracije LH i time omogućava konačno sazrevanje oocita unutar folikula, tako da oocite prelaze iz metafaze I, *engl. metaphase I* (MI) u metafazu II, *engl. metaphase II* (MII) fazu ćelijske deobe [74].
4. **Aspiracija oocita:** Kako skok LH vrednosti (bilo prirodan u spontanom ovarijalnom ciklusu, bilo uzrokovan davanjem trigeru u stimulisanoj ciklusu tokom KOS-a) smanjuje elastičnost folikularnih zidova veoma je važno obaviti punkciju folikula u cilju aspiracije oocita najkasnije 36 sati nakon trigger injekcije [72].



Slika 13. Faze KOS.

Ako prođe više vremena, došlo bi do ovulacije i zrele oocite bi bile izbačene iz jajnika u jajovode a samim tim bi se onemogućilo vađenje oocita iz organizma i njihova oplodnja u laboratorijskim uslovima.

Trajanje KOS zavisi od mnogih faktora, uglavnom od toga kako žena reaguje na hormone lekovite i da li folikuli pravilno rastu. Uopšteno, faza razvoja višestrukih folikula traje otprilike 10 dana [62, 71]. Međutim, ukupno trajanje KOS-a zavisiće od vrste protokola koji je primenjen.

Kratak protokol: GnRHan se koristi za supresiju hipofize, koji imaju efekat odmah nakon primene. Zbog toga je broj potrebnih injekcija manji [75].

Dug protokol: Koriste se GnRH-a, koje treba započeti u prethodnom menstrualnom ciklusu žene (oko 21. dana ciklusa), jer im je potrebno više vremena da se postigne potpuna blokada hipofize [75].

Vrste lekova koji se primenjuju u KOS-u: Potrebno je razjasnili vrste lekova koji se koriste tokom stimulacije jajnika, u nastavku će biti sumirane, a potom i navedeni neki najčešće korišćenih zaštićenih naziva ovih lekova [72, 75]:

GnRHa se koriste za down regulaciju hipofize u dugim protokolima KOS. Neki primeri su Decapeptyl, Diphereline, Suprefact.

GnRHan se koriste za kontrolu funkcije hipofize u kratkim protokolima KOS i imaju za cilj sprečavanje prevremenog LH skoka. Najčešće korišćeni su Cetrotide i Orgalutran.

Gonadotropini: Ovi lekovi sadrže FSH i/ili LH kao aktivne sastojke. Oni mogu biti visoko prečišćeni urinarni gonadotropini kao što je Menopur ili rekombinantni FSH: Folitropin alfa (Gonal-f, Bemfola), Folitropin beta (Puregon), Folitropin delta (Rekovellet).

Induktori ovulacije: Ovi lekovi služe za postizanje konačnog sazrevanja folikula i izazivanje ovulacije. U ove lekove spadaju humani horionski gonadotropin (Pregnyl), rekombinantni horionski gonadotropin (horiogonadotropin alfa, zaštićeno ime Ovitrelle). Kod rizika za OHSS se koriste kao trigger injekcija GnRH agonisti ili kisspeptin.

1.5.3.8. Kontrola KOS

Primena gonadotropina u zavisnosti od vrste protokola za KOS započinje između 1. i 3. dana ciklusa. Pre započinjanja terapije pacijentkinji se radi transvaginalni ultrazvučni pregled male karlice da bi se isključilo postojanje cisti i drugih patoloških promena na jajnicima, kao i da se evaluiira stanje endometrijuma. Ako je endometrijum tanak i bez suspektih patoloških sadržaja i jajnici bez patoloških promena započinje se KOS. Nakon nekoliko dana primene gonadotropina, vrši se evaluacija KOS-a merenjem serumskih koncentracija određenih hormona (samo estradiola kod GnRH agonist protokola, a estradiola i LH kod GnRH antagonist protokola) i ultrazvučnim merenjem debljine endometrijuma i promera folikula (folikulometrijom). Od momenta uvođenja GnRH antagonista u GnRH antagonist protokolima dalje hormonska regulacija KOS-a se bazira samo na merenju serumskih vrednosti estradiola, dok se kod GnRH agonist protokola od početka do kraja bazira samo na merenju estradiola. [62, 71, 72].

Folikulometrijom se evaluiira broj i veličina folikula tokom KOS-a. Na osnovu podataka dobijenih folikulometrijom u slučaju potrebe se može prilagoditi odnosno promeniti doza leka u cilju postizanja optimalnog odgovora jajnika na KOS. Najveći broj studija je indentifikovao promer folikula od približno 18 mm kao diskriminatornu vrednost dijametra koja ukazuje na prisustvo zrele jajne ćelije (oocita) u folikulu. U proceni zrelosti jajnih ćelija se pored folikulometrije prati i nivo serumskog E2, koji obično iznosi 200-300 pg/ml po folikulu u momentu kada jajna ćelija dostigne neophodnu zrelost. U trenutku kada se proceni da jedan ili više folikula (a taj broj zavisi od odgovora jajnika na KOS) sadrži zrele jajne ćelije, kao i kada se proceni da je endometrijum neposredno pred postizanjem receptivnosti daje se završna (STOP), odnosno trigger injekcija. Punkcija folikula radi aspiracije oocita se vrši 34-36 sati nakon davanja STOP injekcije. [62, 71, 72].

Odgovor jajnika na KOS: Žene različito reaguju na gonadotropine koji se koriste tokom KOS-a, pa nije neuobičajeno da se kod različitih žena podvrgnutih istom protokolu KOS i istim dozama gonadotropina dobije različit broj folikula odnosno jajnih ćelija [72]. U slučaju slabog odgovora jajnika na KOS broj folikula

i zrelih jajnih ćelija je mali i kreće se maksimalno do 3 folikula odnosno jajne ćelije, a takve pacijente nazivamo *poor responder-ima* (PR)[76]. Kod PR folikuli mogu biti i prazni, jer ne dostižu odgovarajući prečnik, ili pak nije dostignuto sazrevanje oocita. Ovo se najčešće dešava kod žena starijih od 35 godina sa niskom ovarijalnom rezervom [76]. Ovaj klinički scenario može biti prisutan i kod mladih žena kod kojih je slab odgovor jajnika na KOS prisutan zbog prevremene ovarijalne insuficijencije, engl. *premature ovarian failure* (POF) ili zbog drugih stanja, kao što su operativne procedure na jajniku ili operativno uklanjanje jajnika [72]. Sa druge strane, postoji i prenaplašen odgovor jajnika na KOS, kada se u jajnicima razvija veliki broj folikula, a takvi pacijenti se nazivaju *high responder-i* (HR). Kao posledica prenaplašenog odgovora jajnika na KOS javlja se rizik od OHSS nakon primene hCG kao STOP injekcije [72]. U slučaju postojanja rizika za razvoj OHSS-a, izbegava se embriotransfer svežeg embriona, a dobijeni embrioni se zamrzavaju i u tom stanju se čuvaju do nekog od sledećih ciklusa kada se odmrzavaju i kada se procesom embriotransfera plasiraju u matericu pacijentkinje. Na taj način se drastično smanjuje rizik nastanka OHSS-a. U slučaju ovakvog postupanja neželjeni efekti prenaplašenog odgovora jajnika na KOS su najčešće blagi i prolazni i liče na predmenstrualni sindrom [72].

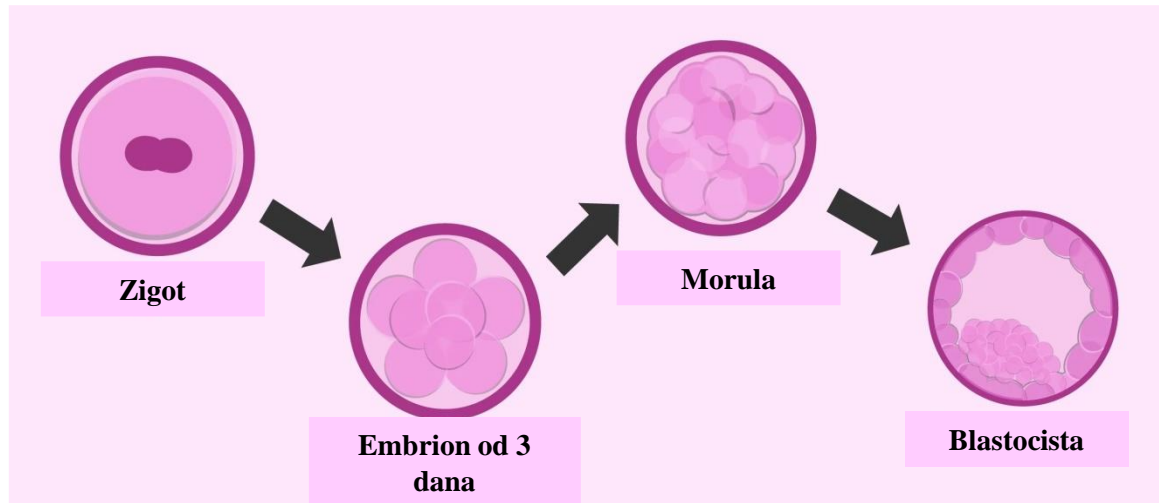
Punkcija folikula i aspiracija jajnih ćelija: Nakon dostizanja željene veličine folikula i davanja STOP injekcije, naredni korak je dobijanje oocita punkcijom folikula [77]. Ova hirurška intervencija se izvodi u uslovima kratkotrajne intravenske anestezije, kada se pod ultrazvučnom kontrolom, poštujući sve principe asepsa i antiseptiku, punktiraju folikuli jajnika i aspirira njihov sadržaj [77]. Nakon toga, aspirat folikularne tečnosti se analizira u embriološkoj laboratoriji u cilju identifikacije i kolekcije jajnih ćelija [78].

Sakupljanje i priprema sperme: Uopšteno, uzorak sperme se najčešće dobija masturbacijom kojoj predhodi period apstinencije koji najčešće iznosi 2-5 dana. Nekoliko minuta do pola sata nakon davanja uzorka, uzorak se obrađuje, a u procesu obrade uklanjaju se spermatozoidi lošeg kvaliteta, odvaja se seminalna plazma, a kao rezultat dobijamo uzorak koji sadrži progresivno pokretne spermatozoide [79]. Kada masturbacijom ne možemo dobiti uzorak sperme ili kada se njom dobija uzorak sperme bez spermatozoida za potrebe vantelesne oplodnje spermatozoidi se mogu dobiti biopsijom testisa ili aspiracijom epididimisa. Na ovaj način dobijen uzorak je izuzetno malog volumena, često sa spermatozoidima lošeg kvaliteta i zato je vantelesna oplodnja ICSI metodom izbor lečenja ovih pacijenta. [79].

Oplodnja ili spajanje polnih ćelija: Trenutak u kome se oocita i spermatozoid spajaju u laboratorijskim uslovima se odigrava uz pomoć i intervencije embriologa. Intervencija embriologa može biti minimalna, kada se jajne ćelije i spermatozoidi stavljaju u odgovarajuću posudu, gde se u posebnoj kulturi i pod odgovarajućim uslovima stvaraju uslovi za njihovo međusobno spajanje. Ova procedura se zove konvencionalna vantelesna oplodnja odnosno konvencionalni IVF. Asistencija embriologa u procesu vantelesne oplodnje može biti i mnogo značajnija. U procesu intracitoplazmatske injekcije spermatozoida (ICSI; engl. *intracytoplasmic sperm injection*), embriolog uz pomoć mikroskopa i mikromanipulatora direktno ubrizgava spermatozoid u jajnu ćeliju [64].

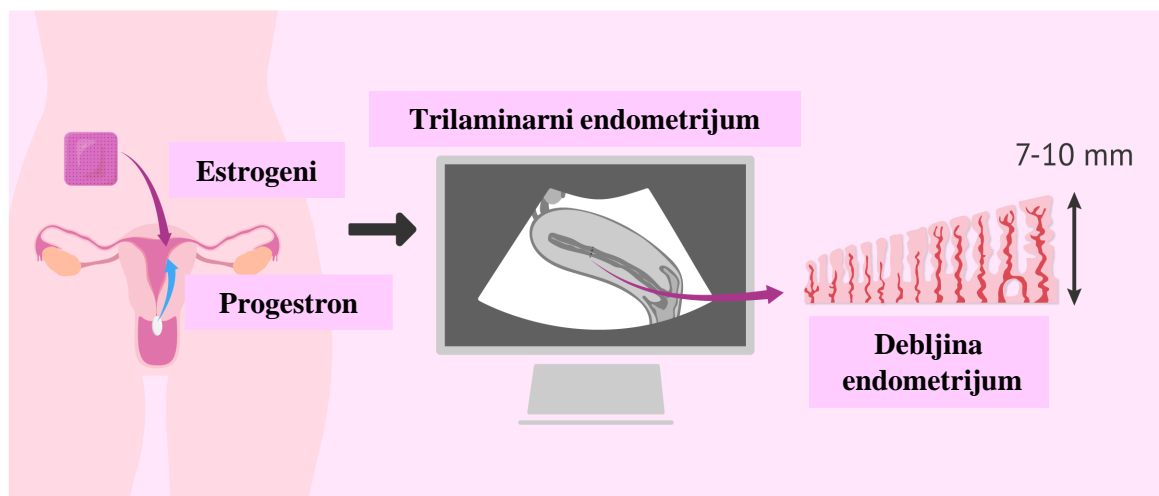
Provera fertilizacije: U vremenskom intervalu koji iznosi 16 do 20 sati nakon oplodnje, embriolog proverava da li je oocita oplođena i da li je došlo do

eventualne greške koja bi sprečila fuziju reproduktivnih ćelija (Slika 14). Provera se obavlja analiziranjem prisustva dva polarna tela, *engl. polar body* (PB) i dva pronukleusa, *engl. pronucleus* (PN), koji će se spojiti da bi dali zigot (jednoćelijski embrion) [56].



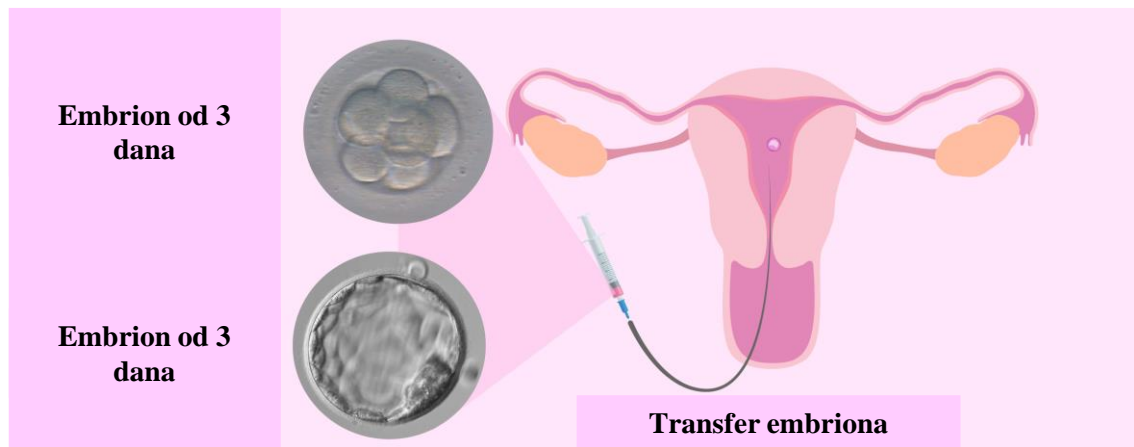
Slika 14. Provera fertilizacije.

Kultura embriona: Zigot/i se ostavlja/ju u kulturi da nastavi/e svoju evoluciju, prolazeći kroz stadijum embriona, morule i blastociste. Ovi embrioni će biti ostavljeni u posebnom inkubatoru koji održava idealnu temperaturu i gasne uslove za rast embriona do trenutka transfera u matericu majke [65]. Za vreme boravka embriona u inkubatoru vrši se monitoring njihovog stanja i kvaliteta. Pacijentkinja za to vreme dobija hormonske preparate za pospešivanje receptivnosti endometrijuma, sa ciljem da se embrion implantira i ostvari trudnoća [62, 71]. Receptivni endometrijum je onaj koji ima mogućnost da obezbedi implantaciju embriona i na ultrazvučnom pregledu ima trilaminarni izgled i debljinu od približno 8 do 10 mm (Slika 15).



Slika 15. Priprema endometrijuma za transfer.

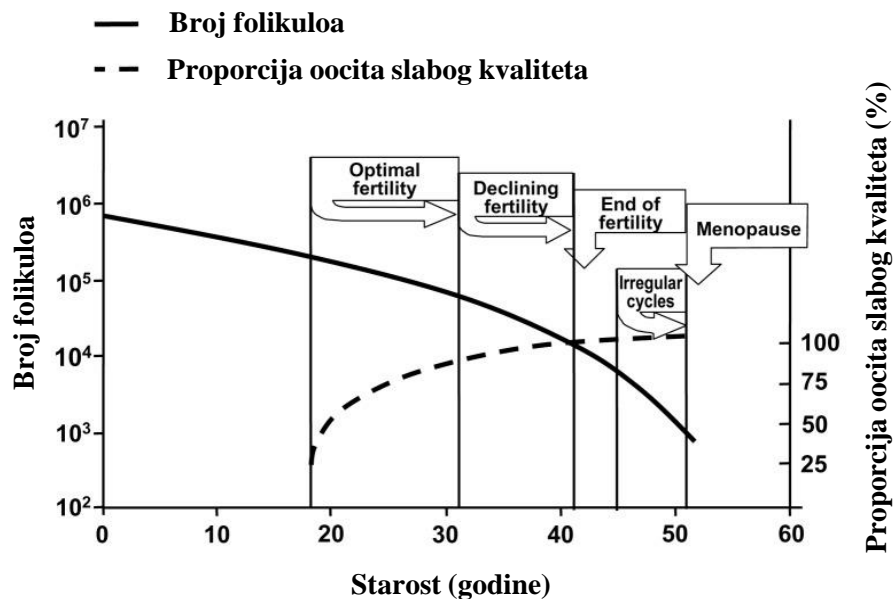
Embriotransfer: Na osnovu morfoloških karakteristika embriona bira se embrion za koji se pretpostavlja da ima najveći implantacioni potencijal (Slika 16). Ovaj embrion se uz pomoć katetera unosi u matericu pacijentkinje, sa ciljem da se implantira u endometrijum i da se na taj način ostvari trudnoća [65].



Slika 16. Transfer embriona.

1.5.4. Parametri kvaliteta oocita

Pored velikog napretka u oblasti ART-a i dalje postoje brojni faktori koji utiču na uspešnost procedure, pri čemu se kvalitet oocita i embriona koji se transferuju u matericu ističu kao najkritičnije tačke. Od suštinske važnosti jeste kvalitet spermatozoida i oocita, kako bi embrion bio potpuno funkcionalan i pravilno se razvijao [80, 81]. Međutim osnovni molekularni mehanizmi regulacije stvaranja i sazrevanja kvalitetnih oocita još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Takođe, reproduktivno starenje žena je povezano sa smanjenim kvalitetom oocita (Slika 17) [82, 83]. Najčešći faktori koji utiču na smanjenje kvaliteta oocita povezani su sa povećanim mejotičkim greškama, poput aneuploidije. Pored toga, proizvodnja i homeostaza ćelijske energije i metabolizma, epigenetska regulacija i faze ćelijskog ciklusa imaju važnu ulogu u razvoju kvalitetne oocite [84]. Studije ekspresije gena u oocitima pokazale su razlike u nivoima ekspresije gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, formiranja deobnog vretena i integriteta organela, što sugeriše da bi ovi mehanizmi mogli biti promenjeni u oocitima starijih žena [85, 86]. Starenje takođe dovodi do aberantne degradacije majčinih transkripata tokom sazrevanja i nepovoljno utiče na kvalitet oocita [84, 87]. Sa starošću žene smanjuje se njena ovarijalna rezerva, odnosno smanjuje se kapacitet jajnika da stvara visokokvalitetne oocite neophodnih za uspešnu trudnoću. Ovarijalna rezerva definiše se kao broj preostalih folikula u oba jajnika za dati uzrast [83]. Žene se rađaju sa ograničenim brojem folikula (1-2 miliona), a ovaj broj se smanjuje sa godinama života [88]. Smanjenje broja folikula uslovljava pojavu nepravilnih ciklusa, a kasnije i menopauze [83].



Slika 17. Kvantitativni i kvalitativni pokazatelj pula folikula u jajniku. Preuzeto iz [83].

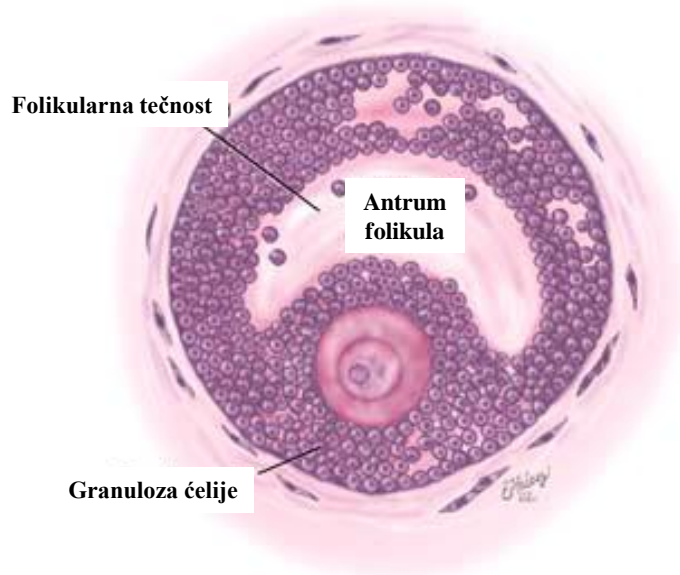
Mlade žene takođe mogu imati smanjenu rezervu jajnika, a uzrok ove pojave najčešće nije razjašnjen [89]. Nejasno je da li žene sa smanjenom rezervom jajnika imaju oocite lošijeg kvaliteta [84]. Smanjen broj antralnih folikula, engl. *Antral follicle count* (AFC), ukazuje na nisku ovarijalnu rezervu i implicira loš odgovor jajnika na KOS [90]. Oocite dobijene iz folikula malih promera su nižeg stepena zrelosti što se odražava na smanjen kvalitet oocita i manju šansu za uspeh vantelesne oplodnje [84, 91]. Uprkos kontinuiranom napretku medicine, procena kvaliteta oocita i dalje podrazumeva karakterizaciju na morfološkom nivou, osim u slučaju džinovske oocite, polarnih tela i agregata glatkog endoplazmatskog retikuluma [92]. Morfološki procena kompetentnosti oocita je isuficijentan metod, te zbog toga postoji potreba pronalaženja novih pouzdanih biomarkera za procenu kvaliteta oocita. Iako se broj novih istraživanja usmerenih ka pronalaženju novih biomarkera za procenu kvaliteta oocita konstantno povećava [91], do sada nije pronađen pouzdan neinvazivan način za procenu kvaliteta oocita. Određivanje kvaliteta oocita će pomoći identifikaciju ključnih regulatora koji bi se mogli koristiti kao biomarkeri kvaliteta oocita, što bi istraživačima i kliničarima omogućilo da poboljšaju efikasnost VTO i ishod trudnoće.

1.5.4.1. Morfološki kriterijumi kvaliteta oocita

Morfološka evaluacija oocita u klinikama za VTO uključuje procenu morfologije kumulus-oocitnih kompleksa (COC; engl. *cumulus-oocyte complex*), citoplazme oocita, polarnog tela (PB; engl. *polar body*), zone pellucide, perivitelinskog prostora i mejotičkog vretena (Slika 18) [92]. Procena morfoloških karakteristika oocita može pružiti dragocene informacije kako bi se izvršio izbor oocita najvišeg kvaliteta koja će generisati embrione sa većim razvojnim potencijalom [93, 94]. Međutim, morfološka ocena kvaliteta oocita je dosta nepouzdana zbog subjektivnosti embriologa.

Ekstruzija PB predstavlja indikator zrele (MII) oocite, što se primenjuje kao najčešći kriterijum za procenu nuklearne kompetencije [94]. Međutim, ekstruzija prvog PB ne ukazuje na citoplazmatsku kompetenciju oocita. Dobro oblikovane, glatke jajne ćelije normalne veličine, sa nefragmentisanim prvim PB povezane su sa većim šansama za ostvarivanje trudnoće [95, 96], mada rezultati nekih studija to opovrgavaju [97, 98]. Procena kvaliteta oocita se vrši evaluacijom kompaktnosti COC. Oocite dobrog kvaliteta pravilno su ugrađene u proširenje kumulusnih ćelija koje je sastavljeno od najmanje pet slojeva, međusobno okruženih blistavim nizom ćelija korone radijate [92]. Kvalitet oocite se određuje i na osnovu boje citoplazme, kao i veličine i distribucije vakuola i granula koje se u njoj nalaze. Najkvalitetnijim humanim oocitama se smatraju oocite bez abnormalnosti oblika, sa providnom, čvrstom i homogenom citoplazmom bez ikakvih granulacija i sa vrlo malim brojem vakuola [92, 95]. Debljina i boja zone pellucidae su dodatni indikator kvaliteta oocita (slika 18). Najkvalitetnije humane oocite su one koje imaju dvostruku refrakciju zone pellucide od oko 20 mm [99]. Procena kvaliteta oocita se radi i prema veličini i sadržaju perivitelinskog prostora. Procenjuje se da humane oocite sa velikim perivitelinskim prostorom i sa granulama imaju nižu razvojnu kompetenciju od onih sa agranularnim perivitelinskim prostorom normalnih dimenzija [100]. Izgled mejotičkog vretena je jedan od važnih parametara procene kvaliteta oocita. Pravilno poravnanje hromozoma na mejotskom vretenu je osnova za njihovu pravilnu segregaciju tokom mejoze i kasnije za oplodnju. Parametri mejotičkog vretena koji mogu da ukazuju na kvalitet oocita su lokacija i refrakcija [92, 93]. Takođe, oociti sa deobnim vretenima dovode se u vezu sa višim razvojnim potencijalom nakon oplodnje [101].

Iako mnogi morfološki parametri za procenu kvaliteta oocita predstavljaju dobru osnovu za utvrđivanje kompetencije oocita, postoje brojne karakteristike koje se ne mogu odrediti morfološkim metodama. Prema tome, molekularni testovi moraju biti sprovedeni u samoj oociti ili u folikularnim ćelijama i folikularnoj tečnosti (FT), kako bi se pronašao najtačniji mogući metod za procenu kvaliteta oocita.



Slika 18. Izgled oocite.

1.5.4.2. Analiza ekspresije gena

Jedan od važnijih faktor za procenu kvaliteta oocita je analiza njenog transkriptoma, s obzirom da su rast i sazrevanje oocita povezani sa dinamikom transkripcione promene, kao što su visoka transkripciona aktivnost rastućih oocita i utišavanje transkripcije zrelih oocita. Zbog toga je analiza transkripcionih promena savremenim metodama kao što su nove generacije metoda za sekvenciranje DNK i DNK mikroerej u oocitama korišćene u brojnim studijama za procenu kvaliteta jajne ćelije [102, 103]. Međutim, nedovoljna dostupnost humanog materijala razlog je male količine informacija u vezi sa transkriptomom humanih oocita [103, 104]. U meta-analizi u kojoj su izučavani potencijalni geni odgovorni za kvalitet oocita i embriona, identifikovana su 63 gena kandidata koji bi mogli biti povezani sa kvalitetom oocita kod nekoliko vrsta sisara (miševi, goveda, majmuni i ljudi) [105]. Studije su ukazale na različitu ekspimiranost gena u jajnim ćelijama visokog i niskog kvaliteta [106]. U studiji u kojoj je izučavana ekspresija gena u MII oocitama mladih miševa (5-6 nedelja starosti) i starih miševa (42-45 nedelja starosti), pokazano je da je 530 gena različito ekspimirano između grupa, uključujući gene koji utiču na funkciju mitohondrija [107]. Druga studija sprovedena na miševima, otkrila je da su iRNK strukturnih gena zone pellucide (Zp1, Zp2 i Zp3) bile veoma zastupljene u potpuno odraslim oocitima u stadijumu vezikule, dok ih skoro nema u zrelih oocitima u stadijumu metafaze II [108]. Ovi podaci ukazuju da oociti u različitim fazama sazrevanja imaju različite molekularne profile, kao i da aberantna ekspresija gena može dovesti do nižeg kvaliteta oocita. Ipak, potrebno je sprovesti više studija kod ljudi kako bi se razumela biološka uloga transkribovanih gena u procesima uključenim u sazrevanje oocita, kao i u pronalaženju pouzdanih biomarkera kvaliteta oocita i embriona.

1.5.4.3. Neinvazivne metode za identifikaciju biomarkera kvaliteta oocita

Procedure koje se koriste za procenu kvaliteta oocita nedovoljno su senzitivne u kliničkoj praksi. Stoga je identifikacija faktora koji se odnose na razvojne kapacitete oocita nophodna za pouzdanu procenu statusa oocita. Sa ovim ciljem, brojne studije su izučavale promene transkriptoma, proteina i metaboličkih parametara u folikularnoj tečnosti i folikularnim ćelijama (granuloze i kumulus ćelije), kako bi se pronašli neinvazivni biomarkeri kvaliteta oocita [91, 109, 110].

Humana FT je složena telesna tečnost u folikulu jajnika. Transkriptomске studije su identifikovale neke moguće biomarkere koji bi mogli da ukažu na kvalitet oocita [109, 110]. Takođe, identifikovani su i novi proteini koji nisu prethodno opisani, poput faktora rasta, signalnih molekula, hormona i imunoloških faktora, kao što su ODF3L2, MIOZ2, PLAC4, SPOCK3, TKTL-2 [111]. Rezultati metaboličkih studija pokazuju da ugljeni hidrati, aminokiseline i lipidi imaju veliki uticaj na sticanje razvojne kompetencije oocita [112].

Interakcija oocita i ćelija kumulusa (CC - *engl. cumulus cells*) je ključna za porast serumskih nivoa LH. Pre serumskog skoka LH, folikularne ćelije se diferenciraju u CC koje okružuju oocite i muralne ćelije, koje se nalaze u spoljašnjem delu folikula [113, 114]. Interakcija oocita i granuloza ćelije i kontrola

funkcije CC je regulisana posredstvom signalnih puteva GDF9, BMP15 i FGF8, pod uticajem FSH koji određuje fenotip i funkcionalnost CC [114]. Ekspresija PTKS3 gena je u pozitivnoj korelaciji sa kompetencijom oocita u grupisanim CC [115]. U studiji sprovedenoj sa udruženim CC otkriveno je 5 gena (CIP19AI, SERPINE2, CDC42, FDKSI i HSD3BI) koji su u pozitivnoj korelaciji sa trudnoćom [116]. Takođe, identifikovano je 45 mogućih gena koji se odnose na procese kao što su vezivanje jona, transkripcija, ćelijska komunikacija i adhezija i regulacija ćelijskih procesa [117]. Dalje istraživanje profila ekspresije CC će poboljšati razumevanje mehanizma sazrevanja oocita i otkriti pouzdane indikatore kvaliteta oocita. Jedan pristup može biti proučavanje profila transkripcije CC jajnika kod starijih tkiva i njegova povezanost sa rezervom jajnika i stopama sazrevanja oocita, što se može koristiti kao neinvazivni marker za kvalitet oocita. U cilju razumevanja značaja kvaliteta oocita, moraju se uzeti u obzir biološki procesi, kao što su folikulogeneza i oogeneza, ali i razumeti kako se hormoni koji regulišu ova dva procesa adaptiraju tokom menstrualnog ciklusa.

1.6. Ovarijalni i endometrijalni ciklus

Prva polovina ovarijalnog ciklusa naziva se folikularna faza, koju na početku karakteriše nizak nivo estrogena. Pod uticajem GnRH dolazi do stimulacije hipofize da luči FSH i LH. Ovi hormoni, stimulišu rast nekoliko folikula, a svaki od njih sadrži jednu oocitu. Oko sedmog dana ovarijalnog ciklusa, serumski nivoi estrogena značajno rastu i počinju da inhibiraju lučenje FSH, usled čega manji folikuli prestaju sa rastom i podležu procesu atrezije. Krajem folikularne faze, sredinom menstrualnog ciklusa (14. dan ciklusa), nivoi estrogena su dovoljno visoki da stimulišu proizvodnju GnRH, što stimuliše hipofizu da luči LH. Oslobođanje LH pokreće sazrevanje i ekstruziju zrelog oocita iz folikula. Nakon ovulacije, ćelije u folikulu prolaze kroz transformaciju, pri čemu nastaje žuto telo. Druga polovina ovarijalnog ciklusa naziva se lutealnom fazom, koja započinje ovulacijom i nakon nje traje aproksimativno 14 dana. Tokom lutealne faze, žuto telo pored estrogena proizvodi velike količine progesterona koje služe za pripremu endometrijuma za implantaciju. Pod uticajem progesterona materica stvara visoko vaskularizovano tkivo za prihvatanje oplođene oocite. U slučaju oplodnje oocite i implantacije, žuto telo nastavlja da proizvodi progesteron do oko 10 nedelje gestacije, sprečavajući izbacivanje endometrijuma. U suprotnom, ako ne dođe do oplodnje, cirkulišući nivoi progesterona opadaju sa degeneracijom žutog tela i endometrijum se odvaja, što dovodi do krvarenja.

1.6.1. Folikulogeneza

Tokom folikulogeneze dolazi do sazrevanja oocita, ali se tokom folikulogeneze i determiniše kvalitet jajne ćelije [92]. Folikulogeneza se odvija unutar korteksa jajnika, gde folikuli različitih veličina predstavljaju različite faze folikulogeneze. Glavni cilj folikulogeneze je stvaranje jednog dominantnog folikula iz skupa folikula u različitim fazama rasta. Svi primordijalni folikuli prisutni u humanim jajnicima formiraju se u fetusu najkasnije u 20. nedelji trudnoće kada oni dostižu svoj maksimalni broj prosečno do 5 miliona [118]. Broj primordijalnih folikula se konstantno smanjuje tokom celog, a ne samo reproduktivnog života žene. Nestajanje primordijalnih folikula prisutno je i tokom intrauterinog života, što rezultuje prosečnim brojem primordijalnih folikula od oko 2 miliona u momentu

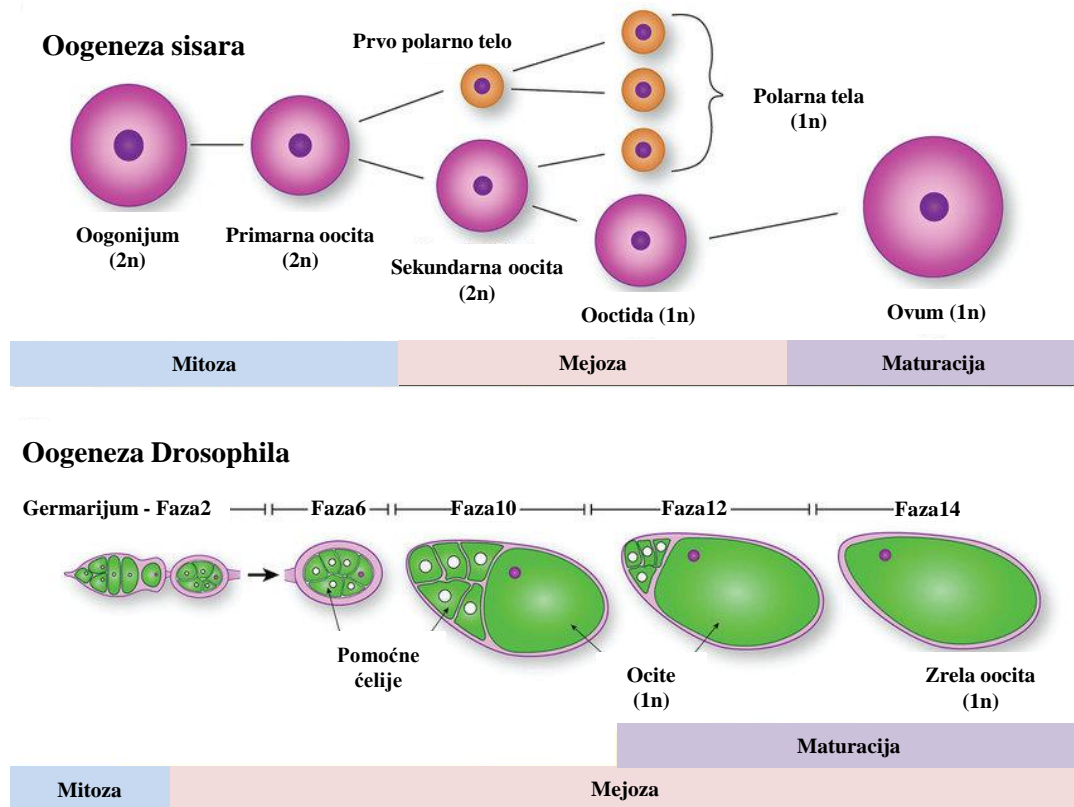
rođenja. Propadanje primordijalnih folikula se nastavlja i nakon rođenja, tako da do trenutka ulaska devojčice u pubertet broj preostalih folikula iznosi svega 400.000. U momentu kada svi primordijalni folikuli nestanu, odnosno kada se iscrpi rezerva jajnika, nastupa menopauza. U ljudskom fetusu, razvoj folikula počinje **primordijalnim folikulom**, malim folikulom prečnika oko 0,03-0,05 mm koji sadrži spljošteni sloj skvamozne granulozne ćelije koje okružuju oocit. Rastom primordijalnog folikula, dostiže prečnik od 0,1 mm, kada se granulozne ćelije menjaju iz skvamoznih u kuboidne, na taj način formirajući **preantralni**, odnosno **primarni folikul** [119]. Postepena evaluacija primarnog u **sekundarni folikul** se karakteriše značajnim povećanjem folikularnog prečnika, koji se od početne vrednosti koja iznosi 0,1 mm poveća za dva do četiri puta, rezultujući prečnikom sekundarnog folikula čija se vrednost kreće od 0,2 do 0,4 mm. Ovaj rast folikula se objašnjava kontinuiranim mitotičkim deobama granuloznih ćelija, što za rezultat ima formiranje višeslojnog (šest do devet slojeva) omotača granulosa ćelija. Ključni momenat u razvoju sekundarnog folikula je kondenzacija stromalnih ćelija koje neposredno okružuju primarni folikul i formiranja sloja teka ćelija oko bazalne membrane, najperifernijeg sloja folikula. Tada se formiraju teka interna i teka eksterna. Istovremeno sa formiranjem ova dva sloja stvara se razgranata mreža kapilarnih sudova nastala procesom angiogeneze. To omogućava cirkulisanje krvi između dva sloja teka ćelija i snabdevanje folikula hormonima i hranljivim supstancama. Tranzicija sekundarnog folikula u **tercijarni**, odnosno **antralni folikul**, je moguća isključivo u reproduktivnom period života žene. Tranzicija započinje pojavom šupljine ispunjene tečnošću u ćelijama granuloze, a koji nazivamo antrumom folikula. Ovaj proces se naziva kavitacija i kontrolisan je autokrinim/parakrinim mehanizmima i faktorima rasta. Ovim je uspostavljena osnovna struktura tercijarnog folikula i on neće promeniti svoju strukturu tokom daljeg folikularnog rasta. Za formiranje folikularne tečnosti, povećanje njene zapremine, a samim tim i zapremine antruma odgovorni su FSH i LH hormoni [120]. Zato se promer tercijalnih folikula kreće u velikom rasponu dimenzija, od 0,4 pa čak i do preko 20 mm. Bez obzira na veličinu, svi tercijarni folikuli imaju sličnu strukturu, odnosno antrum koji u sebi sadrži folikularnu tečnost, teku internu i eksternu, bazalnu laminu, sloj granulosa ćelija i oocitu. Ćelije granuloze tercijalnog folikula se na osnovu regiona u kome se nalaze, odnosno njihovog položaja unutar folikula dele na ćelije korone radiate (koja okružuje zonu pellucidu), ćelije membrane granuloze i periantralne ćelije i kumulusne ćelije, odnosno ćelije kumulus oophorous-a, engl. cumulus-oophorus cells (CC). CC povezuju membranu granulozu i koronu radiatu i ključan je za sazrevanje oocita. Sudbina tercijarnih folikula može biti da oni nastave svoj rast i razvoj i ovuliraju ili da prođu kroz proces atrezije, a kroz koji prolazi ubedljivo najveći broj folikula. Tercijarni folikuli koji nastavljaju svoj razvoj, progresivno postaju sve više diferencirani sa vremenom dok ne dostignu preovulatornu fazu. Nasuprot tome, **atretični folikuli** su normalno manji od 10 mm u prečniku pošto njihove granulozne ćelije prestaju da se dele i počinju da eksprimiraju gene povezane sa apoptozom. Sudbina koju će tercijarni folikuli doživeti određena je povećanjem nivoa FSH. Folikuli koji imaju manje FSH receptora u ćelijama kumulusa ili koji se nalaze u oblastima sa nižom koncentracijom FSH, neće moći dalje da se razvijaju i postaće atretični [121].

Od ukupnog broja folikula u procesu maturacije, samo jedan od folikula postaje dominantan [122]. Ćelije granuloze dominantnog folikula ubrzanom deobom

dovode do ubrzanog folikularnog rasta. Folikul prečnika 20 i više milimetara nazivamo preovulatornim. KOS primenom gonadotropina sprečava selekciju jednog dominantnog folikula i omogućava istovremeno sazrevanje većeg broja folikula. Cilj KOS-a je sazrevanje i prikupljanje maksimalanog broja oocita da bi se obezbedio što veći broj embriona i povećale šanse za uspeh VTO. Na kraju folikularne faze prirodnog ciklusa, a nakon porasta serumskih vrednosti LH, dolazi do prskanja folikula odnosno formiranja otvora u sloju CC. Ovaj događaj se naziva ovulacija i ona predstavlja završni događaj u procesu folikulogeneze [123].

1.6.2. Oogeneza

Oogeneza je proces kojim se oocita razvija iz svog prvobitnog stanja (primordijalne germinativne ćelije, *engl. primordial germ cells*- PGC) do potpuno zrele oocite koja je sposobna da bude oplođena (Slika 19) [124]. Razvoj oocita se sastoji od tri faze: proliferacije PGC, rast oocita i sazrevanje oocita. Kod većine sisara oogeneza dešava se tokom mnogo godina i ove tri faze se odvijaju u različito vreme tačke tokom života žene.



Slika 19. Oogeneza.

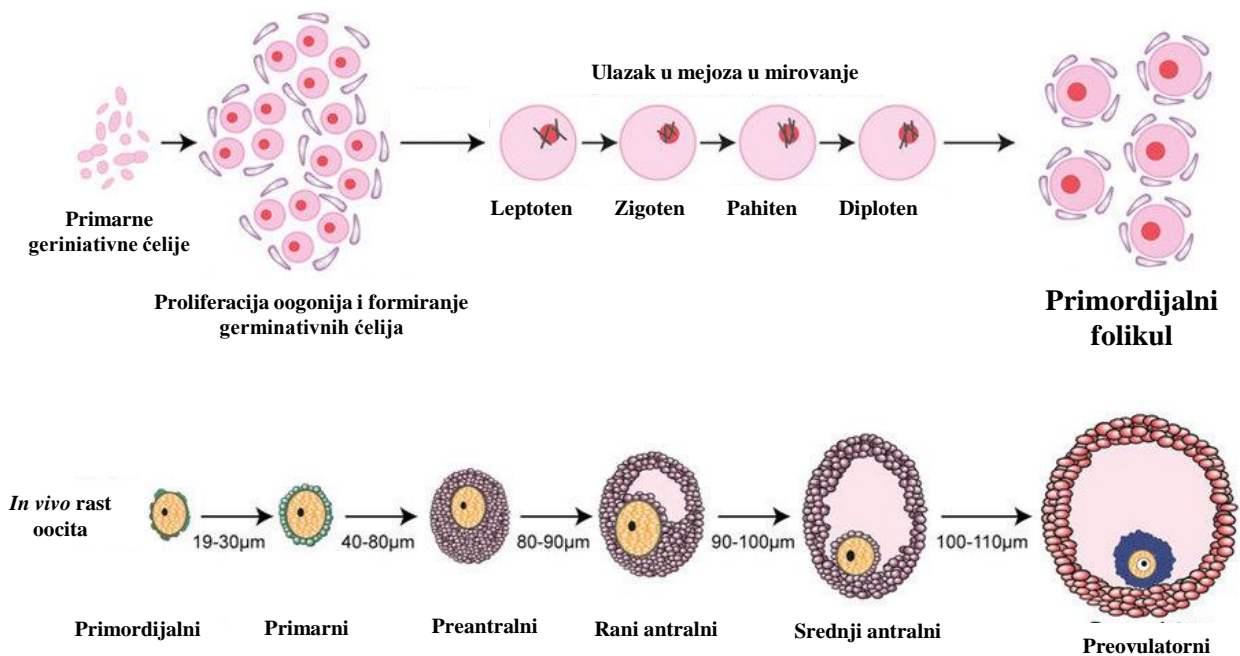
1.6.3. Faza proliferacije

Rano u embriogenezi, primordijalne zametne ćelije (PGC) migriraju iz žumančane kese endoderma do genitalnog grebena (jajnik fetusa u razvoju). Generacija PGC-a uzima mesto u jajniku fetusa otprilike 3 nedelje nakon oplodnje i počinje sa serijama mitotičkih podela koje povećavaju broj PGC unutar fetalnog

jajnika do 1-2 miliona ćelija i formiranju oogonije [123]. Posle nekoliko krugova mitotičke deobe zametnih ćelija, otprilike u 11. ili 12. nedelji gestacije, oogonije se kondenzuju i formiraju pojedinačne primordijalne folikule [125]. Zatim, oogonije prekidaju mitotičku aktivnost i ulaze u mejozu, postajući primarne oocite. U ovom trenutku, oociti su unutar primordijalnih folikula i nastavljaju kroz mejozu sve dok ne uđu u profazu I, gde je razvoj zaustavljen u fazi diplotena. Zaustavljanjem se održavaju visoki nivoi intracelularnog cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) koji luče okolne granulozne ćelije koje se transportuju u oocit [126]. Sintezu cAMP kontroliše FSH koji je odgovoran za održavanje oocita u ovom zaustavljenom stadijumu od rođenja do trenutka kada se regrutuje za ovulaciju [126]. Morfološki, oociti zaustavljeni u profazi mejoze I su u stadijumu germinativnih vezikula (*engl. germinal vesicle*- GV), a karakteriše ih uvećano jedro [123].

1.6.4. Rast oocita

Proces rasta oocita počinje kada se formira primordijalni folikul i nastavlja se do razvoja tercijalnog ili De Graafvog folikula (Slika 20). Rast oocita je strogo kontrolisan aktivnošću CC-a folikula, koji okružuju oocite tokom razvoja folikula i ovulacije i pomaže oociti da stiče svoj kvalitet [125]. S druge strane, oociti takođe kontrolišu kumulusne i granulozne ćelije budući da određuju brzinu rasta folikula i sazrevanje i regulisanje metaboličke aktivnosti CC i ekspresije gena [127]. Oociti i CC takođe imaju slabu metaboličku aktivnost, zbog čega su im potrebne CC kako bi nadomestile sve metaboličke procese neophodne za rast i sazrevanje [120]. CC dvosmerno komunicira sa oocitom parakrinim signalima i/ili kroz međucelijske kanale koji omogućavaju razmenu malih molekula (<1kDa) kao što su transkripti, aminokiseline i metaboliti [128]. Oociti su okruženi slojem glikoproteina koji se zove zona pellucida [129]. Tokom rasta, oocita povećava svoju veličinu (skoro 100 puta povećanje zapremine) i akumulira nove RNK, jone i metaboličke supstrate kao što su šećeri i lipidi, potrebne za njihov rast i sazrevanje i za rani embrionalni razvoj [86]. Akumulirani transkripti podržavaju završne korake sazrevanja oocita kao i početne deobe embriona, do aktivacije embrionalnog genoma [130]. Oocit takođe proizvodi, reorganizuje i replicira nove citoplazmatske organele kao što su mitohondrije. Kada žena uđe u pubertet, folikuli će biti izloženi višim nivoima gonadotropina (LH i FSH). Zahvaljujući ovom porastu gonadotropnih hormona, oocit može da završi fazu rasta (dostizanje konačne veličine od 60-120 μm) i nastavi mejozu [126]. Nakon porasta LH, oociti regulišu ekspresija CC gena odgovornih za ekspanziju CC, koji luče mucinozni matriks koji sadrži hijaluronsku kiselinu. Kada se CC prošire oocita nastavlja mejozu [121]. Nakon nastavka mejoze, oocit će započeti završnu fazu sazrevanja, tačnije regulisani proces neophodan za ovulaciju i naknadnu oplodnju, u kojoj oociti završavaju prvu mejotsku podelu i nastavljaju od profaze I do metafaze II mejoze [123].



Slika 20. Rast oocita.

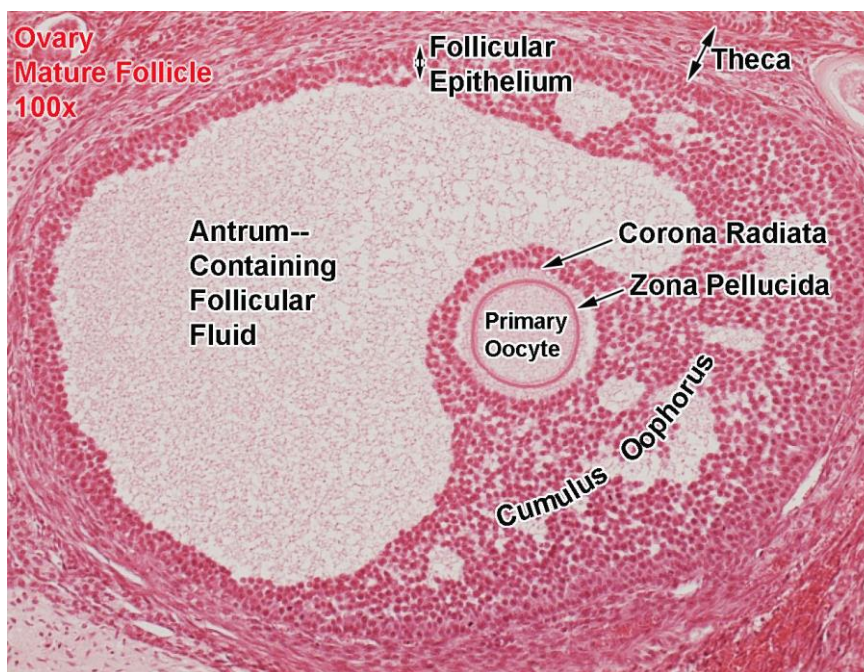
1.6.5. Sazrevanje oocita

Sazrevanje oocita je jedan od najvažnijih procesa oogeneze, jer će odrediti kvalitet ovuliranog oocita, bolje definisan kao „razvojna kompetencija”. Kompetencija za razvoj oocita je sposobnost da se održi razvoj embriona, dok embrion ne bude u stanju da aktivira sopstveni genom [131]. Razvojna kompetentnost je određena sa dva aspekta: nuklearno i citoplazmatsko sazrevanje. Nuklearna kompetencija se odnosi na sposobnost oocita da prođe potpunu mejozu, što ima suštinski efekat na razvoj oocita i embriona [132]. Sazrevanje citoplazme se odnosi na sticanje transkripata, proteina i organela koji će obezbediti uslove za rani razvoj pre implantacije. Citoplazmatska kompetencija zavisi od velikog broja faktora, od kojih se mnogi mogu proceniti samo na ćelijskom i molekularnom nivou [123].

Nuklearno sazrevanje: Sazrevanje jedra počinje porastom LH koji izaziva slom klica vezikula oocita i njeno obnavljanje mejoze. Oocit napreduje iz profaze I do metafaze I i homologni hromozomi se poravnavaju u metafaznoj ploči, sastavljajući prvo mejotičko vreteno. Zatim, sestrinske hromatide - homologni hromozomi se razdvajaju u anafazi I. Oocita sada prolazi kroz asimetriju citokineze i skoro cela citoplazma ostaje sa oocitom koja postaje sekundarni oocit. U ovom trenutku, u telofazi I, sestrinske hromatide homolognih hromozoma migriraju na suprotne polove. Paralelno, formira se prvo polarno telo (PB) i ekstrudira se iz oocita. Ovaj PB sadrži veoma mali deo citoplazme i polovinu genetskog materijala. Oocit se ponovo zaustavlja u metafazi II posle ovulacije, dok ne dođe do oplodnje. U ovom trenutku se razmatra oocit mejotski zreo i naziva se MII oocit. Prilikom oplodnje, sperma se vezuje za receptor na površini oocita i pokreće signal koji stimuliše hidrolizu fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (*engl. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*- PIP2) što rezultira povećanjem nivoa Ca^{2+} u oocitu. Ovo povećanje

Ca²⁺ u citosolu oocite nakon oplodnje i aktivira prelazak iz metafaze u anafazu [121, 123].

Sazrevanje citoplazme: Sazrevanje citoplazme se može podeliti na 3 međusobno povezana događaja: distribucija organela, reorganizacija citoskeleta i molekularno sazrevanje (Slika 21). Ovi procesi su regulisani od razlike u koncentraciji hormona koje luče ćelije kumulusa. Iako su u ovom delu sumirana tri procesa, focus je uglavnom na proučavanju molekularnih faktora koji utiču na sazrevanje citoplazme, jer se smatra da je to proces sa najvećim uticajem na određivanje kvaliteta oocita i njene sposobnosti sticanja razvojne kompetencije [133].



Slika 21. Izgled zrelog folikula.

1.7. Azot-monoksid (NO) i njegova uloga u regulaciji reprodukcije

1.7.1. Azot-monoksid (NO)

Pre prošlog veka, NO se smatrao jednostavnim neorganskim molekulom koji je toksičan za žive organizme. Godine 1980, Furchgott i Lavadzki su otkrili da vaskularne endotelne ćelije mogu proizvesti i osloboditi vazodilatirajuću supstancu, relaksirajući faktor koji potiče od endotelnih ćelija [134]. Studije Palmera i drugih su 1987. godine pokazale da je NO vazodilatirajuća supstanca koju oslobađaju vaskularne endotelne ćelije, koja može da snizi krvni pritisak, inhibira proliferaciju vaskularnih ćelija glatkih mišića i inhibira adheziju trombocita [135]. NO dobija sve veću pažnju u različitim oblastima nauke o životu i postaje fokus intezivnih biomedicinskih istraživanja. Američki časopis *Science* 1992. godine nazvao je NO „molekulom godine”, a zatim je Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 1998. dodeljena trojici američkih farmakologa za otkriće „NO, kao signalnog molekula kardiovaskularnog sistema”, što je izazvalo veliku pažnju usmerenu ka izučavanju njegovih bioloških efekata i mehanizma delovanja [136]. NO je ćelijski i efektorski

molekul. Njegova struktura je jednostavna, lako difunduje, izuzetne je reaktivnosti, nestabilnih svojstava i njegovo vreme biološkog poluraspada je kratko [137]. Takođe, NO, kao neorganski slobodni radikal, je poseban biološki signalni molekul, koji proizvode i oslobađaju vaskularne endotelne ćelije i učestvuje u različitim fiziološkim i patološkim procesima u nervnom, kardiovaskularnom, respiratornom, digestivnom i imunskom sistemu [138]. U ženskom reproduktivnom sistemu, NO utiče na veći broj reproduktivnih procesa, kao što su regulacija menstrualnog ciklusa, razvoj folikula, sazrevanje jajnih ćelija, ovulacija, degeneracija žutog tela, oplodnja, implantacija embriona, održavanje trudnoće i regulacija porođaja. U muškom reproduktivnom sistemu, NO utiče na spermatogenezu, sazrevanje spermatozoida i kapacitaciju [139].

1.7.1.1. Osobine i sinteza NO

NO ima fiziološke funkcije, kao što su vazodilatacija, prenošenje nervnih signala i inhibiranje adhezije trombocita [140]. Takođe, značajno utiče na prenos ćelijskih informacija, odbranu ćelija, ali i reproduktivnu aktivnost sisara. NO kao signalni molekul ne samo da deluje na ćelije koje ga proizvode, već može delovati i na susedne i udaljene ćelije, utičući na različite fiziološke i patološke procese u organizmu.

In vivo, NO se sintetise pomoću tri vrste sintaze azot oksida (NOS) [141]. NOS je enzim koji ograničava brzinu u putu delovanja NO. Postoje tri tipa NOS-a: nNOS, eNOS i iNOS [142]. Među njima, nNOS i eNOS su zavisni od kalcijuma, takođe poznati kao cNOS, bez interspecifične specifičnosti, dok je iNOS nezavisan od kalcijuma, sa interspecifičnom specifičnošću. Tip eNOS se uglavnom nalazi prisutan u vaskularnim endotelnim ćelijama, trombocitima, endokardu, mozgu i nervnim tkivima i ona katalizuje proizvodnju osnovnog NO. Tip nNOS je uglavnom prisutan u mozgu, kičmenoj moždini, perifernim nervima i u manjoj meri u traheobronhijalnom stablu i kostima [143]. U nervnim tkivima, nNOS luči samo NO u maloj koncentraciji, uglavnom kada je to neuronima potrebno za njihovo funkcionisanje. iNOS se nalazi u mnogim drugim tkivima izuzev nervnog tkiva i indukuje se u stanjima upale kao i imunološkim odgovorima [144]. cNOS gen se eksprimira na niskom nivou u fiziološkim uslovima, ali se njegova aktivnost brzo povećava pod dejstvom agonista, sa ispoljavanjem svog efekta u periodu od nekoliko sekundi. Tip iNOS nije prisutan u fiziološkim uslovima, i njegova ekspresija je regulisana citokinima, kao što su endotoksin, inflamatorni citokini i nuklearni faktori. Koncentracija NO proizvedenog ekspresijom iNOS je značajno veća od koncentracije NO koja se oslobadja pod delovanjem cNOS. Takođe, iNOS ima najveću funkciju u citotoksičnosti, inhibiciji rasta ćelija, ali i procesima zaštite ćelija [145].

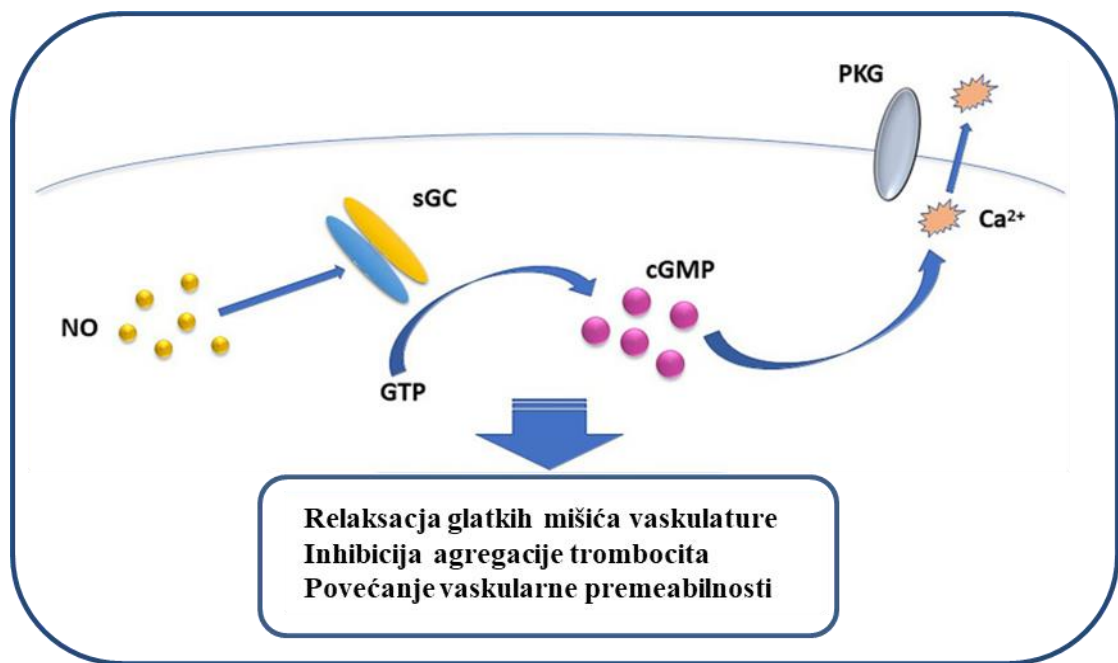
1.7.1.2. Fiziološki i patološki efekti NO

Prisustvo NO u mnogim fiziološkim i patološkim procesima omogućava njegovo detaljnije proučavanje. NO može imati pozitivne ili negativne efekte na određeni fiziološki ili patološki događaj. Fiziološke koncentracije NO su uključene u procese prenosa informacija kao i odbrani od velike količine citokina. Prekomerni ili nedovoljni nivoi NO mogu imati patološke efekte. Prekomerni NO ima toksično dejstvo, dok nedostatak NO onemogućava kvalitativno i kvantitativno obavljanje fizioloških procesa, ali se njegov nedostatak može nadomestiti suplementacijom. U

situacijama kada koncentracija NO dostigne povećan nivo (20 mM), NO je sposoban da veoma brzo reaguje sa okolnim superoksidnim anjonom (O_2^-) i formira peroksinitrit ($ONOO^-$) [146]. $ONOO^-$ je jak oksidant koji može dovesti do oksidacije proteinskih sulfhidrilnih grupa, gvožđe-sumpornih centara i strukture cink prstiju, nitrifikovati ostatke tirozina i inaktivirati mnoge važne proteine i enzime. Takođe, $ONOO^-$ utiče na metabolizam ćelije, inhibira enzime respiratornog lanca, degradira strukturu mitohondrija, destabilizuje DNK i inicira peroksidaciju lipida, što dovodi do oštećenja tkiva [147]. Kada su koncentracije NO i O_2 povećane, može se nizom hemijskih reakcija formirati N_2O_3 koji je sposoban da reaguje sa sulfhidrilnim i amino grupama pri čemu dolazi do formiranja nitrozamina, a formirani nitrozamini imaju sposobnost da inhibiraju neke bitne ćelijske funkcije, kao što je popravljavanje oštećenja DNK, što dovodi do mutacije gena ili ćelijske smrti. Iz prethodno navedenog, može se zaključiti da NO, kao signalni molekul ili kao slobodni radikal, utiče na brojne fiziološke aspekte i to dvosmerno, uključujući apoptozu, zaštitu od degenerativnih promena nervnog sistema, zaštitu od toksičnosti i inhibiciju patološkog procesa.

1.7.1.3. Mehanizam delovanja NO

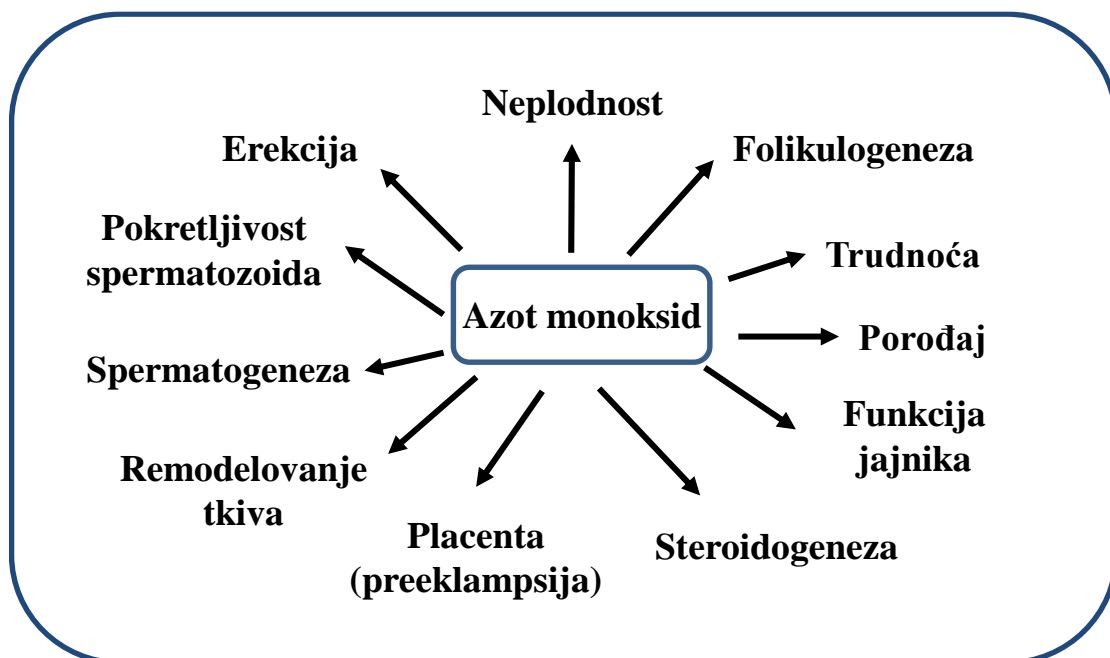
Biološki način delovanja NO uključuje NO-posredovanu aktivaciju ili inhibiciju određenih enzima, ili reagovanje sa O_2^- do $ONOO^-$ koji dovodi do oštećenja tkiva [148]. Danas se smatra da je najčeći mehanizam intracelularnog puta NO upravo vezivanje NO za gvanilat ciklazu (sGC) i aktiviranje sGC pri čemu dolazi do povećanja ćelijske koncentracije cikličnog guanozin monofosfata (cGMP), i usled povećane koncentracije cGMP dolazi do aktivacije cGMP zavisne protein kinaze G (PKG) koja svojom aktivnošću dovodi do smanjenja intracelularne koncentracije kalcijuma, što posreduje u relaksaciji glatkih mišića krvnih sudova, inhibiciji agregacije trombocita, povećanju vaskularne permeabilnosti i drugim biološkim efektima [149]. Takođe, NO ima sposobnost da prepozna Fe^{2+} i grupu potpomognutu hemom u sGC i promeni put delovanja sGC, čime se aktivira enzim i promovise ciklizacija GTP do cGMP [150]. Međutim, drugi mehanizmi delovanja NO, kao što je uticaj na funkciju proteina, mogu biti posredovani S-nitrozacijom. Grupna reakcija koja sadrži hem između NO i proteina je reverzibilna, dok je većina efekata izazvanih NO ireverzibilna, a takođe može biti posredovana nitracijom tirozina, aktivacijom ciklooksigenaze i protein kinaze C (PKC), inhibicijom aktivnosti adenilat ciklooksigenaze (Slika 22).



Slika 22. Unutarćelijski signalni put NO. Preuzeto iz [151]. sGC guanilat ciklaza; cGMP - ciklični guanozin monofosfat; GTP - guanozin trifosfat; NO - azot monoksid; PKG - protein kinaza G.

1.7.2. NO kao regulator fiziologije i biologije reproduktivnog sistema

Danas je poznato da NO proizvode različite ćelije u različitim organima, uključujući ćelije glatkih mišića, mezangijalne ćelije, neuroni, trombociti, hepatociti, makrofagi, fibroblasti i epitelne ćelije. NO reguliše tonus ćelija glatkih mišića, agregaciju i adheziju trombocita, rast ćelija, apoptozu, neurotransmisije i povrede, kao i infekcije izazvane imunološkim reakcijama. Pošto su i ovi procesi povezani sa biologijom, fiziologijom i patofiziologijom različitih reproduktivnih procesa, to implicira da NO ima važnu ulogu u reprodukciji. NO je prepoznat kao molekul koji bitno reguliše biologiju i fiziologiju reproduktivnog sistema (slika 23).



Slika 23. Razni reproduktivni procesi regulisani NO.

1.7.2.1. NO u jajnicima

Uloga NO u regulisanju funkcije jajnika je uočena kada je pokazano da se sinteza NO povećava sa razvojem folikula. Štaviše, uloga hormona u regulisanju sinteze NO tokom razvoja folikula i ovulacije je takođe bila uočena, jer je pokazano da je povećanje NO u korelaciji sa povećanjem nivoa estrogena [152]. Slične promene u cirkulišućim koncentracijama NO, razvojem folikula, je pokazan kod žena podvrnutih VTO koje su tretirane uzastopno sa GnRH, HCG, što je ukazivalo da su i drugi hormoni, kao što su LH, FSH i progesterone, uključeni u regulaciju sinteze NO u procesu folikulogeneze [152]. Indirektna uloga NO u regulisanju funkcije ovarijuma je takođe pokazana u eksperimentima koji pokazuju da IL-1, koji indukuje sintezu NO, je takođe uključen u proces ovaluacije [153]. Imajući u vidu da su folikuli generisani i regulisani faktorima rasta, pretpostavlja se da NO nastao pod delovanjem iNOS-a deluje kao regulator rasta folikula. S tim u vezi, zanimljivo je napomenuti da NO ima dvostruki efekti na rast ćelija. NO sam inhibira rast glatko mišićnih ćelija, međutim, u prisustvu bazičnih faktor rasta fibroblasta (bFGF), NO je moćan mitogen i indukuje rast glatko mišićnih ćelija [154]. Slično, IL-1 indukovana sinteza NO dovodi da pojačanog rasta glatko mišićnih ćelija, pod delovanjem bFGF [154]. Imajući u vidu da su IL-1 kao i bFGF značajno uključeni u rast folikula, pretpostavlja se da prisustvo NO olakšava ovaj process [155]. Takođe NO posreduje u ekspresiji transportera glukoze-3 pod delovanjem IL-1[156]. Pošto se glukoza povećava sredinom, a poznato je da glukoza stimuliše sintezu NO, zaključeno je da NO i glukoza olakšavaju razvoj folikula. Značaj ekspresije NOS i sinteze NO pod delovanjem IL-1 u regulisanju funkcije jajnika je uočena iz zapažanja da, za razliku od LPS i IFN nisu bili u stanju da indukuju aktivnost iNOS u granuloznim ćelijama [157].

Folikulogeneza uključuje proces rasta folikula, ali i programiranu ćelijsku smrt; NO reguliše oba navedena procesa. Danas se smatra da učešće NO u oba ova

procesa u velikoj meri zavisi od interakcija sa drugim faktorima koji nastaju unutar jajnika i smatra se da NO svojim delovanjem sprečava proces apoptoze. Sugino i saradnici [158] su izučavali odnos između koncentracija NO u FT i procesa apoptoze i pokazali su da u poređenju sa folikulima velike i srednje veličine, manji folikuli su imali veću učestalost apoptoze, iako se koncentracija NO u ovim folikulima nije razlikovala. Antebi i saradnici [159] su pokazali da su koncentracije NO povećane u humanoj FT i da su one pozitivno korelisale sa zapreminom folikula i koncentracijom estradiola [159]. Iz ovih zapažanja, sugerisano je da lokalna sinteza NO indukuje razvoj folikula, a ne apoptozu. Iz litearturnih podataka može se zaključiti da NO, kako iz ćelija jajnika, tako i vaskularni NO iz endotelnih ćelija, igra važnu ulogu u fiziologiji i biologiji jajnika s obzirom na njegovu ulogu u regulaciji folikulogeneze i ovulacije [160].

1.7.3. NO i spermatozoidi

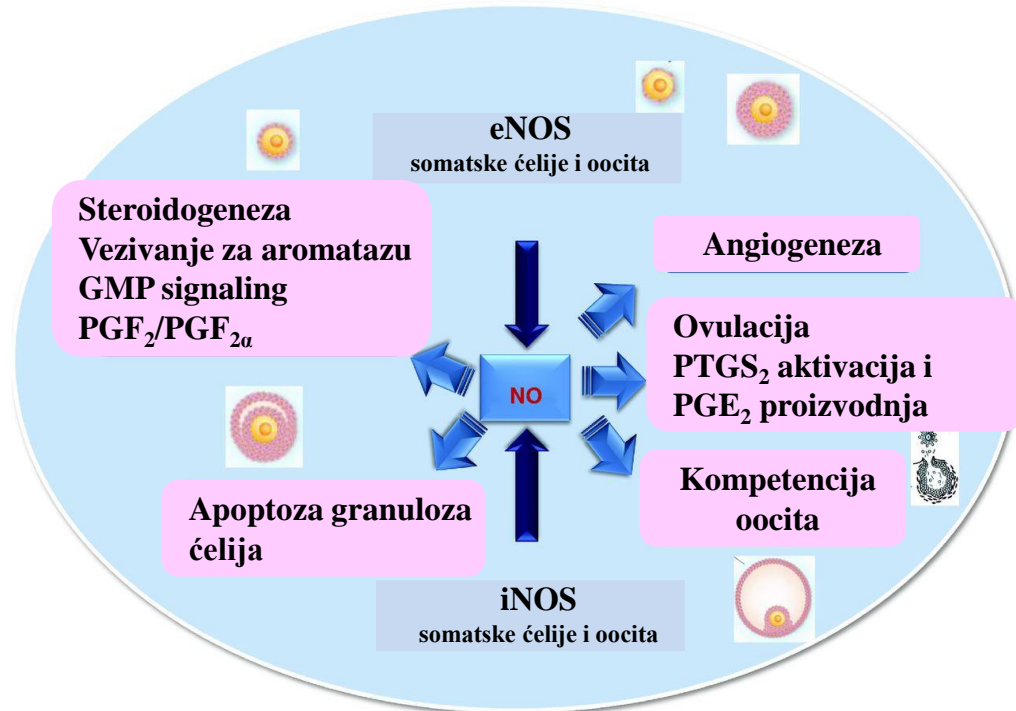
NO reguliše kapacitaciju spermatozoida, akrozomalnu reakciju, pokretljivost spermatozoida, a može imati i antiapoptotički efekat [161]. Niske koncentracije NO mogu fiziološki da utiču na oplodnju povećanjem sposobnosti vezivanja za zonu pellucidu (ZP), umesto indukcijom akrozomalne reakcije ili promocijom penetracije jajne ćelije [155, 161]. Dodavanje inhibitora NOS u medijum za kapacitaciju ljudskih spermatozoida može se smanjiti stopa oplodnje. Aktivacija NOS može zahtevati vezivanje citoplazmatske membrane [155, 161]. Niska koncentracija L-NAME (N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester) može povećati stopu oplodnje kriokonzerviranih oocita mišica, dok visoka koncentracija L-NAME (10⁻³ M) ili natrijum nitroprusida - SNP (10⁻⁶ M) inhibira normalne funkcije spermatozoida i oocita [155].

1.7.4. NO i steroidogeneza

Eksperimentalna primena inhibitora NOS ili donora NO je omogućila istraživačima da pokažu ulogu NO u steroidogenezi jajnika. Pokazano je da NO predstavlja ključnu ulogu u regulaciji ovog procesa (Slika 24) [162]. Pokazana je *in vitro* funkcija NO u inhibiciji sekrecije estradiola/progesterona u granulosa/lutealnim ćelijama žena [163, 164]. U humanim granulosa/lutealnim ćelijama kultivisanim *in vitro*, davanje donora NO S-nitroso-L-acetil penicilamina (SNAP) i S-nitroso-glutationa (GSNO) u zavisnosti od doze inhibira sekreciju i E2 i progesterona, dok primena selektivnih inhibitora NOS značajno utiče na povećanje sekrecije E2 [162, 163].

Pored toga, NO ispoljava svoj inhibitorski efekat na aktivnost aromataze, ključnog enzima u steroidogenom putu [17,18]. Dodatak donora NO, SNAP i etanamin 1,1-dietil-2-hidroksi-2-nitrozohidrazin (NOC12), kulturi humanih granulosa ćelija rezultiralo je inhibicijom aktivnosti aromataze na dozno-zavisan način [164]. Inhibicija aromataze je moguća preko dva različita mehanizma. Direktno inhibitorsko dejstvo na enzim posredovano je formiranjem nitrozotiolne grupe u cisteinskom ostatku enzima aromataze [18], dok indirektni mehanizam dovodi do smanjenja transkripcije aromataze. Pokazalo se da inhibitorski efekat NO na steroidogenezu može biti delimično posredovan sa dva važna prostaglandina (PG) koji se oslobađaju u granulosa ćelijama. Rezultati studija Basina i autora sugerišu učešće PGE2 u određivanju efekta SNAP-a na proizvodnju progesterona. Slično, inhibitorski efekat

izazvan SNAP-om na proizvodnju E2, može biti posredovan PGE2 u ćelijama iz velikih folikula i PGE2 u ćelijama iz malih folikula [165].



Slika 24. Proces u folikulu u kojima je uključen NO. Preuzeto iz [166]. eNOS - endotelna azot oksidna sintaza; iNOS - inducibilna azot oksidna sintaza; GMP - guanozin monofosfat; NO - azot monoksid; PGE₂ - prostaglandin E2; PGF₂ - prostaglandin F2; PTGS₂ - prostaglandin endoperoksid sintaza 2.

1.7.5. NO i mejotičko sazrevanje jajnih ćelija

U folikulu u razvoju, jajne ćelije sisara ostaju zaustavljene u profazi mejoze I, u fazi diplotena, gde se jajne ćelije razlikuju prisustvom velikog jedra, koje se nazivaju germinativni vezikuli (GV) [167]. Porast LH u sredni menstrualnog ciklusa promovise nastavak sazrevanja, sa razgradnjom germinativnih vezikula (*engl. germinal vesicle break down* - GVBD) koju karakterise nestanak jedra oocita [168]. Čini se da NO ima centralnu ulogu među molekulima uključenim u modulaciju mejotskog ćelijskog ciklusa u oocitima sisara. Smanjenje iNOS ekspresije u granuloza ćelijama i smanjen nivo NO u FT modelu pacova tokom LH/hCG-indukovanog nastavka mejoze nakon diplotenskog zaustavljanja, osnažili su ideju da NO put igra važnu ulogu u mejotskom sazrevanju jajnih ćelija [169, 170]. Studije sprovedene *in vitro* sugerisu da povećani nivoi iNOS/eNOS-indukovanog NO u granuloza ćelijama i jajnim ćelijama okruženim ćelijama kumulusa ponovo pokreću mejotičku progresiju jajnih ćelija [171, 172], dok su drugi autori pokazali da smanjenje nivoa NO izaziva nastavak diplotenskog zaustavljanja [173, 174]. Druge studije su takođe ukazale na dvostruku ulogu NO (stimulativna ili inhibitorna) u zavisnosti od njegove koncentracije [174-176]. Bu i saradnici su pokazali da niska koncentracija SNP (10µM) stimuliše mejotsko obnavljanje u prisustvu hipoksantina; naprotiv, visoka koncentracija SNP nije imala efekte na GVBD, ali je procenat jajnih ćelija koje su dostigle stadijum metafaze II bio manji [174]. Studija koju su objavili

Botigeli i saradnici ukazala je na ulogu SNAP-a u odlaganju nastavka mejoze putem NO/cGMP puta, povećanjem cGMP [177].

1.7.5.1. NO i rast i razvoj preantralnih folikula

Razvoj preantralnih folikula je proces kojim folikularne ćelije stiču sposobnost da reaguju na gonadotropine. Hormoni štitaste žlezde značajno utiču na reproduktivnu funkciju. T3 može da podstakne rast folikula i razvoj granuloze ćelija izazvan FSH *in vitro*. Studije su otkrile da sinergizam T3 i FSH može značajno povećati ekspresiju i translokaciju transportera glukoze u ćelijama i unos glukoze. Ove promene su bile praćene povećanom ekspresijom NOS3 i povećanom ukupnom količinom NO i aktivnošću NOS3 [178].

Sazrevanje oocita zahteva da se specifični geni precizno eksprimiraju u određeno vreme. Potvrđeno da NO značajno utiče na sazrevanje oocita, što je povezano sa kumulusnim ćelijama. Sazrevanje kompleksa kumulus-oocita kontroliše NO/NOS sistem [179]. U ranom razvoju folikula, eNOS je bio manje izražen u oocitima i granuloza ćelijama, dok je u kasnom razvoju folikula eNOS bio značajnije izražen u oocitima i granuloza ćelijama [180].

Određena koncentracija NO može podstaći sazrevanje oocita; NO dobijen iz iNOS-a može regulisati rupturu zametnih vezikula i izlučivanje prvog polarnog tela [181]. Nedostatak NO inhibira mejozu i sazrevanje oocita. Na primer, NOS inhibitor L-NAME ima značajan inhibitorski efekat na sazrevanje oocita, a ovaj inhibitorski efekat može se promeniti pomoću SNP [179]. To se može desiti zbog povećanih nivoa cGMP i smanjene aktivacije cAMP, što promovise sazrevanje oocita. Trenutno, specifičan mehanizam NO/NOS u sazrevanju oocita još uvek nije poznat, ni dovoljno jasan i zahteva dalje proučavanje.

1.7.6. NO i ovulacija

Ovulacija je složen proces koji uključuje gonadotropine, steroide, neke citokine, prostaglandine, leukotriene i histamine, kao i različite ćelije jajnika i zahteva nekoliko puteva prenosa informacija i specifičnu ekspresiju gena. Trenutno, podaci pokazuju da je NO povezan sa ovulacijom (48). Nivoi NO rastu sa razvojem folikula, a ovo povećanje je povezano sa koncentracijom E2. NO je povezan sa vaskularnim remodeliranjem [182]. Stoga se pretpostavlja da je NO važan posrednik vaskularnih promena i remodeliranja tkiva tokom ovulacije i luteinizacije. Proizvodnja NO je važna fiziološka karakteristika u normalnim ciklusima ovulacije. Nedostatak NO smanjuje rast i ovulaciju folikula kod miševa [183]. Prekomerni NO takođe inhibira ovulaciju, uključujući prekid domena tirozin kinaze i posledičnog smanjenja zapremine jajnika i stope ovulacije [183].

NO može regulisati ovulaciju i posredstvom hormona. NO može povećati oslobađanje LH pre ovulacije, promovišući tako pojavu preovulatornog LH pika, dok LH deluje na teka ćelije promovišući diferencijaciju interna teka ćelija i lučenje androgena, ali i stimulišući razvoj, sazrevanje i ovulaciju folikula [184]. NO reguliše reproduktivne hormone, uključujući E2, koji pokazuje dvosmerni regulatorni efekat na ovulaciju. Istovremeno, neke studije su pokazale da NO može inhibirati sintezu E2 u ćelijama granuloze kada se poveća do određene koncentracije. NO inhibira sintezu steroidnih hormona, podstiče ovulaciju i inhibira diferencijaciju preko ćelija granuloze u mirovanju [185].

1.7.6.1. NO i folikularna atrezija

Studije su pokazale da je cGMP povezan sa sazrevanjem oocita, kao i da se nivo intracelularnog cGMP može regulisati delovanjem NO. Aktivacija ili inhibicija NO/sGC/cGMP puta u potpuno razvijenim folikulima može dovesti do sazrevanja oocita. Tokom sazrevanja oocita, nivo cGMP i NO u folikularnom ćelijskom sloju raste, u oociti nivo cGMP opada dok nivo NO ostaje konstantan [186].

Mikrookruženje folikula jajnika je veoma značajno za normalan razvoj jajnih ćelija, stvaranje folikula i pravovremenu ovulaciju. Visoke koncentracije NO u FT mogu biti štetne, utičući na sazrevanje oocita i embriona i u velikoj meri smanjujući stopu uspeha VTO [187]. Međutim, nizak nivo NO₃/NO₂ u FT je koristan za oplodnju i stabilnu implantaciju embriona [188]. Istraživanja su pokazala da je NO u FT marker folikularne hipoksije i suboptimalnog razvoja embriona [189]. Pored toga, endometritis smanjuje nivo NO u FT, ometajući rast i sastav najvećih folikula [190].

Folikuli koji konačno ovuliraju u jajniku prethodno prolaze kroz selekciju folikula. Tokom selekcije, većina folikula prolazi kroz fiziološku atreziju. Konačno, samo nekoliko folikula se razvija u dominantni folikul i sazreva u ovulaciji. Normalna funkcija folikula može se odraziti na proliferaciju i apoptozu ćelija, ekspresiju regulatornih faktora i proizvodnju hormona koji suštinski utiču na reprodukciju i proizvodnju zdravog potomstva [191]. Da li folikuli u razvoju formiraju dominantne folikule ili atretične folikule zavisi od mnogih faktora. NO može uticati na folikularnu atreziju, i brojne studije su pokazale da je folikularna atrezija rezultat apoptoze folikularnih ćelija, tačnije apoptoza je mehanizam folikularne atrezije. Folikularna atrezija se reguliše kompleksnim signalima apoptoze i preživljavanja [192].

NO uglavnom utiče na folikularnu atreziju utičući na apoptozu u ćelijama granuloze. Pokazano je da iNOS može inhibirati apoptozu ćelija granuloze pacova putem autokrinih i parakrinih puteva i sprečiti ranu folikularnu atreziju. [193]. Pretpostavlja se da je degeneracija ćelija granuloze uzrok degeneracije folikula. Granulozne ćelije često prve degenerišu. Studije su pokazale da je Fas/FasL sistem ključni faktor koji posreduje apoptozu tokom folikularne atrezije jajnika. NO može regulisati ekspresiju gena povezanih sa apoptozom u ćelijama granuloze. U detekciji srodnih proteina, otkriveno je da NO inhibira apoptozu ćelija humane granuloze smanjenjem ekspresije gena koji promovisu apoptozu ćelija granuloze, kao što su Fas, P53 i Bak i promovišući ekspresiju gena koji inhibiraju apoptozu, npr. kao Bcl-2 i HSP70. NO može inhibirati apoptozu ćelija granuloze inhibiranjem cistein asparaginskog enzima u Fas/FasL-posredovanom putu apoptoze [194]. NO ima dvostruki efekat promovisanja ili inhibicije apoptoze. NO ne samo da reguliše apoptozu ćelija tokom razvoja folikula, već i preživljavanje i apoptozu ćelija folikularne granuloze nakon ovulacije, modulišući tako menstrualni ciklus.

Uloga NO u kontroli folikularne angiogeneze zavisi od uspostavljanja i kontinuiranog remodeliranja složenih vaskularnih sistema. Ovo omogućava folikulu da primi hranljive materije, kiseonik i hormonsku podršku koja mu je potrebna i podstiče oslobađanje steroida [166]. NO takođe može da reguliše folikularnu atreziju kroz interakciju sa hormonima. NO uglavnom reguliše lučenje E2 i progesterona; na primer, progesteron može promovisati folikularnu atreziju inhibiranjem učestalosti fluktuacija LH, međutim, mehanizam ostaje nejasan [160]. NO može uticati na aktivaciju oocita tokom oplodnje regulacijom Ca²⁺, pri čemu NO nastaje aktivacijom

eNOS u spermatozoidima i oocitima. Regulacija Ca^{2+} oocita posredovana NO utiče na lančanu regulaciju nekoliko supstanci. Povećana ekspresija NO prvo aktivira gvanilat ciklazu, a povećana cGMP aktivira cikličnu adenozin difosfat ribozu da podstakne oslobađanje Ca^{2+} u uslovima aktivacije inositol-trifosfata. Tokom oplodnje, NO se može dobiti iz spermatozoida, koji imaju obilje NOS. NO se može proizvesti tokom reakcije zamene sperme 30-45 sec. nakon oplodnje; kako se ekspresija NO povećava u spermatozoidima, povećava se i Ca^{2+} . Pošto je nNOS osetljiv na Ca^{2+} , kontinuirano povećanje Ca^{2+} podstiče proizvodnju mnogih molekula NO.

1.7.7. NO i embrionalni razvoj

Embrioni se brzo razvijaju i zahtevaju signalne glasnike da brzo prenose informacije. Jedan od signalnih molekula, NO, prenosi informacije putem difuzije, učestvuje u regulaciji deobe i diferencijacije embriona sisara i značajno utiče na proliferaciju i diferencijaciju ćelija. NO je neophodan u slučajevima kada se embrion pacova razvije od dve do četiri ćelije [195]. Kada su embrioni tretirani egzogenim NO, otkriveno je da 0,1M SNP inhibira transformaciju mišijeg embriona u blastociste, ali podstiče rast trofoblasta, što ukazuje da različite koncentracije SNP-a imaju različite efekte na embrione u različitim razvojnim fazama. Odgovarajuće povećanje NO značajno reguliše razvoj embriona, a potražnja za NO može biti visoka tokom razvoja embriona; previsok ili prenizak nivo NO može ometati normalan razvoj.

Štaviše, studije su pokazale da nivo NO značajno utiče na razvoj embriona tokom njihovog ranog razvoja [196]. Visok nivo NO menja položaj srca s desna na levo, izazivajući situs invertus [163]. Na embrione mogu uticati različiti faktori tokom razvoja, a obnavljanje oštećenja je složen proces koji zahteva ne samo proteine već i RNK. Studije su pokazale da NO suštinski utiče na oštećenje embriona, inflamaciju, formiranje krvnih sudova i važan je za ekspresiju gena povezanih sa lečenjem.

1.7.7.1. NO u kompetenciji oocita

Mehanizmi uključeni u regulaciju mejotskog ćelijskog ciklusa u oocitima još uvek nisu u potpunosti shvaćeni, ali postoje značajni dokazi koji podržavaju uključivanje NO/NOS sistema u kontrolu mejotskog sazrevanja kompleksa kumulus-oocita. Sada se smatra da NO predstavlja vitalnu komponentu mikrokruženja oocita jer igra fiziološku ulogu tokom sazrevanja jajnih ćelija, oplodnje i početka razvoja embriona [197],[198]. Dalja potvrda uloge NO u sazrevanju oocita dolazi iz studija na eNOS nokaut miševima, koje pokazuju oštećenje ovulacije i veći procenat atipičnih oocita [199]. Nedavno su Goud i saradnici potvrdili svoja prethodna zapažanja o ulozi NO u odlaganju starenja oocita miša [200]. NO može imati dvostruku funkciju u sazrevanju oocita, kao što je već naglašeno u pogledu njegove modulatorne uloge na funkciju folikula [201]. Smanjenje NO nakon preovulatornog porasta LH može biti ključni faktor za obnavljanje mejoze: kao posledica aktivacije MAPK, poremećaj komunikacije međusobne veze zaustavio bi prenos inhibitornih supstanci od granulose ćelija do oocita, omogućavajući mu da se nastavi mejoza [202]. Što se tiče signalnih puteva NO, cGMP je dokumentovan kao ključni faktor u održavanju mejotskog zastoja u oocitima, ali uloga NO u cGMP/cAMP putu tokom obnavljanja mejoze nije u potpunosti poznata i još uvek je stvar proučavanja. Visoki

nivoi cGMP-a proizvedeni od NO dobijenog iz iNOS-a mogu održati mejotsko zaustavljanje preovulatornih oocita preko dva različita puta. Jedan bi uključivao inhibiciju cAMP fosfodiesteraze oocita za održavanje nivoa cAMP, a drugi aktivaciju cGMP zavisne protein kinaze [166].

1.7.8. NO i VTO

Relativno je mali broj podataka o ulozi NO tokom procesa razvoja embriona u kontekstu VTO. Podaci ukazuju da je uloga NO u preimplantacionom razvoju embriona još nije jasna i da različiti nivoi NO mogu imati različite regulatorne efekte. Dodatak medijumu sperme i oocita, NOS inhibitor L-NAME, u visokim koncentracijama (5, 10 mM) je doveo do inhibicije razvoja embriona miša, dok je dodavanje niskih koncentracija NO donora L-arginina stimulisalo stopu oplodnje i embrionalni razvoj [203]. Visoke koncentracije L-arginina takođe inhibiraju procese oplodnje i razvoja embriona, što sugerise da je odgovarajući nivo NO ključan za pravilno odvijanje ovih procesa [203, 204]. Takođe, Barroso i saradnici su pokazali da više koncentracije NO inhibiraju razvoj embriona *in vitro* i implantaciju *in vivo* kod miševa [205]. Štaviše, čini se da je cGMP molekularni efektor NO u preimplantacionom razvoju embriona [205, 206]. Upotreba NO inhibitora NG-nitro-L-arginina (L-NA) kod miševa *in vitro* blokirao je razvoj dvoćelijskih embriona, ali ovaj inhibitorski efekat nestaje kada se koncentracija L-NA smanji na 125 M. Primena SNP donora NO u svim analiziranim koncentracijama (u rasponu od 0,2nM do 500M) inhibira normalan razvoj embriona, ali kombinacija L-NA i SNP poništava ove inhibitorne efekte. Činjenica da NO reguliše razvoj embriona putem cGMP puta je demonstriran dodavanjem u medijum i 8-Br-cGMP (derivat cGMP) i 500M L-NA. Embrioni su pokazali značajno ubrzanje normalnog razvoja u poređenju sa onima uzgajanim samo u 500M L-NA. Inhibitorski efekat L-NA je obrnut 8-Br-cGMP, što ukazuje na ulogu NO/cGMP puta u razvoju preimplantacionog embriona [205]. Humane studije u ovom kontekstu pokazale su kontradiktorne rezultate. Sa jedne strane, Battaglia i saradnici [207, 208] i Lipari i saradnici pokazali su povezanost između metabolita NO koji se oslobađaju u medijumu kulture embriona sa progresijom u formiranju blastocista, kao i stopama trudnoće. Preciznije, intermedijerni NO metaboliti u medijumima za osemenjavanje bili su 2,6 puta veći kod embriona koji su napredovali do stadijuma blastociste u poređenju sa onima koji nisu [207]. Pored toga, primena donora NO, poput nitroglicerina (NTG), pacijentima na VTO sa istorijom neuspešnih implantacija nije bila efikasnija u pogledu poboljšanja stope implantacije ili trudnoća u poređenju sa placebo agensom [209]. Takođe, istraživana je moguća povezanost između koncentracije NO u serumu/FT i kvaliteta oocita/embriona. Objavljenih podataka u tom pogledu je malo, a pored toga su i konfliktni. Lee i saradnici su ukazali na nedostatak korelacije između varijabilnih koncentracija NO u FT i TNF α (*engl. Tumor necrosis factor alpha*) sa kvalitetom oocita i VTO ishodom [210]. Nekoliko godina kasnije pokazalo se da su viši nivoi nitrita i nitrata pronađeni u tim folikulima rezultirali embrionima lošeg kvaliteta [211]. Ovi podaci su u skladu sa onima koje su objavili Vignini i saradnici [212], gde je srednja koncentracija NO u FT bila veća kod pacijenata sa embrionima lošeg kvaliteta u odnosu na one sa visokokvalitetnim embrionima [212]. Ispitivanjem ekspresije iNOS-a u kumulusnim ćelijama otkriveno je da je koncentracija iNOS veća u kumulusnim ćelijama koji pripadaju neoplođenim jajnim

ćelijama, u poređenju sa normalno oplodjenim jajnim ćelijama [213]. Ovi podaci ukazuju na ulogu iNOS-a kao biomarkera oocita, ali je potrebno dalje istraživanje kako bi se ovaj biomarker smatrao korisnim alatom za selekciju oocita. Štaviše, dodatni podaci su neophodni da bi se razjasnila moguća korelacija između NO i razvoja embriona. Imajući u vidu mali broj studija koje su se odnosile na ulogu NO u procesu VTO, istraživanja u ovom pravcu su od neophodnog značaja, kako bi se jasno definisala uloga NO u VTO.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Analiza koncentracije serumskog NO pre KOS, kao i u serumu i FT posle KOS indukovane dugim i kratkim protokolom u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.
2. Analiza korelacije u koncentraciji serumskog NO pre KOS, kao i u serumu i FT posle KOS indukovane dugim i kratkim protokolom u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.
3. Analiza korelacije između koncentracija serumskog NO pre KOS, serumskog NO nakon KOS i koncentracije NO u FT sa praćenim karakteristikama aspiriranih jajnih ćelija: broj jajnih ćelija i broj kvalitetnih jajnih ćelija u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.
4. Analiza korelacije između koncentracija serumskog NO pre KOS, serumskog NO nakon KOS i koncentracije NO u FT sa praćenim karakteristikama embriona: broj dobijenih embriona, broj kvalitetnih embriona i broj vraćenih embriona u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.
5. Izučavanje uticaja koncentracija serumskog NO pre KOS, serumskog NO nakon KOS i koncentracije NO u FT na ishode IVF procedure (biohemijska, klinička trudnoća, klinička trudnoća nakon 12. nedelje gestacije, kao i porođaj) u ispitivanoj populaciji i unutargrupno.

3. MATERIJAL I METODE

Ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su iz krioprezerviranih uzoraka seruma i folikularne tečnosti prikupljenih tokom 2016. godine na Odeljenju artificijelne reproduktivnu tehnologije (ART) sa dnevnom bolnicom Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front” u Beogradu. Ginekološko-akušerska Klinika „Narodni front” je ustanova tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite i jedna od šest državnih ustanova u kojima se obavlja proces VTO o trošku Republičkog fonda zdravstvenog osiguranja (RFZO). Studija je obuhvatila 94 para podvrgnutih procesu VTO, finansirane od strane Ministarstva zdravlja Republike Srbije. Studijski inkluzioni kriterijum za regrutovanje parova koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje ispitanika za proces VTO 2016. godine predstavljenih na sajtu RFZO (www.rfzo.rs/download/Vantelesna.pdf).

Etički odbor Klinike za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front” je odobrio izvođenje studije (broj odluke 24/42-1), a ispitanici su potpisom verifikovali dobrovoljni pristanak za učešće u studiji nakon što su im prethodno usmeno i pisano predloženi protokol i ciljevi studije.

Svi ispitanici, koji su u opisanom periodu ispunjavali uslove Ministarstva zdravlja Republike Srbije, su nakon usmenog informisanja o protokolu studije, dobili istovetne informacije i u pisanoj formi, kako bi im se omogućilo da razmisle i donesu odluku o tome da li žele da učestvuju u studiji. Ispitanici koji su odlučili da učestvuju u studiji su svojim potpisom na informišućem pristanku potvrditi svoje dobrovoljno učestvovanje u istraživanju.

Planiran broj ispitivanih parova je dobijen na osnovu izračunavanja snage studije (80%) i izračunate veličine uzorka od 80 pacijentkinja. Uzimajući u obzir procenjenju mogućnost nedostajućih podataka od 10% (8 pacijenata) odlučeno je da veličina uzorka iznosi najmanje 88 pacijentkinja.

Etički odbor Medicinskog fakulteta u Beogradu je odobrio izvođenje ove doktorske disertacije i potvrdio da je ista u skladu sa svim principima Helsinške deklaracije.

3.1. Protokol

Shodno protokolu KOS, ispitanice su podeljene u dve grupe: stimulisane po dugom (n=35) i kratkom (n=59) protokolu. Shodno protokolu KOS, kod ispitanica su analizirani dužina trajanje stimulacije, trigger stimulacije, kao i ukupna doza gonadotropina. Pre započinjanja, kao i po završetku KOS, a pri proceduri aspiracije jajnih ćelija, uzorkovani su biološki materijali ispitanica za određivanje odgovarajućih laboratorijskih parametara. Prema protokolu, pri proceduri aspiracije jajnih ćelija, praćen je ukupan broj, kao i broj kvalitetnih jajnih ćelija, ukupan broj, broj kvalitetnih, kao i broj vraćenih embriona i dan embriotransfera. Kao ishodi, praćena je pojava biohemijske, kliničke trudnoće, kliničke trudnoće nakon 12. nedelje gestacije, praćenje kliničke trudnoće do termina porođaja i porodaj.

Opservaciona studija preseka je određivala uticaj KOS (uopšte, ali i različitih protokola KOS) na koncentracije NO u organizmu žena podvrgnutih VTO. Ovo bi se postiglo određivanjem koncentracije NO u serumu (pre i posle KOS) i u FT (posle KOS), njihovim međusobnim poređenjem i ispitivanjem njihovih eventualnih korelacija u celokupnoj ispitivanoj populaciji žena podvrgnutih VTO, ali i unutar dve podgrupe pacijenata: prve u kojoj bi bile žene stimulisane dugim (GnRH α) protokolom i druge podgrupe sa pacijentkinjama stimulisanim kratkim (GnRH α)

protokolom. Pored uticaja KOS na nivoe NO, studija je ispitala eventualni uticaj koncentracija NO u serumu i FT na ishode KOS i ishode VTO.

Kod svih ispitanica su analizirani demografski (godine života, obrazovni i bračni status), antropometrijski (telesna težina i visina, indeks telesne mase), epidemiološki podaci (navike pušenja i konzumiranja alkoholnih pića, kao i upotreba hronične terapije), kao i menstrualno-fertilizacioni parametri iz ginekološke anamneze (podaci o menarhi, lična anamneza o operativnim zahvatima ispitanica i njihovim hroničnim bolestima, dužina, trajanje i intenzitet menstrualnog ciklusa, trajanje, tip i uzroci infertiliteta, broj pokušaja VTO). Kod ispitanika-partnera su, pored demografskih (godine života, obrazovni status), antropometrijskih (telesna težina i visina, indeks telesne mase), epidemioloških (navike pušenja, konzumiranja alkoholnih pića, kao i zloupotreba nedozvoljenih supstanci), analizirani podaci iz lične anamneze o bolestima i učinjenim hirurškim intervencijama, ali i analizirani sledeći parametri uzorkovane semene tečnosti: volumen semene tečnosti, koncentracija spermatozoida, progresivni motilitet spermatozoida, udeo normalnih formi spermatozoida, pH, viskoznost i aglutinacija semene tečnosti, kao i završni komentar-analiza spermograma po kvalitetu i kategorijama. Laboratorijska analiza semene tečnosti i ispitivanje spermograma učinjeni su na Klinici za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front”, od strane embriologa.

3.2. Uzorkovanje biološkog materijala i primenjene laboratorijske metode

Prikupljanje biološkog materijala je podrazumevalo uzimanje uzorka krvi i FT ispitanica i uzorkovanje semene tečnosti ispitanika. Uzorkovanje krvi ispitanica je sprovedeno u dva navrata. Prvi put je krv uzorkovana pre započinjanja KOS. Drugo uzorkovanje krvi ispitanica je sprovedeno na dan aspiracije jajnih ćelija.

Izdvajanje seruma iz krvi. Uzorkovanje krvi se vrši venepunkcijom iz kubitanih vena. Serum se izdvaja centrifugiranjem krvi tokom 15 minuta na 3000 rpm uzete u epruvetu bez antikoagulansa, nakon stajanja na sobnoj temperaturi tokom 20 do 30 minuta do finalizacije procesa koagulacije.

Uzorkovanje FT ispitanica je obavljeno tokom same procedure aspiracije jajnih ćelija, a nakon izdvajanja jajnih ćelija iz iste. Uzorkovanje semene tečnosti ispitanika-partnera je sprovedeno na dan aspiracije jajnih ćelija ispitanice-partnerke, kada se semena tečnost inače uzorkuje za proces VTO.

Prikupljeni biološki materijal (FT i krv ispitanica i semena tečnost ispitanika-partnera) je ispitivan u Laboratoriji za embriologiju odeljenja ART Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front”, Laboratoriji odeljenja za biohemiju Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front” i Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” Univerziteta u Beogradu, Instituta od nacionalnog značaja Republike Srbije.

Od laboratorijskih parametara, određivani su nivoi serumskog E2 pre aspiracije jajnih ćelija, kao i NO u FT i serumu ispitanica pre i nakon procesa KOS. Metoda obrađivanja NO podrazumeva određivanje koncentracije nitrita i nitrata, kao produkata NO u serumu i FT. Merenje je vršeno korišćenjem NO₃-/NO₂- kompleta (Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit, R&D Systems, USA) prema uputstvu proizvođača. Određivanje koncentracije rađeno je u dva koraka: reakcijom nitrat reduktaze i Griess-ovom reakcijom. Prvi korak obuhvata enzimsku konverziju nitrata u nitrit korišćenjem NADH zavisne nitrat reduktaze, dok u drugom

koraku dodatkom Griess-ovog reagensa dobijeni nitrit gradi obojeno azo jedinjenje, purpurne boje sa maximumom apsorpcije na 540 nm. Kolorimetrijskom metodom određivana je koncentracija nitrita merenjem apsorbanca nastalog azo jedinjenja. Merenje nivoa E2 određivan je hemiluminescentnim enzimskim imunoesejom, Elecsys immunoanalyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Intra-esej i inter-esej koeficijenti varijacije bili su 0,5% i 0,1%. Koncentracije E2 izražene su u pmol/l.

3.3. Dug i kratak protokol KOS

U *dugom protokolu* (od 1980. godine) se koriste agonisti gonadotropin-rlizing hormona (ovde Diferelin), koji u početku stimulišu sekreciju gonadotropina („flare-up” efekat), ali ubrzo, po zasićenju receptora ispoljavaju suprotno dejstvo, ispoljavajući isti efekat kao i antagonisti. Primena diferelina počinje 21. dana prethodnog ciklusa, koji praktično dovodi do potpune supresije hipofize pre započinjanja stimulacije, te samim tim izoluje jajnike i sprečava prevremeni skok LH, koji je inače uslovljen porastom E2 i progesterona u prirodnom ciklusu. Nakon približno sedam dana od primene diferelina, registruje se menstrualno krvarenje. Potom se određuje nivo E2, LH i progesterona, koji, ako su u predviđenom opsegu (E2 <200pmol/L, LH <5mIU/ml, progesteron <2nmol/L), predstavljaju uslov za započinjanje stimulacije gonadotropinima, jer ove vrednosti se smatraju dokazom uspostavljene kontrole nad gonadotropnim ćelijama hipofize. Ukoliko se ne uspostavi kontrola nad gonadotropnim ćelijama hipofize, nastaviće se primena GnRHa do postizanja traženih nivoa E2, Pg i LH. Inicijalne doze primenjenih gonadotropina su u opsegu 150-300 IU, a doza se određuje prema individualnim karakteristikama ispitanica (prethodni odgovor na KOS, godine života i ovarijalna rezerva). Na kasnije doze gonadotropina uticu rast folikula i koncentracije serumskog E2. Od gonadotropina su korišćeni urinarni humani menopauzalni gonadotropini (Menotropin, Menopur®, FerringGmbH, Kil, Nemačka) i/ili rekombinantni FSH-rFSH (Folotropin alfa, Gonal-F®, Merck Serono, Modunjo, Italija; Folotropin beta, Puregon®, Merck Sharp & Dohme, Beograd, Srbija).

U *kratkom protokolu* (od 1995. godine) primenjuju se antagonisti gonadotropin-rlizing hormona, koji odmah blokiraju endogeni LH, a po prestanku primene odmah oslobađaju receptore. Ovaj protokol KOS se danas češće koristi prevashodno zbog značajnog smanjenja mogućnosti ovarijalne hiperstimulacije, kao jedne od najozbiljnijih komplikacija VTO. Stimulacija ovulacije kod kratkog protokola se započinje drugog ili trećeg dana menstrualnog ciklusa primenom gonadotropina, ali doza se određuje shodno individualnim karakteristikama pacijentkinje (godine života i ovarijalna rezerva), a u opsegu su od 75-375IU. Koriste se isti gonadotropini kao i u dugom protokolu KOS (menotropin i rFSH). U cilju prevencije prevremenog skoka LH dodaju se antagonisti gonadotropina kao što je cetrotreliks acetat (Cetrotide®, Merck Serono, Frankfurt, Nemačka).

Trigger injekcija. U cilju završne maturacije jajnih ćelija pacijentkinje dobijaju humani horionski gonadotropin (hCG). Davanje hCG (tzv. stop ili trigger injekcije) vrši se u momentu kada folikul/i dostignu veličinu >17mm, izmerenu transvaginalnim ultrazvukom.

Punkcija folikula i aspiracija jajnih ćelija se sprovodi 34-36 sati nakon davanja trigger injekcije. Ova hirurška procedura se sprovodi transvaginalnim putem

pomoću odgovarjuće igle i aspiracione pumpe pod kontrolom ultrazvuka. Folikularna tečnost sa jajnom ćelijom se aspirira iz svakog dostupnog folikula. Uzorci se odlažu u sterilne epruvete i centrifugiraju tokom 10 minuta na 800G u cilju uklanjanja ćelijskih komponenti. Potom se uzimaju čisti supernatanti, koji se alikvotiraju i zamrznu na -18°C do sprovođenja daljih analiza.

Ocena broja kvalitetnih jajnih ćelija. Nakon aspiracije se analizira ukupan broj dobijenih jajnih ćelija i utvrđuje broj dobijenih kvalitetnih jajnih ćelija. Kvalitetne jajne ćelije su one u metafazi II i one mogu biti fertilisane.

3.4. Statistika

Od metoda deskriptivne statistike korišćeni su relativni brojevi, mere centralne tendencije i mere varijabiliteta. Od mera centralne tendencije korišćene su aritmetička sredina i medijana, a od mera varijabiliteta standardna devijacija, interval i koeficijent varijacije.

Od metoda analitičke statistike korišćeni su testovi za procenu značajnosti povezanosti i razlike. Od testova za procenu značajnosti povezanosti korišten je Pearsonov i Spearmanov test, dok je za procenu značajnosti razlike korišćen χ^2 test u slučajevima kategorijskih podataka, Wilcoxonov test u slučajevima intervalnih podataka vezanog uzorka koji ne slede normalnu distribuciju, t -test za dva nezavisna uzorka u slučajevima intervalnih podataka koji slede normalnu distribuciju, odnosno Mann-Whitney test u slučajevima intervalnih podataka, koji ne slede normalnu distribuciju. Primenom Kaplan-Meierove krivulje i log-rank testa analizirana je dužina trajanja KOS primenom dugog i kratkog protokola.

Nivo statističke značajnosti je 0.05. Dobijeni podaci i rezultati su prikazivani tabelarno i grafički, shodno karakteristikama varijabli, a analizirani su upotrebom statističkog paketa SPSS for Windows 22.0.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati studije vezani za ukupnu populaciju ispitanica

Studija preseka je obuhvatila 94 infertilna para. Prosečna starost ispitanica je 36 (24-40) godina. Prosečna telesna težina je 64.5 ± 8.5 (48-87) kg, dok je prosečna visina 167 ± 6 (154-184) cm. Prosečan ITM od 23.1 ± 2.8 (17.1-29.8) kg/m^2 klasifikuje ispitanice u kategoriju normalno uhranjenih osoba. U pogledu dostignutog obrazovnog statusa, osnovnu i srednju školu, kao i fakultet je završilo 6 (6%), 48 (51%) i 40 (43%) ispitanica. U bračnom odnosu su 72 (77%), dok su u vanbračnoj zajednici 22 (23%) ispitanice. Od ukupnog broja ispitanica, 65 (69%) su nepušači, a preostalih 29 (31%) konzumira duvan. U pogledu broja ispušenih cigareta, <5, 5-10, 10-20 i >20 cigareta dnevno konzumira 7 (7%), 8 (9%), 13 (14) i 1 (1%) ispitanica. Povremeno konzumiranje alkoholnih pića navodi 14 (15%) ispitanica, od toga 13 navodi malu količinu, dok 1 ispitanica navodi da značajno konzumira alkoholna pića, dok preostalih 80 (85%) ispitanica ne konzumira alkoholna pića.

Prvi menstrualni ciklus je registrovan u 13 (9-18) godini. Prosečno trajanje menstrualnog ciklusa je 28 (22-50) dana, a trajanje krvarenja 5 (3-7) dana. Kod 93 (99%) ispitanice se registruju regularni menstrualni ciklusi, koji po intenzitetu mogu biti minimalni- kod 7 (7%), umereni- kod 78 (83%) i izraženi- kod 9 (10%) ispitanica.

Prosečno trajanje infertiliteta je 5 (1-18) godina. Primarni infertilitet se registruje kod 73 (78%) ispitanica, a sekundarni kod 21 (22%). Analizom uzroka infertiliteta, definisani su uzroci od samog partnera- 41 (44%), ali i uzroci povezani sa oboljenjima jajovoda- 15 (16%), endometriozom- 9 (10%), policističnim jajnicima- 11 (12%), oboljenjima materice i grlića- 1 (1%), udruženo policističnim jajnicima i endometriozom- 1 (1%), kao i pojavom poor respondera- 3 (3%) i idiopatski- kod 13 (14%) ispitanica. Tabelom 1 su prikazane postojeće hronične bolesti ispitanica.

Tabela 1. Postojeće hronične bolesti ispitanica

Bolest	N	%
Primarna hipotiroza	7	8
Insulinska rezistencija	5	5
Hipertenzija	1	1
Trombofilija	5	5
Aritmija	1	1
Hronični ulcerozni colitis	1	1
Mikroadenom hipofize	1	1
Odsustvo hroničnih bolesti	73	78

U Tabeli 2 je prikazana istorija učinjenih operativnih procedura kod ispitanica pre započinjanja IVF.

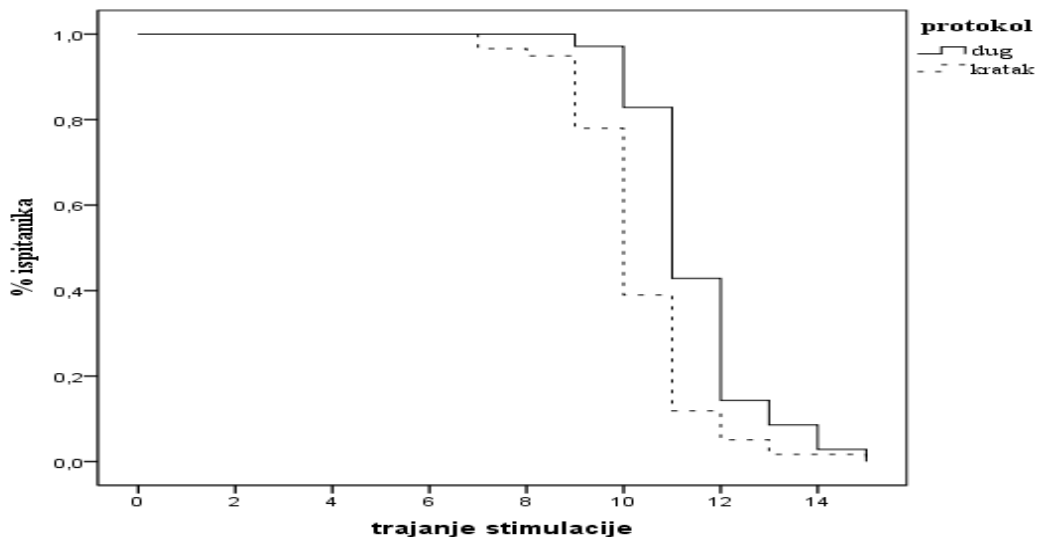
Tabela 2. Prikaz učinjenih operativnih procedura kod studijskih ispitanica

Operativna procedura	N	%
Bez operativne procedure	44	44
Dg. laparoskopija	14	15
Lap. punkcija jajnika	1	1
Lap. Adhezioliza	2	2
Lap. salpingostomija	3	3
Lap. elektrokauterizacija	2	2
Neginekološka operacija	5	5
Lap. cistostomija	2	2
Miomektomija + cistektomija	1	1
Lap. salpingektomija	4	4
Operacija FA dojke	2	2
Lap. cistektomija	4	4
Jednostrana salpingektomija	1	1
Jednostrana adneksektomija	3	3
Salpingostomija	3	3
Obostrana salpingektomija	1	1
Lap. okluzija tuba/e	1	1
Jednostrana cistektomija	3	3
Lap. miomektomija	1	1

Dg. – dijagnostička; Lap. – laparoscopska; FA- fibroadenom

Prosečno trajanje KOS je 10.5 (7-15) dana. Gledano po protokolima KOS, stimulacija jajnika kod dugog protokola je iznosila 11.5, a kod kratkog 10 dana i statistički se razlikovala (log-rank $\chi^2= 14.474$; $p<0.01$) (Grafik 1). Ukupna doza gonadotropina koja je primenjena u sklopu VTO je 2625 (1025-9600) IU.

Grafik 1. Kaplan-Meierova krivulja trajanja KOS po protokolima.



Prosečan broj aspiriranih jajnih ćelija je 8 ± 4 (1-19), dok je broj kvalitetnih jajnih ćelija 6 ± 4 (0-17). Prosečan broj dobijenih i kvalitetnih embriona je 5 ± 3 (0-12) odnosno 3 (0-10), dok je broj vraćenih embriona 2 ± 1 (0-5).

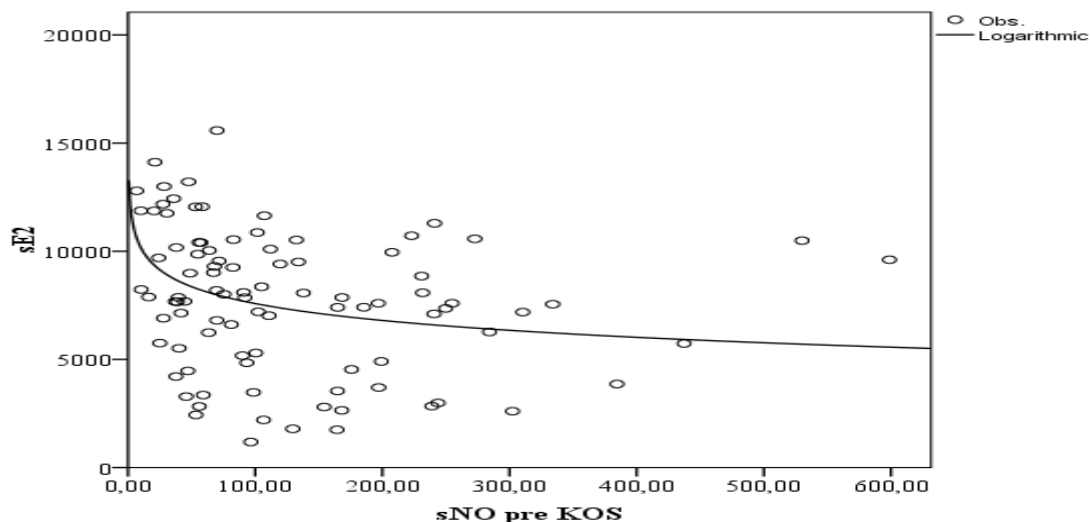
Prosečan nivo E2 na dan triger injekcije je 7726 ± 3232 (1181-15582) pmol/L, dok je nivo serumskog NO 126.80 ± 112.16 (6.76-598.95) μM . Nivo serumskog NO nakon KOS je 130.55 ± 91.16 (69.67-472.91) μM , dok je u FT 305.57 ± 101.09 (69.67-472.91) μM .

Od ukupnog broja, 68 (72%) ispitanica nije imalo nijedan pokušaj VTO, dok su jedan, dva ili tri pokušaja imale 22 (23%), tri (3%) i jedna (1%) ispitanica. Biohemijska trudnoća je registrovana kod 46 (49%) ispitanica, koja je nadalje kod 38 (40%) ispitanica potvrđena i praćena, od kojih su 4 (4%) bile ektopične. U daljem toku je 30 (32%) ispitanica, kojima je nastavljeno praćenje trudnoće, donelo je na svet novorođenče.

4.1.1. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT u ispitivanoj populaciji

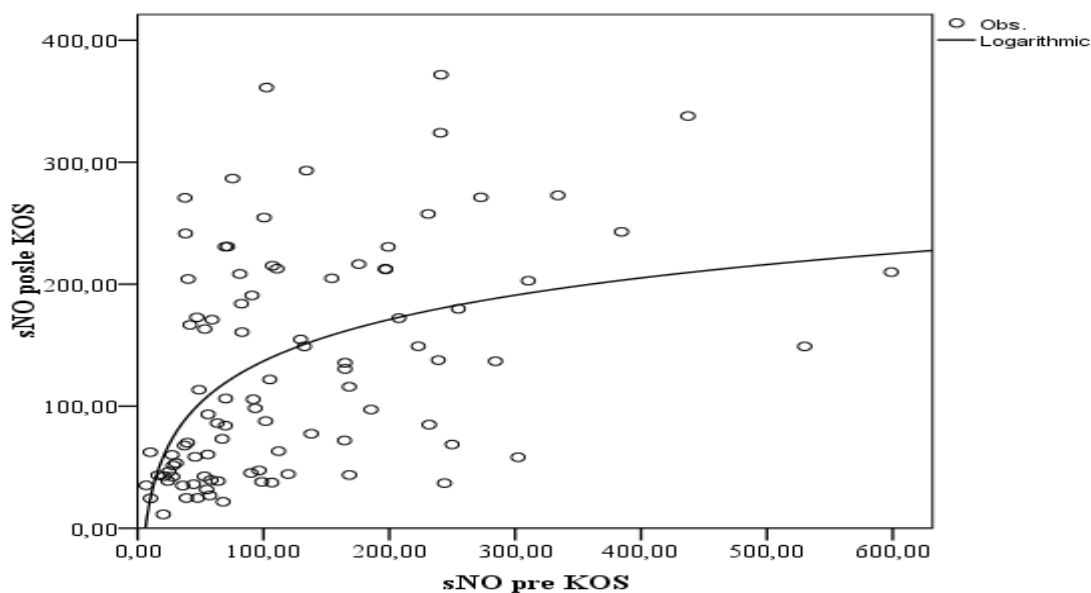
Analiza korelacije između serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog E2 prikazani su na Grafiku 2. Regstruje se statistički značajna korelacija serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog E2 ($\rho = -0.297$; $p < 0.01$).

Grafik 2. Korelacija sNO pre KOS i sE2 u ispitivanoj populaciji



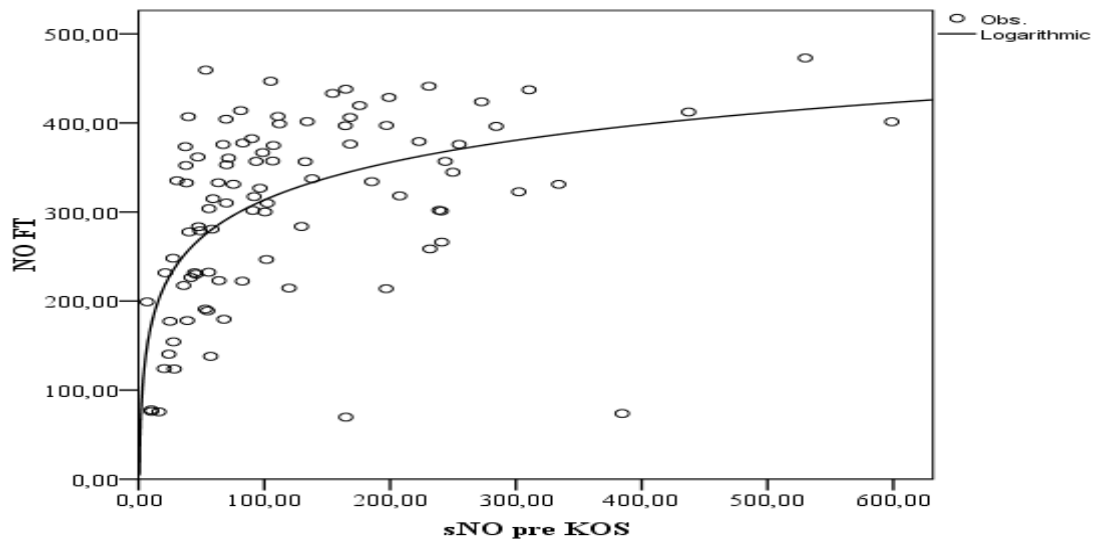
Analiza korelacije između serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog NO posle KOS prikazani su na Grafiku 3. Regstruje se statistički značajna korelacija serumskog NO pre KOS sa nivoom serumskog NO posle KOS ($\rho=+0.513$; $p<0.01$)

Grafik 3. Korelacija sNO pre KOS i sNO posle KOS u ispitivanoj populaciji



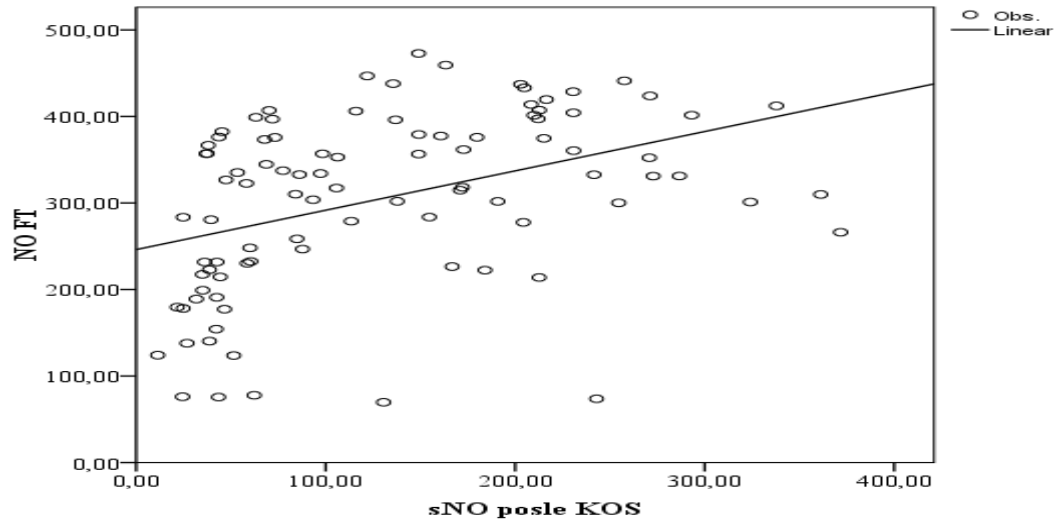
Takođe, uočena je korelacija između nivoa serumskog NO kao i NO u FT ($\rho=+0.513$; $p<0.01$) (Grafik 4).

Grafik 4. Korelacija sNO pre KOS i NO FT u ispitivanoj populaciji



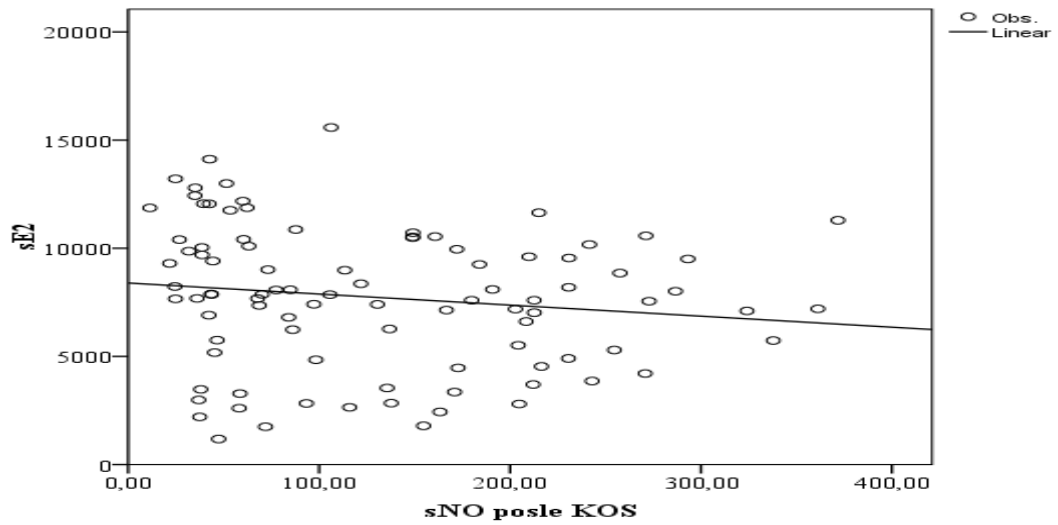
Beleži se značajna korelacija nivoa serumskog NO posle KOS sa nivoom NO u FT ($r=+0.410$; $p<0.01$) (Grafik 5)

Grafik 5. Korelacija sNO posle KOS i NO FT u ispitivanoj populaciji



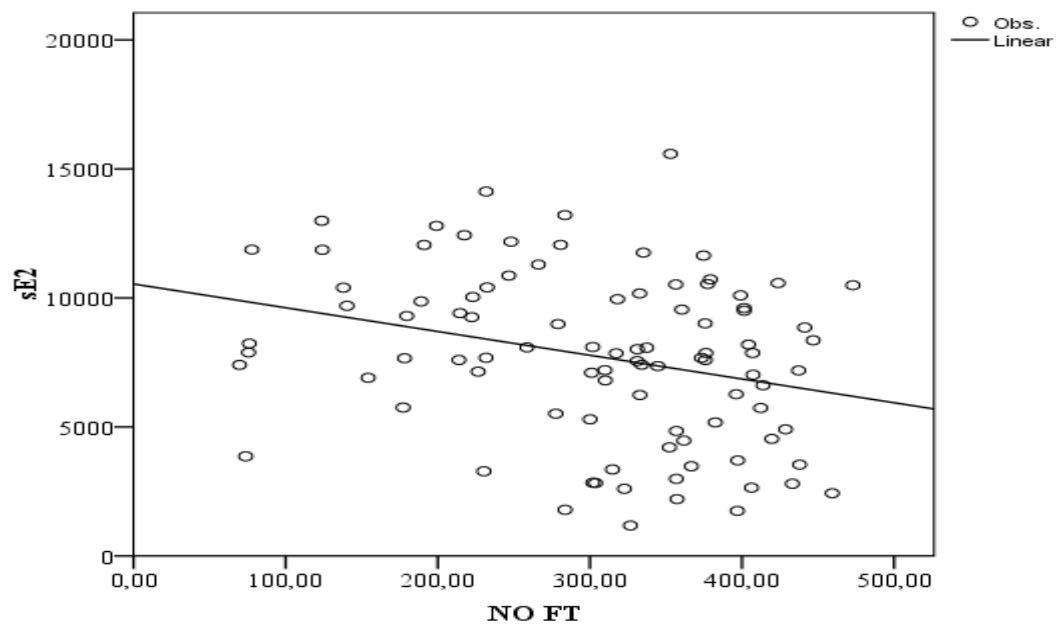
Takođe, uočena je značajna korelacija nivoa serumskog NO posle KOS sa nivoom i serumskog E2 ($r=-0.288$; $p<0.01$) (Grafik 6).

Grafik 6. Korelacija sNO posle KOS i sE2 u ispitivanoj populaciji



Takođe, nivoi NO u FT značajno korelišu sa nivoom serumskog E2 ($r=-0.258$; $p<0.01$) (Grafik 7).

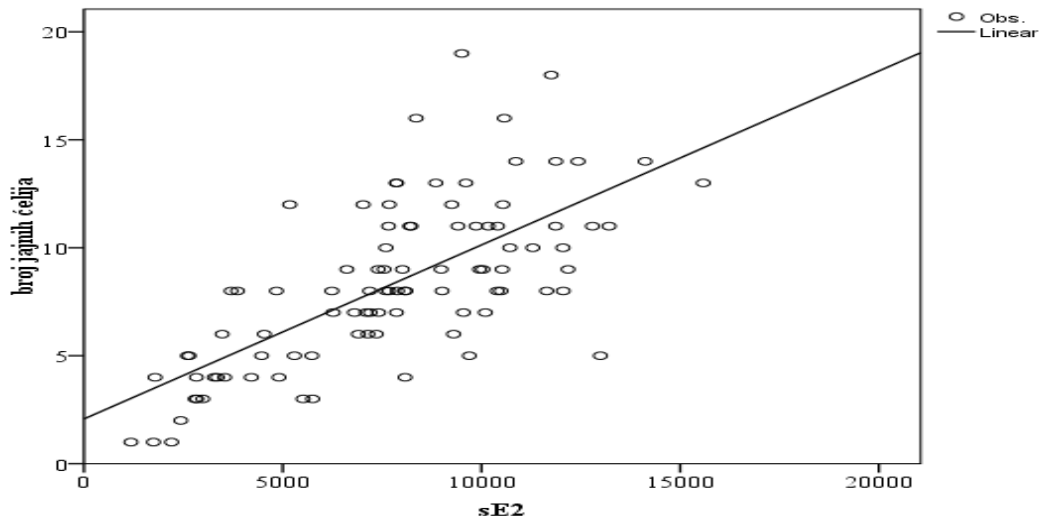
Grafik 7. Korelacija NO FT i sE2 u ispitivanoj populaciji



4.1.2. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT i karakteristika jajnih ćelija u ispitivanoj populaciji

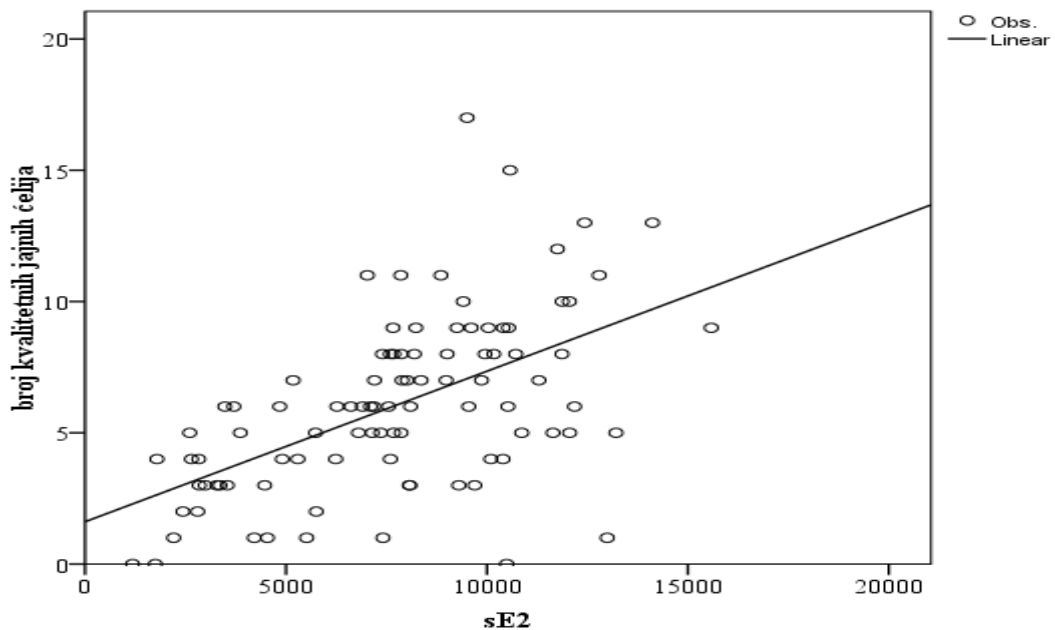
Rezultati efekata koncentracije serumskog E2 na broj jajnih ćelija prikazani su na Grafiku 8. Rezultati pokazuju da nivo serumskog E2 značajno utiče na broj jajnih ćelija ($r=+0.687$; $p<0.01$).

Grafik 8. Korelacija sE2 i broja jajnih ćelija u ispitivanoj populaciji



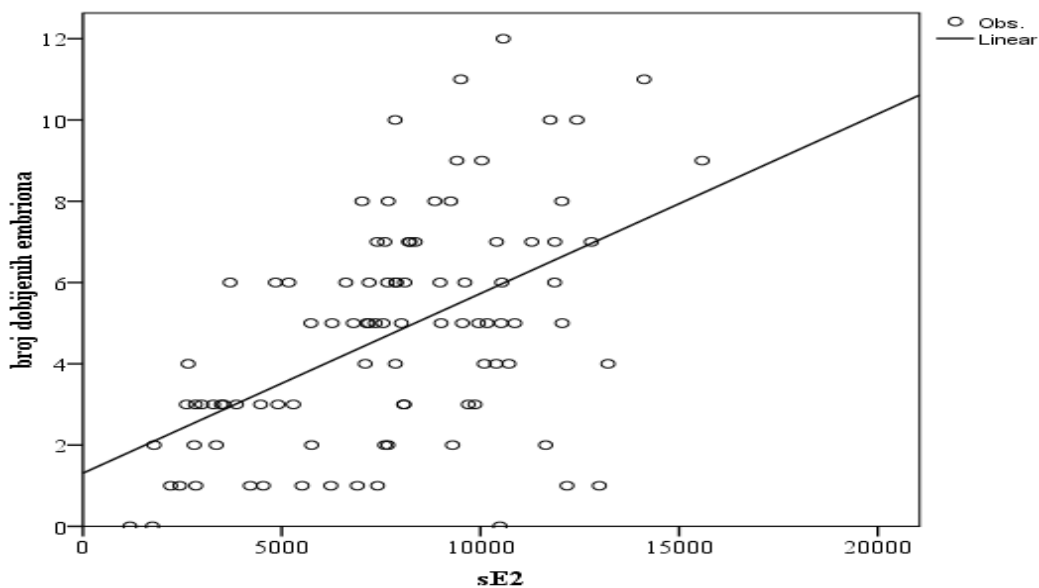
Takođe nivo serumske koncentracije E2 značajno utiče i na broj kvalitetnih jajnih ćelija ($r=+0.552$; $p<0.01$) (Grafik 9).

Grafik 9. Korelacija sE2 i broja kvalitetnih jajnih ćelija u ispitivanoj populaciji



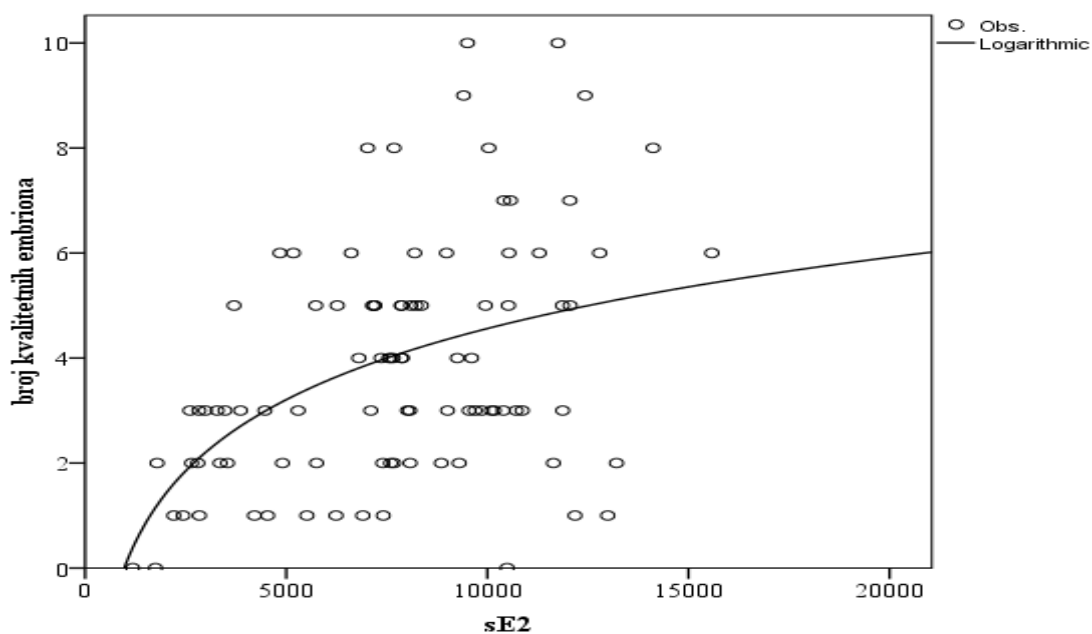
Uticaj koncentracije E2 na broj dobijenih embriona prikazani su na Grafiku 10, i ovi rezultati pokazuju da nivo E2 utiče na broj embriona ($r=+0.515$; $p<0.01$) (Grafik 10).

Grafik 10. Korelacija sE2 i broj dobijenih embriona u ispitivanoj populaciji



Takođe, uočen je i uticaj nivoa serumskog E2 na broj kvalitetnih embriona ($\rho=+0.405$; $p<0.01$) (Grafik 11), ali ne i na broj vraćenih embriona.

Grafik 11. Korelacija sE2 i broja kvalitetnih embriona u ispitivanoj populaciji



Takođe, nije dokazana povezanost serumskog NO pre i posle KOS, kao i nivoa NO u FT sa posmatranim karakteristikama jajnih ćelija (broj jajnih ćelija, broj kvalitetnih jajnih ćelija) i embriona (broj dobijenih embriona, broj kvalitetnih i broj vraćenih embriona).

4.1.3. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT na ishode IVF procedure u ispitivanoj populaciji

Nije dokazan statistički značajan uticaj serumskih i biomarkera FT (nivo serumskog E2, serumski NO pre i nakon KOS, NO FT) na nastanak biohemijske, kliničke trudnoće, kliničke trudnoće nakon 12. nedelje gestacije, kao i na porođaj.

4.2. Rezultati studije vezani za ispitanice podeljene po vrstama protokola KOS

Podaci o ispitanicama podeljenih po grupama koje su formirane na osnovu protkola KOS su prikazani tabelarno. Antropometrijski podaci su prikazani i Tabelom 3,

Tabela 3. Antropometrijski podaci po grupama ispitanica

Varijabla	Dug protokol (n=35)	Kratak protokol (n=59)	p
Godine života [Med (min-max)]	33 (25-40)	38 (24-40)	<0.01
TT [X±SD (min-max)]	63.5±9 (48-81)	65±8 (52-87)	ns
TV [X±SD (min-max)]	167±6 (156-184)	167±6 (154-184)	ns
ITM [X±SD (min-max)]	22.6±2.9 (17±1-27.9)	23.4±2.7 (18.4-29.8)	ns

n- broj ispitanika; p- verovatnoća; TT- telesna težina; TV- telesna visina; ITM- indeks telesne mase; ns- nesignifikantno

Epidemiološki i podaci vezani za menstrualni ciklus su prikazani Tabelom 4.

Tabela 4. Epidemiološki i anamnestički podaci vezani za menstrualne cikluse

Varijabla		Dug protokol	Kratak protokol	p
Obrazovni status [n (%)]	OŠ	3 (9)	3 (5)	ns
	SŠ	18 (51)	30 (51)	
	Fakultet	14 (40)	26 (44)	
Bračni status [n (%)]	Singl	7 (20)	15 (25)	ns
	Udata	28 (80)	44 (75)	
Pušenje [n (%)]	Ne	25 (71)	40 (68)	ns
	Da	10 (29)	19 (32)	
Alkohol [n (%)]	Ne	29 (83)	51 (87)	ns
	Da	6 (17)	8 (13)	
Menarha [Med (min-max)]		13 (10-18)	13 (9-16)	Ns
Karakteristika MC [n (%)]	regularan	34 (97)	59 (100)	Ns
	iregularan	1 (3)	0	
Intenzitet MC [n (%)]	minimalan	1 (3)	6 (10)	Ns
	umeren	31 (89)	47 (80)	
	izražen	3 (8)	6 (10)	
Dužina MC [Med (min-max)]		29 (22-50)	28 (24-31)	<0.01
Trajanje MC [Med (min-max)]		5 (3-7)	5 (3-7)	Ns

OŠ- osnovna škola; SŠ- srednja škola; MC- menstrualni ciklus; p- verovatnoća; ns- nesignifikantno

Podaci vezani za infertilitet, stimulaciju jajnika i VTO prikazani su Tabelom_5.

Tabela 5. Karakteristike infertiliteta, stimulacije jajnika i pokušaja VTO po grupama ispitanica

Varijabla		Dug protokol	Kratak protokol	p
Trajanje infertiliteta [Med (min-max)]		5 (1-10)	5 (1-18)	ns
Tip infertiliteta [n (%)]	primarni	29 (83)	44 (75)	ns
	sekundarni	6 (17)	15 (25)	
Trajanje stimulacije [Med (min-max)]		11 (9-15)	10 (7-15)	<0.01
Broj VTO pokušaja [n (%)]	Bez	25 (71)	43 (73)	ns
	Prvi	10 (29)	12 (20)	
	drugi	0	3 (5)	
	Treći	0	1 (2)	
Ukupna doza gonadotropina [Med (min-max)]		1975 (1025-9600)	2775 (1475-4350)	<0.01
Triger [n (%)]	Ovitrel	35 (100)	31 (52.5)	<0.01
	Pregnyl	0	28 (47.5)	

Podaci vezani za karakteristike jajnih ćelija i embriona su prikazani Tabelom_6.

Tabela 6. Prikaz karakteristika jajnih ćelija i embriona po grupama ispitanica

Varijabla		Dug protokol	Kratak protokol	P
Broj jajnih ćelija [X±SD (min-max)]		10±3 (4-18)	7±4 (1-19)	<0.01
Broj kvalitetnih jajnih ćelija [X±SD (min-max)]		8±3 (0-13)	5±3 (0-17)	<0.01
Broj dobijenih embriona [X±SD (min-max)]		6±3 (0-11)	4±3 (0-12)	<0.01
Broj kvalitetnih embriona [Med (min-max)]		4 (0-10)	3 (0-10)	<0.05
Broj vraćenih embriona [Med (min-max)]		2 (0-5)	2 (0-3)	<0.05
Dan embriotransfera [n (%)]	Drugi	28 (80)	27 (46)	≤0.01
	Treći	6 (17)	28 (48)	
	Peti	0	2 (3)	
	Bez	1 (3)	2 (3)	

Podaci nivoa NO prikazani su Tabelom 7.

Tabela 7. Prikaz nivoa serumskog E2, serumskog NO pre i posle KOS i NO u FT

Varijabla	Dug protocol	Kratak protokol	p
Serumski E2 [X±SD (min-max)]	10226±2233 (6268-15582)	6243±2795 (1181-12058)	<0.01
Serumski NO pre KOS [X±SD/Med (min-max)]	100.74±135.59 / 53.09 (6.76-598.85)	142.26±93.49 / 107.17 (24.98-437.28)	<0.01
Serumski NO posle KOS [X±SD/Med (min-max)]	87.62±79.17 / 53.42 (11.34-371.71)	156.02±88.76 / 154.71 (21.69-361.22)	<0.01
NO FT [X±SD/Med (min-max)]	241.58±106.60 / 231.76 (69.67-472.91)	343.52±76.09 / 356.82 (73.71-459.35)	<0.01

E2- estradiol; NO- azot-oksidi; KOS- kontrolisana ovarijalna stimulacija; FT- folikularna tečnost

Podaci koji se odnose na ishod VTO prikazani su Tabelom 8.

Tabela 8. Ishodi VTO procedure

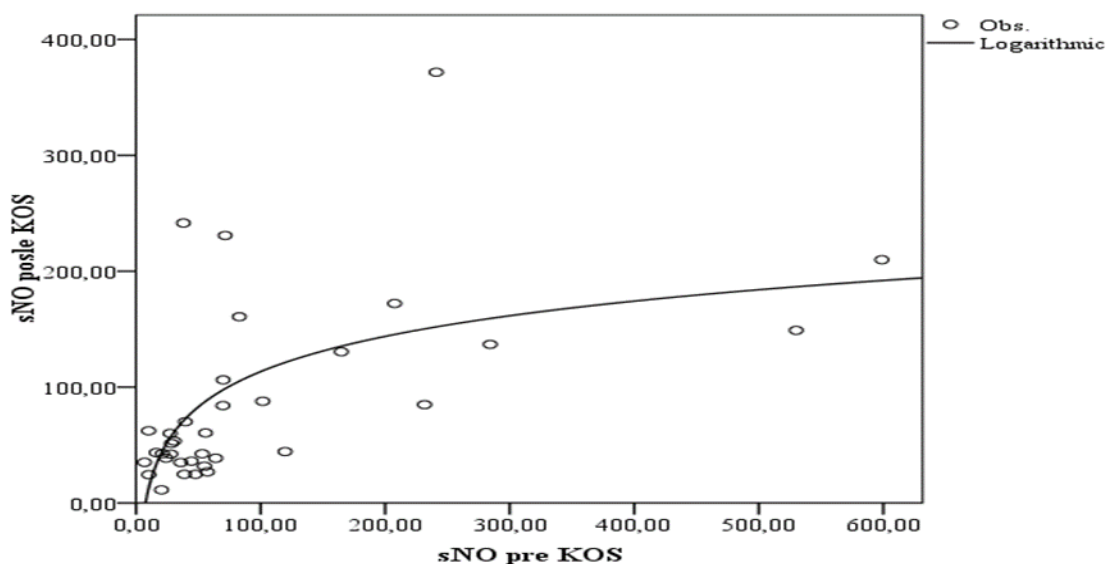
Varijabla		Dug protocol	Kratak protocol	p
Biohemijska trudnoća [n (%)]	Ne	13 (37)	35(59)	≤0.05
	Da	22 (63)	24 (41)	
Potvrđena trudnoća [n (%)]	da	17 (49)	21 (36)	ns
	ektopična	2 (6)	2 (3)	
Klinička trudnoća i porođaj [n (%)]	Ne	20 (57)	44 (75)	ns
	Da	15 (43)	15 (25)	

VTO- vantelesna oplodnja; ns- nesignifikantno

4.2.1. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom

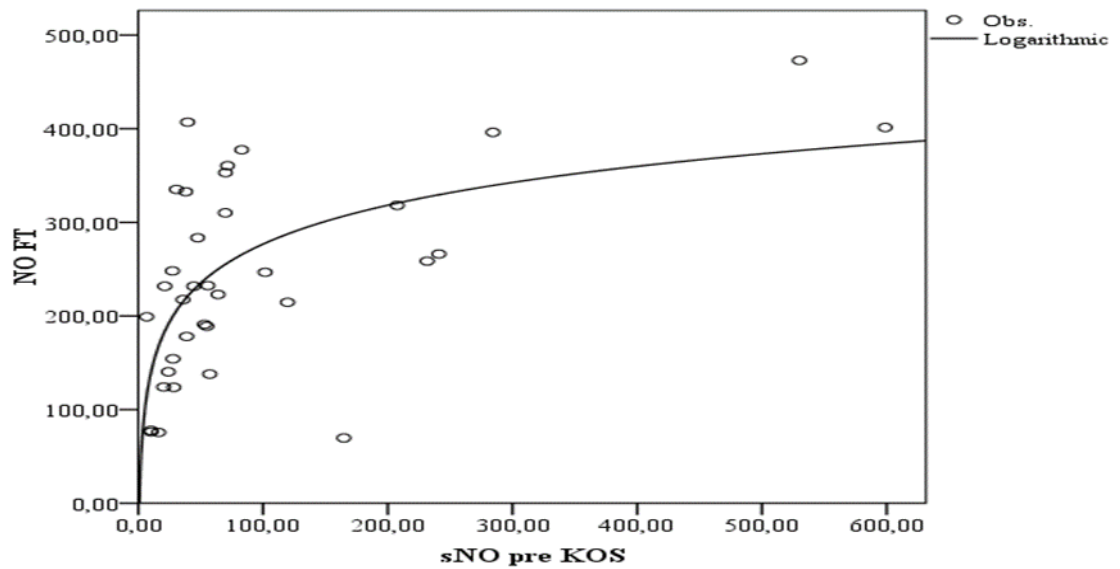
Dug protokol. Rezultati analize korelacije nivoa serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog NO nakon KOS pokazuje prisustvo značajne korelacije između serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog NO nakon KOS ($\rho=+0.627$; $p<0.01$) (Grafik 12)

Grafik 12. Korelacija sNO pre KOS i sNO posle KOS kod stimulisanih dugim protokolom



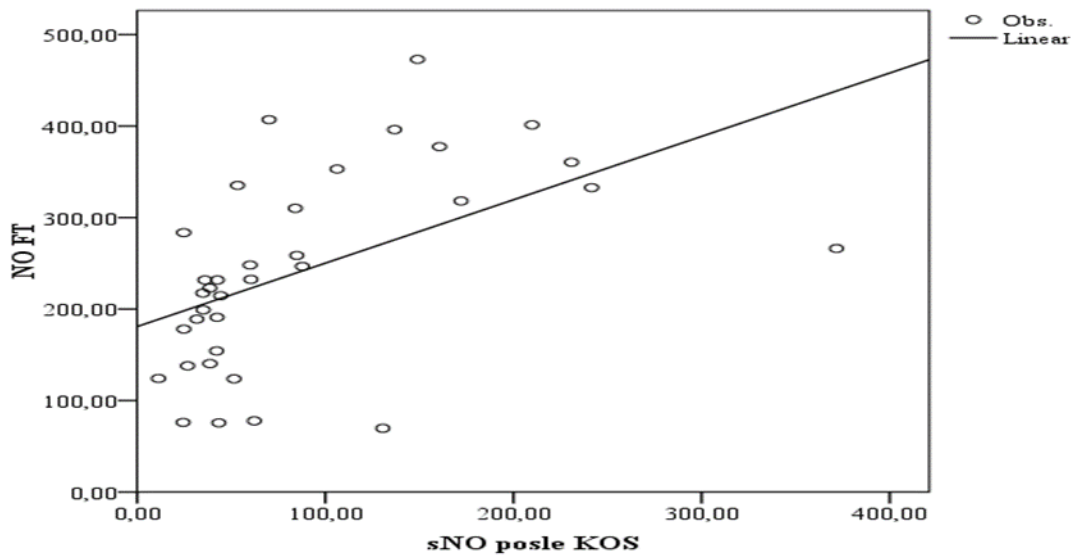
Takođe, registruje se statistički značajna korelacija serumskog NO pre KOS sa nivoima NO u FT ($\rho=+0.575$; $p<0.01$) (Grafik 13), dok ona nije dostigla statističku značajnost sa nivoima serumskog E2.

Grafik 13. Korelacija sNO pre KOS i NO u FT kod stimulisanih dugim protokolom



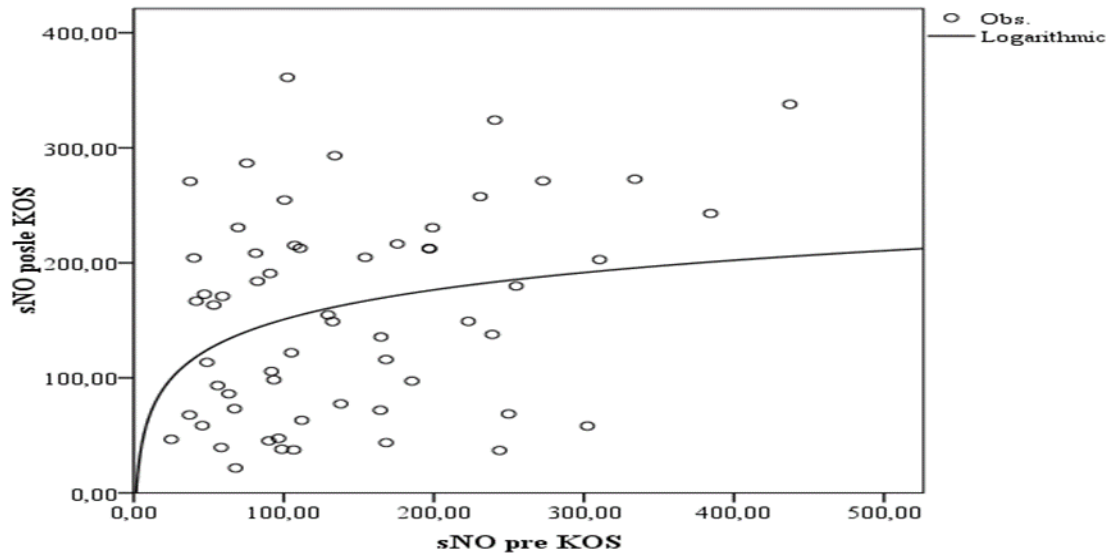
Beleži se značajna korelacija nivoa serumskog NO posle KOS sa nivoom NO u FT ($r=+0.515$; $p<0.01$) (Grafik 14), ali ne i sa serumskim E2 i nivoom NO u FT.

Grafik 14. Korelacija sNO posle KOS i NO u FT kod stimulisanih dugim protokolom



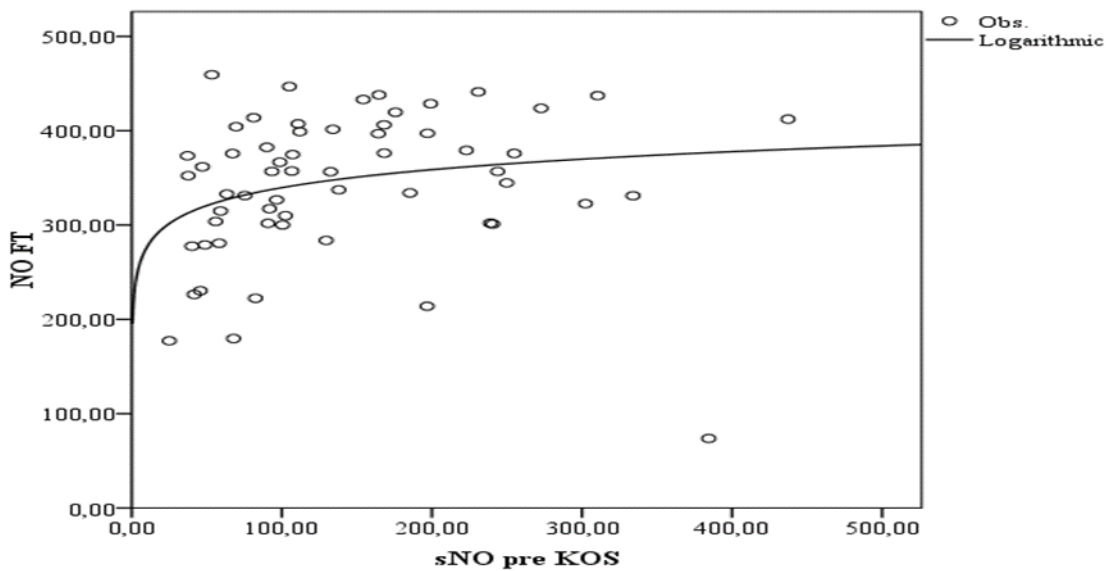
Kratak protokol. Nivo serumskog NO pre KOS značajno korelira sa nivoom serumskog NO nakon KOS ($\rho=+0.261$; $p<0.05$) (Grafik 15).

Grafik 15. Korelacija sNO pre KOS i sNO posle KOS kod stimulisanih kratkim protokolom



Nivo serumskog NO pre KOS korelira sa nivoom NO u FT ($\rho=+0.315$; $p<0.01$) (Grafik 16), ali ne korelira sa nivoima serumskog E2. Nije detektovana korelacija nivoa serumskog NO posle KOS sa nivoom NO FT i serumskog E2. Takođe, nije zabežen značajan uticaj nivoa NO u FT i serumskog E2.

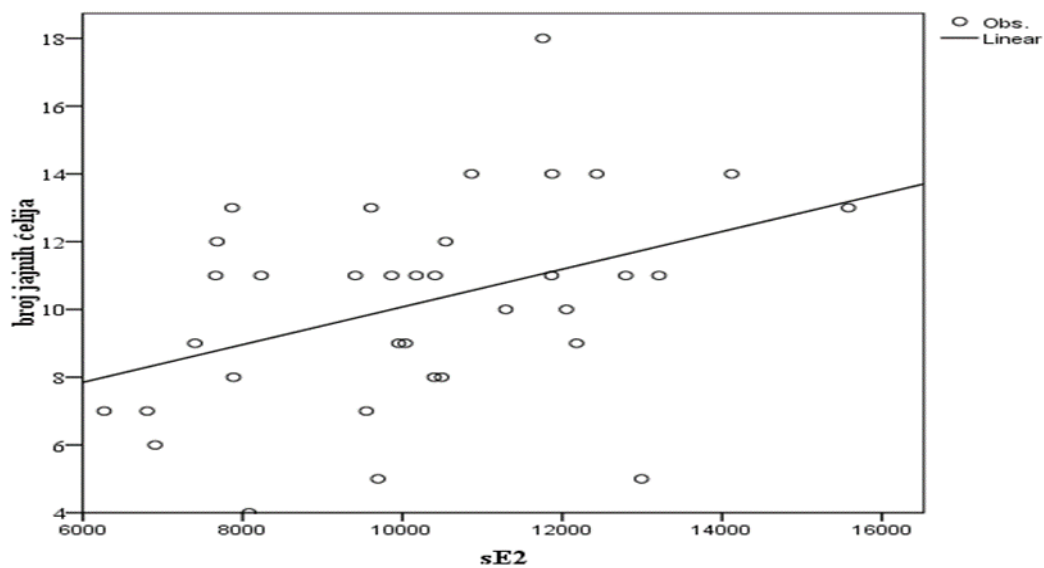
Grafik 16. Korelacija sNO pre KOS i NO u FT kod stimulisanih kratkim protokolom



4.2.2. Korelacije nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT i karakteristika jajnih ćelija kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom

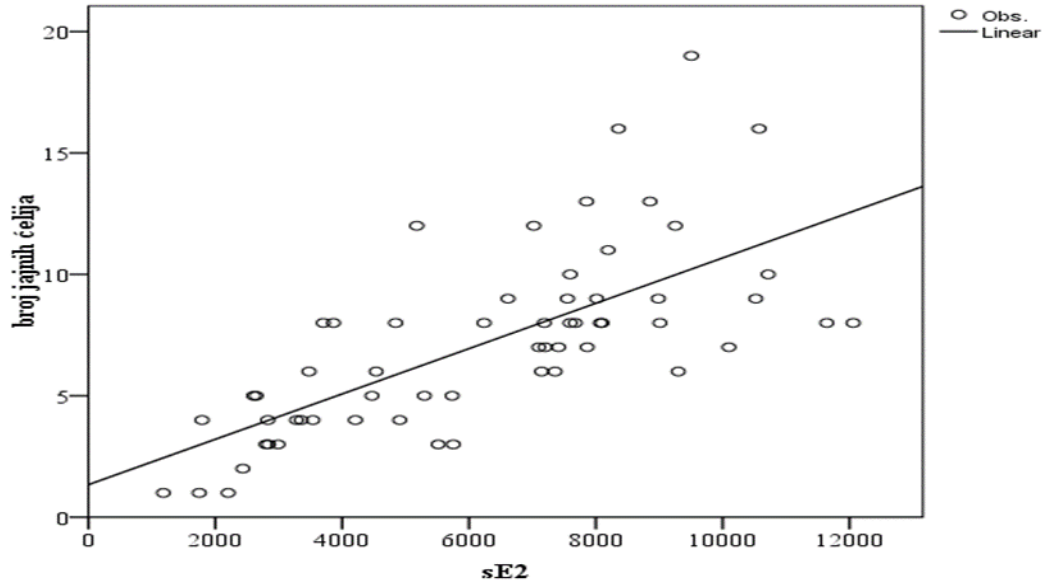
Dug protokol. Nivo serumskog E2 značajno utiče na broj jajnih ćelija ($r=+0.408$; $p\leq 0.01$) (Grafik 17), ali ne i na ostale praćene karakteristike jajnih ćelija i embriona. Takođe, statistički uticaj nivoa serumskog NO pre i posle KOS, kao i nivoa NO FT na posmatrane karakteristike jajnih ćelija (broj jajnih ćelija, broj kvalitetnih jajnih ćelija, broj dobijenih, kvalitetnih i vraćenih embriona) nije dokazan.

Grafik 17. Korelacija sE2 i broja jajnih ćelija kod stimulisanih dugim protokolom



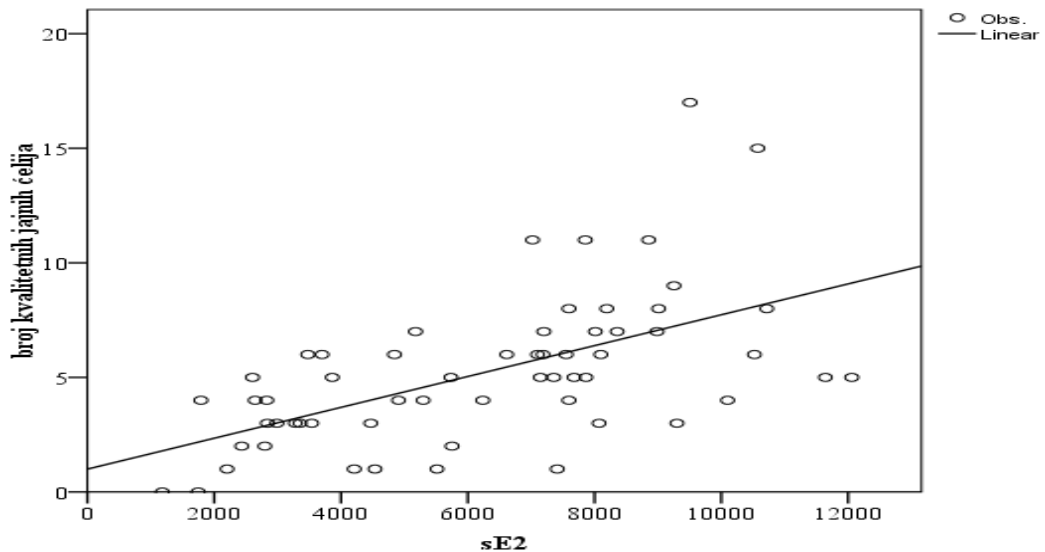
Kratak protokol. Nivo serumskog E2 značajno utiče na broj jajnih ćelija ($r=+0.695$; $p<0.01$) (Grafik 18)

Grafik 18. Korelacija sE2 i broja jajnih ćelija kod stimulisanih kratkim protokolom



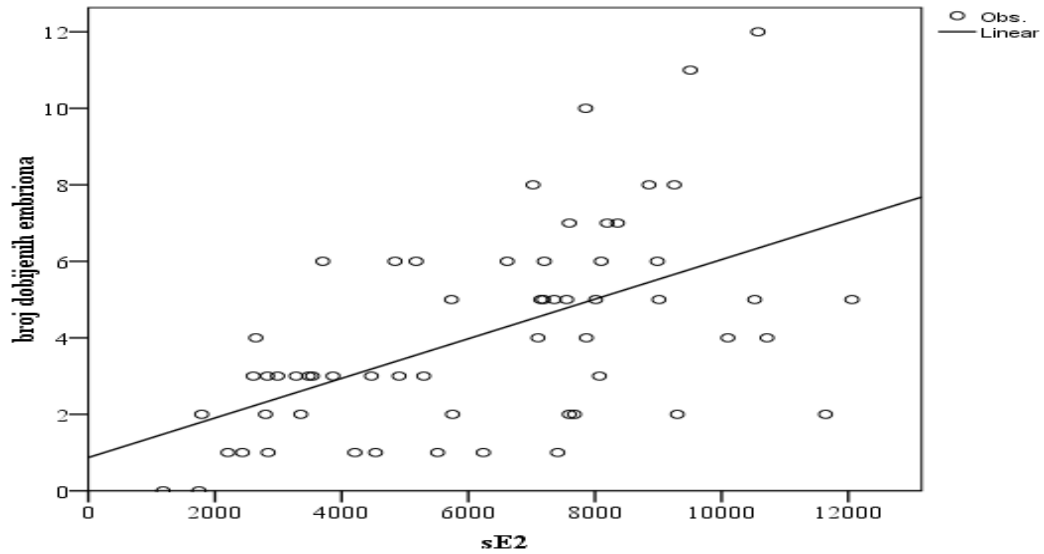
Takođe, Nivo serumskog E2 značajno utiče na brojnih jajnih ćelija i broj kvalitetnih jajnih ćelija ($r=+0.572$; $p<0.01$) (Grafik 19).

Grafik 19. Korelacija sE2 i broja kvalitetnih jajnih ćelija kod stimulisanih kratkim protokolom



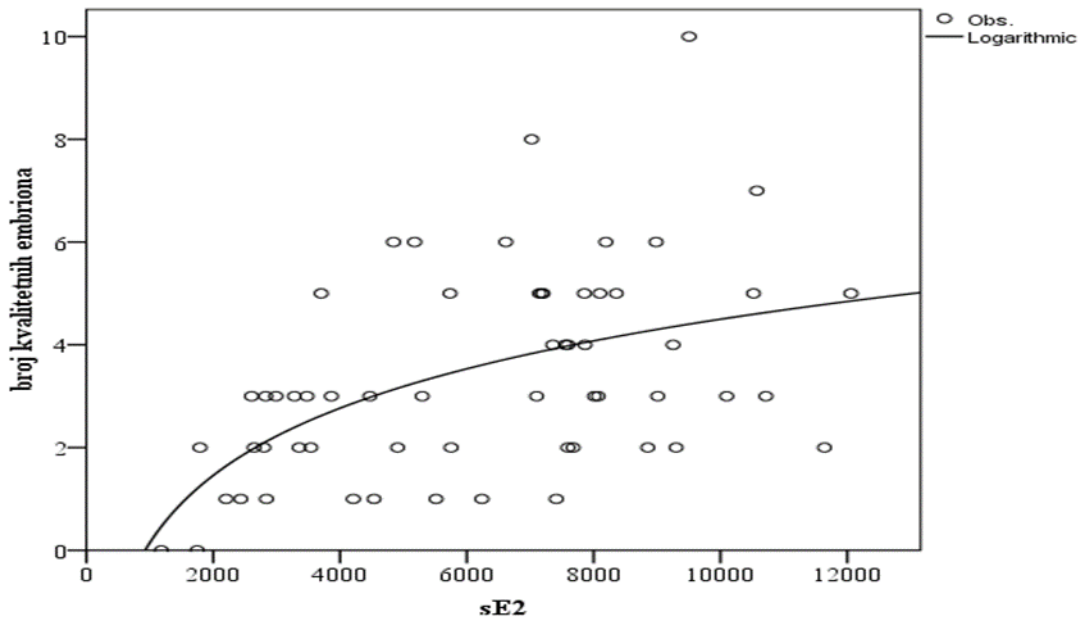
Nivo serumskog E2 značajno utiče broj dobijenih embriona ($r=+0.546$; $p<0.01$) (Grafik 20).

Grafik 20. Korelacija sE2 i broja dobijenih embriona kod stimulisanih kratkim protokolom



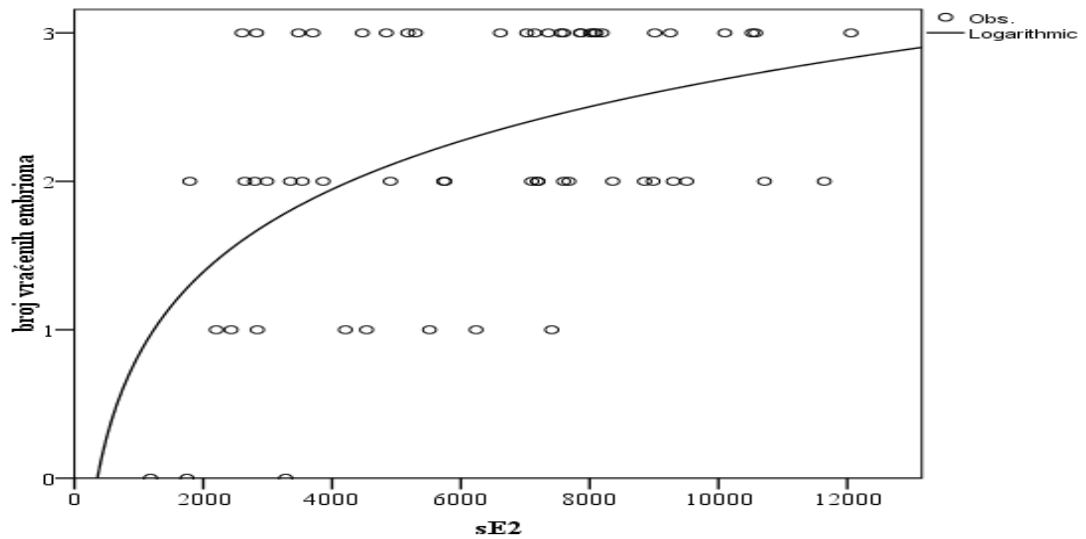
Takođe, nivo serumskog E2 značajno utiče i na broj kvalitetnih embriona ($\rho=+0.472$; $p<0.01$) (Grafik 21).

Grafik 21. Korelacija sE2 i broja kvalitetnih embriona kod stimulisanih kratkim protokolom



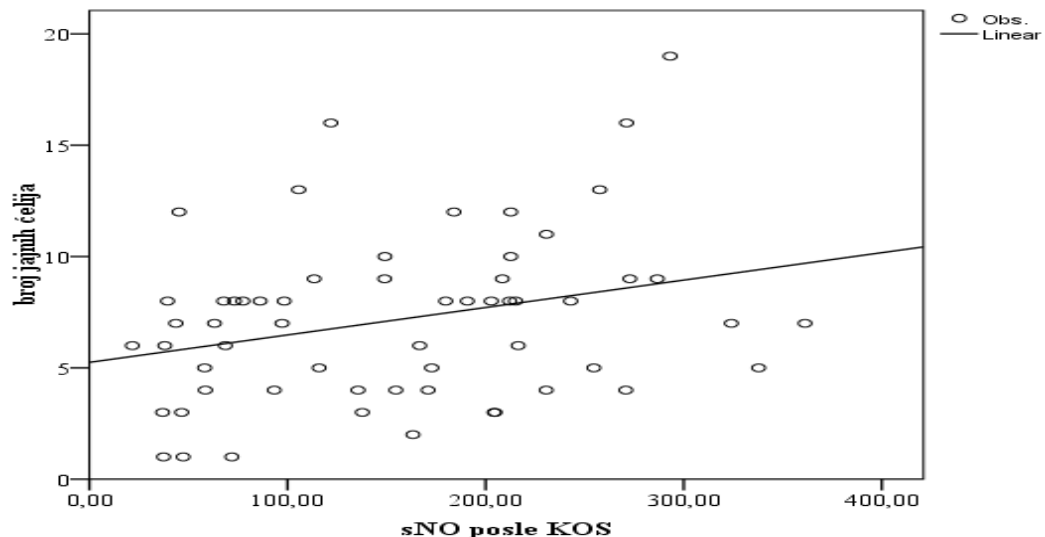
Rezultati pokazuju da nivo serumskog E2 značajno utiče i na broj vraćenih embriona ($\rho=+0.396$; $p<0.01$) (Grafik 22).

Grafik 22. Korelacija serumskog E2 i broja vraćenih embriona kod stimulisanih kratkim protokolom



Rezultati uticaja nivoa serumskog NO nakon KOS na broj jajnih ćelija prikazani su na Grafiku 23. Uočeno je da nivo NO posle KOS značajno utiče na broj jajnih ćelija ($r=+0.291$; $p<0.05$) (Grafik 23).

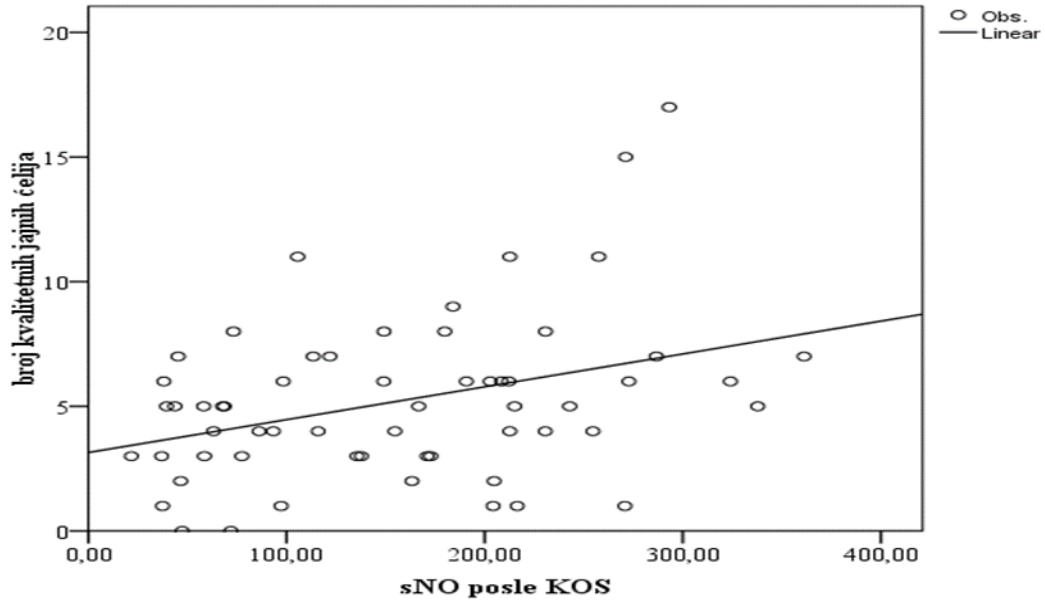
Grafik 23. Korelacija serumskog NO posle KOS i broja jajnih ćelija kod stimulisanih kratkim protokolom



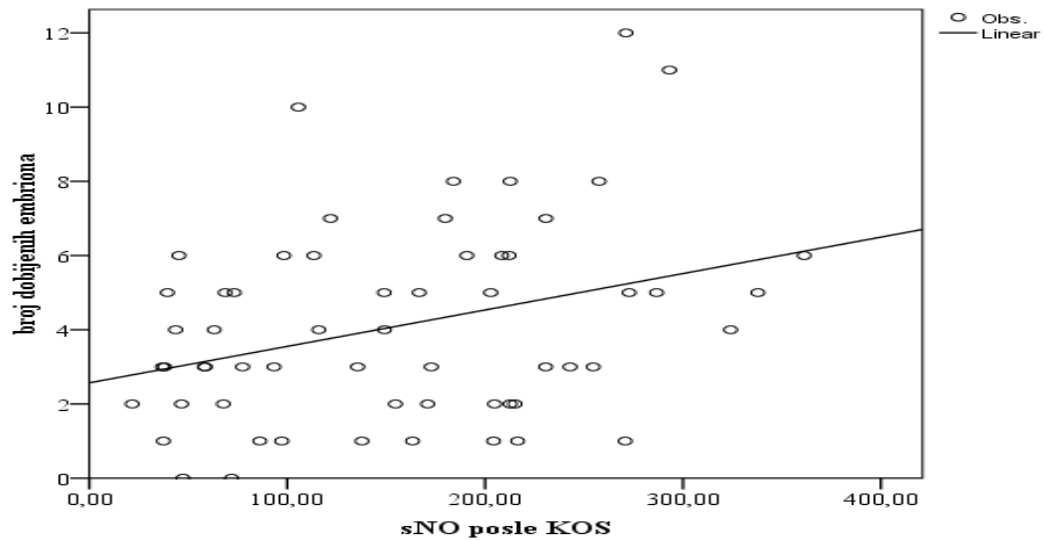
Takođe nivo serumskog NO posle KOS utiče i na broj kvalitetnih jajnih ćelija ($r=+0.356$; $p<0.01$) (Grafik 24) i broj dobijenih embriona ($r=+0.329$; $p<0.01$) (Grafik 25), ali ne i na broj kvalitetnih i vraćenih embriona. Takođe, nije dokazana povezanost serumskog NO pre KOS i nivoa NO u FT sa posmatranim

karakteristikama jajnih ćelija (broj jajnih ćelija, broj kvalitetnih jajnih ćelija, broj embriona, broj kvalitetnih i broj vraćenih embriona).

Grafik 24. Korelacija serumskog NO posle KOS i broja kvalitetnih jajnih ćelija kod stimulisanih kratkim protokolom



Grafik 25. Korelacija serumskog NO posle KOS i broja dobijenih embriona kod stimulisanih kratkim protokolom



4.2.3. Uticaj nivoa ispitivanih serumskih i biomarkera FT na ishode IVF kod ispitanica stimulisanih dugim i kratkim protokolom

Dug i kratak protokol. Nije dokazan statistički značajan uticaj serumskih i biomarkera FT (nivo serumskog E2, serumski NO pre i nakon KOS, NO u FT) na nastanak biohemijske, kliničke trudnoće, kliničke trudnoće nakon 12. nedelje gestacije, kao i porođaj kod ispitanica stimulisanih bilo dugim, bilo kratkim protokolom.

4.3. Rezultati studije vezani za ispitanike

Prosečna telesna težina ispitanika je 94 ± 17 (52-134) kg, dok je prosečna visina 182 ± 7.5 (154-184) cm. Prosečan ITM od 28.4 ± 4.4 (21.2-39.4) kg/m^2 klasifikuje ispitanike u kategoriju prekomerno uhranjenih osoba. U pogledu dostignutog obrazovnog statusa, osnovnu i srednju školu, kao i fakultet je završilo 4 (4%), 66 (70%) i 24 (26%) ispitanika. Od ukupnog broja ispitanika, 55 (59%) su nepušači, a preostalih 39 (41%) konzumira duvan. U pogledu broja ispušenih cigareta, <5, 5-10, 10-20 i >20 cigareta dnevno konzumira 3 (3%), 6 (6%), 23 (25%) i 7 (7%) ispitanika. Povremeno konzumiranje alkoholnih pića navodi 14 ispitanika, od toga 13 navodi malu količinu, dok 1 ispitanik navodi da značajno konzumira alkoholna pića. Preostalih 80 (85%) ispitanika ne konzumira alkoholna pića. Tabelom 9 su prikazane postojeće hronične bolesti ispitanika.

Tabela 9. Postojeće hronične bolesti ispitanika

Bolest	N	%
Hipertenzija	5	5
Šećerna bolest	1	1
Primarna hipotiroza	1	1
Druga kardiovaskularna bolest	1	1
Epilepsija	1	1
Bronhijalna astma	1	1
Odsustvo hroničnih bolesti	84	90

Tabela 10 prikazuje istoriju učinjenih operativnih procedura kod ispitanika pre započinjanja IVF.

Tabela 10. Prikaz učinjenih operativnih procedura kod studijskih ispitanika

Operativna procedura	N	%
Bez operativne procedure	67	71
Varikokela	6	7
Hidrokel i fimioza	1	1
Retraktibilnost testisa u detinjstvu	5	5
Ostale operativne procedure	15	16

Tabelom 11 prikazana je laboratorijska analiza sperme. Analizom spermograma, 8 (8%) je definisano kao normalan, 24 (26%) u granicama prihvatljivog, dok je abnormalan spermogram definisan kod 62 (66%) ispitanika. U

pogledu završne dijagnoze analiziranog spermograma, normozoospermija, teratozoospermija, astenoteratozoospermija, oligoastenoteratozoospermija i oligoteratozoospermija su registrovane kod 8 (9%), 53 (56%), 20 (21%), 10 (11%) i 3 (3%) ispitanika.

Tabela 11. Laboratorijska analize sperme

Varijabla	X±SD (min-max)
Volumen (ml)	3.1±1.4 (0.5-7.0)
Koncentracija spermatozoida (miliona/ml)	28.27±15.63 (0-70)
Progresivno pokretni spermatozoidi (%)	34±11 (0-66)
Normalne forme spermatozoida (%)	2±1.5 (0-7)
pH	7.4±0.2 (7-8)
Aglutinacija	2.83±4.26 (0-18)

5. DISKUSIJA

Na osnovu literaturnih podataka o uticaju ženskih reproduktivnih hormona na metabolizam NO i podataka o promeni hormonskog miljea na koji utiče KOS [151, 214], hipoteza ove doktorske disertacije je da KOS utiče na nivo NO u serumu; tačnije, pretpostavili smo da nivoi NO u serumu koreliraju sa nivoima NO u FT. Pored postavljene hipoteze, pošli smo i od pretpostavke da su nivoi NO u serumu i FT povezani sa brojem visokokvalitetnih ženskih reproduktivnih ćelija i kvalitetnih embriona dobijenih tokom VTO. Ostvareni rezultati ove doktorske disertacije idu u prilog postavljenoj hipotezi, ali i ukazuju i sugerišu da merenje nivoa NO u serumu i FT može biti inovativan način za predikciju ali i poboljšanje efikasnosti VTO tretmana. Praćenje nivoa NO tokom VTO može dati dragocene podatke koji se mogu upotrebiti u predikciji ishoda KOS u savremenim programima biomedicinski potpomognute oplodnje. Ispitivanjem uticaja promene koncentracije NO u serumu i njegove koncentracije u FT na broj i kvalitet jajnih ćelija i kasnije embriona, doprinosi izučavanju NO kao potencijalnog biomarkera u predikciji ishoda VTO.

Na važnost teme obrađene u okviru ove doktorske disertacije ukazuju i mnogobrojni, aktuelni literaturni podaci. Neplodnost je veliki globalni zdravstveni problem, za koji se pretpostavlja da pogađa oko 9% parova širom sveta [11]. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) neplodnost kategoriše kao bolest, što je takođe podržano od strane brojnih eminentnih strukovnih udruženja, uključujući Američko medicinsko udruženje, *engl. American Medical Association (AMA)*, Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju, *engl. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*, Međunarodni komitet za praćenje asistiranih reproduktivnih tehnologija, *engl. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART)* i Američko društvo za reproduktivnu medicinu, *engl. American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* [1-4]. Uzrok i nastanak neplodnosti je često multifaktorski, uzrokovan postojanjem jednog ili više patoloških stanja. U ova patološka stanja kod žena spadaju ovarijalna disfunkcija, okluzija ili adhezije jajovoda, endometrioza, matericom uzrokovani faktori neplodnosti (miomi, polipi, urođene anomalije ženskih reproduktivnih organa, kao i faktori od strane grlića materice), a u patološka stanja kod muškaraca spadaju urođene anomalije muških reproduktivnih organa, poremećaji erektilne funkcije, poremećaji vezani za ejakulaciju, kao i sva stanja koja rezultuju abnormalnim rezultatom spermograma, kao što su smanjen broj ili nedostatak spermatozoida, progresivno pokretnih ili morfološki adekvatnih spermatozoida [1, 5]. Globalno posmatrano, a prema procenama i podacima SZO, 48 miliona parova i 186 miliona pojedinaca, odnosno čak 15% reproduktivno sposobne populacije ima problem sa neplodnošću [1]. Na ozbiljnost problema ukazuju podaci da stopa neplodnosti dostiže čak 30% u populacijama pojedinih regiona južne Azije, podsaharske Afrike, Bliskog istoka, severne Afrike, centralne i istočne Evrope i centralne Azije [10, 11]. U Srbiji neplodnost pogađa 16-18% parova, što je približno proseku na globalnom nivou [16, 17]. Međutim, na ozbiljnost problema neplodnosti

u našoj zemlji dodatno utiče demografska situacija, imajući u vidu da višedecenijski negativan prirodni priraštaj ukazuje na jasan trend kretanja ka depopulizaciji. U prilog tome ukazuju podaci da je totalna stopa plodnosti u Srbiji 1.5, što je daleko ispod minimuma od 2.33 neophodnog za stabilno obnavljanje populacije [18]. Pored toga što neplodnost predstavlja medicinski i demografski problem današnjice, ona predstavlja psihološki, emotivni distress [215], ekonomski [216], i sociološki problem [217].

KOS predstavlja jedan od najvažnijih postupaka u biomedicinskom potpomognutom oplodjenju, bilo da se koristi u postupku IUI ili u postupku VTO [62, 71]. Pored uobičajne upotrebe KOS u slučaju problema bračne ili partnerske neplodnosti, ona je svoje važno mesto našla i u slučajevima kada postoji neophodnost ili želja žene da očuva svoju plodonost (prezervacija fertiliteta). Očuvanje (prezervacija) plodnosti neophodna je kod žena koje nisu ostvarile svoju reproduktivnu funkciju, a zbog prirode maligne bolesti moraju biti podvrgnute operativnim tretmanima, hemio i/ili zračnoj terapiji, a koje mogu značajno smanjiti ili u potpunosti uništiti ovarijalnu rezervu žene, odnosno njene reproduktivne šanse za potomstvo. Ova vrsta prezervacije fertiliteta spada u domen onkofertiliteta. Svrha stimulacije jajnika je da se postigne istovremeno sazrevanje što većeg broja folikula u jajnicima [62, 71]. Time se povećava šansa da se aspiracijom folikula dobije veći broj oocita, a samim tim i šanse za dobijanje većeg broja oplodjenih jajnih ćelija i veći broj embriona što povećava i verovatnoću ostvarivanja trudnoće. Prezervacija fertiliteta u savremenom društvu i kulturi se sve češće koristi u slučaju odlaganja reproduktivne funkcije ženske populacije, a radi na prvom mestu napredovanja u karijeri. U želji da se prvo profesionalno ostvare, a tek potom ostvare svoju reproduktivnu funkciju sve veći broj žena materinstvo odlaže za petu deceniju života kada su reproduktivne šanse za potomstvom, usled smanjene ovarijalne rezerve, ali i starosti ženskih gameta značajno smanjene. Zato se žene danas podvrgavaju stimulaciji jajnika pre nego što pređu četrdesetu godinu života, kada je broj preostalih jajnih ćelija uglavnom veoma nizak. Nakon stimulacije jajnika i ostvarivanja multifolikularnog rasta žene se podvrgavaju aspiraciji folikula, a u cilju dobijanja što većeg broja jajnih ćelija, a potom zamrzavanju onih zrelih i kvalitetnih jajnih ćelija koje će upotrebiti za oplodnju u momentu ostvarivanja svojih profesionalnih i karijernih ciljeva. Ovaj fenomen današnjeg društva nazivamo „social freezing-om” [218]. Pored karijernih razloga „social freezing” koriste i žene koje nisu uspele da pronađu adekvatnog partnera za brak i ostvarivanje potomstva, čak i u onim zemljama u kojima se zbog kulturoloških i religioznih razloga to ne bi očekivalo [219, 220].

Uprkos tome što je vantelesna oplodnja u više decenijskoj upotrebi, još uvek nemamo odgovore na mnoga pitanja vezana za neuspeh ove procedure u onim slučajevima kada nam svi ishodi lečenja (stimulacije jajnika, aspiracije folikula, broja dobijenih kvalitetnih jajnih ćelija i kvalitetnih embriona, besprekorno izveden embriotransfer u endometrijum kliničkim parametrima procenjen kao kvalitetatan i receptivan) prognoziraju uspeh VTO-a, a umesto toga se trudnoća ne ostvari.

Pored ograničene dostupnosti VTO-a za veliki broj infertilnih parova, na uspeh VTO mogu uticati i mnogi drugi uzroci [221]. Endokrini disruptori životne

sredine, genetske mutacije, endometrioza, prethodna operacija jajnika, hemoterapija, radijacija, upotreba duvana i anovulatorni menstrualni ciklusi su neki od faktora koji mogu uticati na uspeh stimulacije jajnika [222]. Relevantni parametri koji mogu uticati na neuspeh VTO su oni biohemijski i metabolički procesi koji utiču na kvalitet jajnih ćelija i kvalitet dobijenih embriona. Mnoge morfološke i morfokinetičke procene embriona ne daju nam podatke vezane za molekularne i biohemijske procese koji mogu uticati na kvalitet embriona [223, 224]. Danas se razvijaju analitičke invazivne i neinvazivne tehnike sa ciljem određivanja biohemijskih i metaboličkih parametara u cilju procene energetskog metabolizma jajnih ćelija i embriona, procene funkcije mitohondrije, određivanja oksidativnog stresa i metabolizmom azot-oksida. Krajnji cilj ovih metoda je pokušaj direktne procene kvaliteta metabolizma jajnih ćelija i embriona što može biti ključno za povećanje stope uspešnosti VTO [225].

Ovoj doktorskoj disertaciji predhodila je studija koja je ispitivala uticaj KOS na važne biohemijske parametre u sklopu oocitogeneze, kao što su fosfolipidi i slobodne masne kiseline. Poznato je da FT značajno doprinosi kvalitetu oocita, a ona je produkt sekrecije granuloza ćelija folikula jajnika i eksudacije plazme u folikularnu šupljinu. Zato je jasno da su brojni važni biohemijski parametri koji se mogu upotrebiti kao biomarkeri ili prediktori kvaliteta jajnih ćelija, embriona i/ili uspeha VTO prisutni kako u serumu, tako i u folikularnoj tečnosti ispitanica. U ove najvažnije parametre koji nam daju predikciju ishoda VTO spadaju fosfolipidi i slobodne masne kiseline prisutne u serumu i folikularnoj tečnosti žena. Kako KOS utiče na brojne endokrinološke procese, prepostavili smo da ona utiče i na biohemijske procese u sklopu produkcije hormona. Polazeći od hipoteze da KOS utiče na nivo fosfolipida i slobodnih masnih kiselina u serumu i FT dokazali smo da njihovi nivoi u serumu i folikularnoj tečnosti međusobno koreliraju, ali i da njihovi nivoi zavise od doze primenjenih gonadotropina tokom KOS-a. Utičući na nivo slobodnih masnih kiselina i fosfolipida u serumu i FT, KOS je uticala i na broj oocita dobrog kvaliteta što je i najznačajniji ishod stimulacije jajnika [226]. Rezultati ove studije su opravdali izvođenje ove doktorske disertacije koja je ispitivala uticaj primene egzogenih gonadotropina u sklopu KOS i VTO na nivo NO u FT i serumu, pogotovo imajući u vidu da porast serumskih koncentracija NO inhibira sintezu steroida (uključujući i estrogene) u granuloza ćelijama folikula humanih jajnika [227].

Poštujući načelo da pilot studije predstavljaju optimalni način za procenu izvodljivosti bilo koje studije u punom obimu sa velikim brojem ispitanika ili sa korišćenjem značajnih finansijskih, vremenskih ili kadrovskih resursa [228], odlučeno je da se sprovođenje ove doktorske disertacije započne izvođenjem pilot studije. Pilot studija sprovedena u okviru ove doktorske disertacije predstavlja prvo istraživanje efekata egzogenih gonadotropina primenjenih tokom KOS na nivo NO u serumu kod ljudi [229]. Pored opštih razloga za izvođenje pilot studije, činjenica da je ova doktorska disertacija izvedena u humanoj populaciji, a dosadašnje studije u ovoj oblasti su izvođene samo na animalnim modelima, nametnuli su se brojni etički razlozi koji su nam postavili imperativ izvođenja pilot studije. Halpern, jedan od najminentnijih eksperata u oblasti etike i metodologije naučno-istraživačkog rada, navodi da je sprovođenje studija sa nedovoljnom snagom studije i

subotimalnim brojem studijskih ispitanika neetično [230]. Pored toga, na samom početku izrade naučno-istraživačkog rada koji je u sklopu ove doktorske disertacije, postavili smo pitanje „Da li je etički sprovođiti studiju čija se izvodljivost ne može garantovati, odnosno da verovatnoća njenog uspeha nije velika?“. I upravo jedan od glavnih razloga izvođenja pilot studije bio je da da odgovor na pitanje da li je izvodljivo određivanje koncentracije nitrita i nitrata (produkata NO) u humanom serumu i FT, merenjem pomoću $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ kompleta i određivanjem koncentracije NO reakcijom nitrat reduktaze i Griess-ovom reakcijom. Naša pilot studija je dala potvrđan odgovor na ovo pitanje, a koji glasi: "istraživanje se može nastaviti bez modifikacija u predloženoj metodologiji", što predstavlja najuspešniji, četvrti stepen u gradaciji ishoda pilot studija [228].

Nakon ove pilot studije, koja je dokazala izvodljivost eksperimenta i metodološkog pristupa u sklopu ove doktorske disertacije, ali i pružila neophodne informacije za izračunavanje veličine uzorka i druge neophodne informacije za procenu drugih aspekata doktorske disertacije, krenulo se u sprovođenje istraživanja u punom obimu. U okviru ove doktorske disertacije sprovedena je opservaciona studija preseka koja je obuhvatila 94 predominantno primarno infertilnih (78%), normalno uhranjenih ispitanica, prosečnog trajanja infertiliteta 5 godina, koje su podvrgnute dugom ($n=35$) ili kratkom ($n=59$) protokolu stimulacije jajnika. Prosečno trajanje KOS iznosilo je 10,5 dana, a kretalo se u rasponu od 7 do 15 dana. Ovakvi naši rezultati su u potpunosti u saglasju sa ostalim literaturnim podacima objavljenim u eminentnim medicinskim časopisima [231, 232]. Gledano po protokolima KOS, stimulacija jajnika kod dugog protokola je iznosila 11,5, a kod kratkog 10 dana i statistički se razlikovala [229], što je u skladu sa svim relevantnim literaturnim podacima [233, 234]. Prosečna vrednost ukupne primenjene doze gonadotropina kod naših ispitanica u sklopu KOS je iznosila 2625 IU, a kretala se u rasponu od 1025 IU do 9600 IU [229]. Uočava se diskrepanca u poređenju rezultata sa rezultatima studije Lashena i saradnika kod kojih se srednja vrednost ukupne primenjene doze gonadotropina kretala u rasponu vrednosti od 1485 IU do 6323 IU [235]. Ovo se može objasniti činjenicom da su Lashen i saradnici koristili samo jedan tip protokola KOS, dok su naše pacijentkinje bile podvrgnute kako GnRH agonist, tako i GnRH antagonist protokolima. Pored toga naše pacijentkinje su stimulisane kako rekombinantnim, tako i urinarnim preparatima gonadotropina. Činjenica da tip primenjenog protokola KOS [236] i vrsta primenjenih preparata gonadotropina utiče na ukupnu dozu gonadotropina u potpunosti može objasniti uočene diskrepance [237].

Danas je poznato da različite ćelije proizvode NO u različitim tkivima, organima i organskim sistemima. Tako se produkcija NO obavlja u ćelijama glatkih mišića, mezangijalnih ćelija, neurona, trombocita, hepatocita, makrofaga, fibroblasta i u epitelnim ćelijama [149]. NO reguliše tonus ćelija glatkih mišića, trombocita - agregacija i adhezija, rast ćelija, apoptoza, neurotransmisije i povrede, kao i infekcije izazvane imunološkim reakcijama. Pošto su i ovi procesi povezan sa biologijom, fiziologijom i patofiziologijom različitih reproduktivnih procesa, to implicira da NO ima važnu ulogu u reprodukciji. NO je prepoznat kao molekul koji bitno reguliše biologiju i fiziologiju reproduktivnog sistema. Takođe, NO ima važnu ulogu u sazrevanju oocita i uspehu VTO [151, 238, 239]. NO je pronađen u

mikrookruženju oocita i pokazalo se da igra važnu ulogu u skoro svim fazama sazrevanja, uključujući mejotičke deobe, oplodnju, formiranje embriona i njegovu implantaciju [179, 240]. Štaviše, pokazalo se da NO odlaže starenje oocita i održava integritet deobnog vretena tokom mejoze [241]. Koncentracije NO u FT nedavno su predstavljene kao koristan marker u predviđanju kvaliteta oocita i implantacionog potencijala embriona [242]. Iako je pokazano da NO utiče na oplodnju i da je važan faktor od koga zavisi uspeh VTO, uloga NO u sazrevanju oocita, oplodnji i razvoju embriona i dalje je interesantan predmet naučnih debata. Relativno je mali broj podataka o ulozi NO tokom procesa razvoja embriona u kontekstu VTO. Podaci ukazuju da je uloga NO u preimplantacionom razvoju embriona još nije jasna i da različiti nivoi NO mogu imati različite regulatorne efekte. Dodatak medijumu sperme i oocita NOS inhibitora L-NAME, u visokim koncentracijama (5, 10 mM) dovodi do inhibicije razvoja embriona miša, dok je dodavanje niskih koncentracija NO donora L-arginina stimuliše stopu oplodnje i embrionalni razvoj [203]. Visoke koncentracije L-arginina takođe inhibiraju procese oplodnje i razvoja embriona, što sugeriše da je odgovarajući nivo NO ključan za pravilno odvijanje ovih procesa [203, 204]. Takođe, Barroso i saradnici su pokazali da više koncentracije NO inhibiraju razvoj embriona *in vitro* i implantaciju *in vivo* kod miševa [205]. Štaviše, čini se da je cGMP molekularni efektor NO u razvoju preimplantacionog embriona [205, 206]. Upotreba NO inhibitora NG-nitro-L-arginina (L-NA) kod miševa *in vitro* blokirala je razvoj dvoćelijskih embriona, ali ovaj inhibitorski efekat nestaje kada se koncentracija L-NA smanji na 125M. Primena SNP donora NO u svim analiziranim koncentracijama (u rasponu od 0,2nM do 500M) inhibira normalan razvoj embriona, ali kombinacija L-NA i SNP poništava ove inhibitorske efekte. Činjenica da NO reguliše razvoj embriona putem cGMP puta je demonstrirana dodavanjem u medijum i 8-Br-cGMP (derivat cGMP) i 500 M L-NA. Embrioni su pokazali značajno ubrzanje normalnog razvoja u poređenju sa onima uzgajanim samo u 500 M L-NA. Inhibitorski efekat L-NA je obrnut 8-Br-cGMP, što ukazuje na ulogu NO/cGMP put u razvoju preimplantacionog embriona [205].

Humane studije u ovom kontekstu pokazale su kontradiktorne rezultate. Sa jedne strane, Battaglia i saradnici kao i Lipari i saradnici su pokazali povezanost između metabolita NO koji se oslobađaju u medijumu kulture embriona sa progresijom u formiranju blastocista, kao i njihovu korelaciju sa stopama trudnoće [207, 208]. Preciznije, intermedijerni NO metaboliti u medijumima za osemenjavanje bili su 2,6 puta veći kod embriona koji su napredovali do stadijuma blastociste u poređenju sa onima koji nisu [207]. Pored toga, primena donora NO, poput nitroglicerina (NTG), pacijentima na VTO sa istorijom neuspešnih implantacija nije bila efikasnija u pogledu poboljšanja stope implantacije ili trudnoće u poređenju sa placeboom [209]. Takođe, istraživana je moguća povezanost između koncentracije NO u serumu/FT i kvaliteta oocita/embriona. Objavljenih podataka u tom pogledu je malo, a pored toga su kontradiktorni. Lee i saradnici su ukazali na nedostatak korelacije između varijabilnih koncentracija NO u FT i TNF α sa kvalitetom oocita i kvalitetom embriona i uspehom VTO [210]. Nekoliko godina kasnije pokazalo se da su viši nivoi nitrita i nitrata pronađeni u folikulima rezultirali embrionima lošijeg kvaliteta [211]. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima koje su objavili Vignini i saradnici, gde je srednja koncentracija NO u FT bila veća kod pacijenata sa embrionima lošeg kvaliteta u odnosu na one sa visokokvalitetnim

embrionima [212]. Ispitivanjem ekspresije iNOS u kumulusnim ćelijama otkriveno je da je koncentracija iNOS veća u kumulusnim ćelijama koji pripadaju neoplođenim jajnim ćelijama, u poređenju sa normalno oplođenim jajnim ćelijama [213]. Ovi podaci ukazuju na ulogu iNOS kao biomarkera kvaliteta oocita, ali je potrebno dalje istraživanje kako bi se ovaj biomarker smatrao korisnim alatom za selekciju oocita visokog kvaliteta. Štaviše, dodatni podaci su neophodni da bi se razjasnila moguća korelacija između NO i razvoja embriona i ali i drugih parametara i ishoda VTO. Imajući u vidu mali broj studija koje su se odnosile na ulogu NO u procesu VTO, istraživanja u ovom pravcu su od neophodnog značaja, kako bi se jasno definisala uloga NO u VTO. Pored toga, naučno-istraživački podaci u ovom području potencijalno mogu otvoriti perspektive suplementacije, bilo ishranom koja na primer u sebi sadrži crnu čokoladu [243], bilo farmaceutskim preparatima koji u sebi sadrže L-arginin and L-citrullin [244] ili čak promenom svakodnevnih navika i životnog stila. Fiziološki ekvilibrijum koji vodi ka neutralnoj, odnosno optimalnoj oksigenaciji je obezbeđen subtilnim balansom pro-oksidantnih i anti-oksidantnih materija, a on je određen ne samo ishranom već i fizičkom aktivnošću, kao i životnim navikama. Poznato je da se na različite načine može povoljno uticati u cilju ostvarivanja željenih nivoa NO u serumu i ostalim telesnim tečnostima i tkivima. Tako savremena medicina u svrhu ostvarivanja adekvatnih rezultata lečenja uz pomoć optimizacije nivoa NO u organizmu koristi fizičku aktivnost [245], praksu boravka u saunama [246], promenu životnih navika kao što je prestanak konzumiranja cigareta [247], kao i regulisanje sna [248].

Koncentracije NO u serumu i FT u toku fiziološkog menstrualnog ciklusa žene postepeno se povećavaju tokom folikularne faze ciklusa, dostižući vrhunac u sredini ciklusa, što ukazuje na to da se proizvodnja NO u jajnicima odvija postepeno i da je kontrolišu hormoni [249, 250]. FT odražava fazu razvoja i sazrevanja folikula, tako da proučavanje njenih komponenti može ukazati na sazrevanje i kvalitet folikula i oocita [251-253]. Procena kvaliteta i broja kvalitetnih oocita tokom procesa VTO danas je u fokusu istraživanja upravo zbog mogućeg poboljšanja ishoda procesa VTO. Danas se ispituje nekoliko unutrašnjih (intrinzičnih) markera kompetentnosti i kvaliteta jajnih ćelija kao što su aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (*engl. glucose-6-phosphate dehydrogenase* - G6PD ili G6PDH) i mitohondrijalni status i spoljašnjih (ekstinzičkih) markera u koje spadaju apoptoza folikularnih ćelija i nivoi beta-transformišućeg faktora, (*engl. beta transforming growth factor-beta* - TGF- β) u FT i serumu [93]. Inicijalni rezultati ukazuju da oni mogu biti korisni indikatori kompetentnosti i kvaliteta jajnih ćelija i kvaliteta embriona, ali kompleksnost njihovog određivanja i merenja, kao i finansijski troškovi njihovog izvođenja postavljaju ozbiljna ograničenja u rutinskoj primeni. Zato je otkrivanje novog markera koji bi precizno i objektivno procenjivao kompetentnost i kvalitet jajnih ćelija, uz jednostavnije uzorkovanje materijala i niže troškove obavljenih analiza jedan od imperativa reproduktivne medicine. Danas se metabolomika sve više primenjuje za određivanje potencijalnih biohemijskih indikatora kvaliteta oocita; međutim, studije u ovoj oblasti su još uvek u početnim fazama. Primena GnRH agonista i GnRH antagonista tokom procesa VTO dovodi do dinamičkih promena u sastavu FT, koje predstavljaju odgovor jajnika na KOS. Rezultati naše studije pokazuju da je tokom VTO nivo NO u serumu značajno veći nakon stimulacije u poređenju sa nivoom pre stimulacije jajnika. Pored toga, postoji

statistički značajna razlika u nivou NO u FT i serumu pre i nakon tretmana. Nivo NO u FT se statistički značajno razlikovao od nivoa NO u serumu nakon stimulacije jajnika. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija [166, 254]. Prisustvo NO u FT je potvrđeno kod nekoliko životinjskih vrsta, kao što su svinje [255], goveda [256], miševa [257], pacova [169], ovaca [258], kobilica [259] i drugih životinja. Takođe, ekspresija NOS sugerira prisustvo intraovarijalnog sistema generisanja NO i naglašava njegovu ulogu u kontroli razvoja folikula jajnika [166]. Različite ćelije jajnika mogu da proizvode NO u jajniku, a rezidentni makrofagi su identifikovani kao mogući izvor NO [166, 254]. Naši rezultati ukazuju da ženski gonadotropini pozitivno regulišu sintezu NO tokom KOS, kao i da je efekat NO na folikule jajnika potencijalno promenjen tokom VTO. Takođe smo otkrili da su nivoi NO u FT značajno veći u poređenju sa nivoima NO u serumu nakon KOS.

Rezultati korelacione analize pokazuju da postoji pozitivna korelacija između nivoa NO u serumu nakon tretmana egzogenim gonadotropinima u sklopu KOS i nivoa NO u FT, što se može objasniti mogućnošću prolaska NO kroz krvno-folikularnu barijeru, pri čemu se nivo NO održava sa obe strane barijera mehanizmom transcelularnog transporta. Da je transport NO između krvi i FT intenzivan tokom KOS, ukazuju rezultati studije gde je injekcija egzogenih gonadotropina povećala permeabilnost krvno-folikularne barijere za NO [257]. U reproduktivnim i drugim fiziološkim procesima, efekat NO zavisi od njegove koncentracije u krvi [155]. Nizak nivo NO može pozitivno uticati na folikulogenezu u ženskim reproduktivnim procesima, dok prekomerni nivoi NO imaju suprotan efekat [260]. Povećane koncentracije NO u folikulu mogu biti toksične, što rezultuje atrezijom folikula [166], što dalje implicira da visok nivo NO u FT i serumu nakon KOS može sprečiti normalan razvoj folikula. S obzirom da je NO uključen u procese razvoja i smrti različitih tipova ćelija, pretpostavlja se da NO ima ulogu u regulisanju ovih događaja [166]. Osnovni mehanizam atrezije folikula je proces apoptoze, pri čemu NO pozitivno reguliše apoptozu indukujući apoptotičku fragmentaciju DNK [261, 262]. Naši rezultati takođe pokazuju na pozitivnu korelaciju broja visoko kvalitetnih oocita sa nivoom NO u serumu nakon KOS kod kratkog protokola KOS. Takođe, u celokupnoj populaciji ispitanica u sklopu ove doktorske disertacije rezultati nisu ukazali na postojanje korelacije nivoa NO u serumu nakon tretmana sa brojem izolovanih visoko kvalitetnih oocita. Iz ovoga možemo zaključiti da supresivni efekat GnRHa na nivo reproduktivnih hormona (od kojih su u ovom kontekstu najvažniji E2 i LH) dovodi do izostanka pozitivnog efekta serumskog NO nakon KOS kako na broj dobijenih oocita, tako i na broj dobijenih kvalitetnih oocita, što je najverovatnije posledica intenzivirane folikularne atrezije. Može se pretpostaviti da je veći nivo NO u serumu povezan sa manjim brojem oporavljenih oocita kod pacijenata koji imaju VTO zbog endometrioze i/ili neplodnosti tubarnog faktora. Dalje, može se zaključiti da povećan nivo NO u serumu i FT može poremetiti folikulogenezu, utičući na kvalitet oocita. Na osnovu literature i naših analiza, može se pretpostaviti da se eNOS u ćelijama granulose aktivira nakon KOS [263] i da KOS indukuje povišenu proizvodnju NO, što može da pokrene proces apoptoze folikula i na taj način poremeti razvoj oocita. Ekerhovd i saradnici uključili su u svoju studiju samo parove koji su podvrgnuti VTO kod kojih je uzrok neplodnosti faktor muške neplodnosti i ispitali uticaj KOS na koncentraciju NO u serumu kod zdravih žena [264]. Rezultati njihovog istraživanja su u suprotnosti sa rezultatima

dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Tačnije, Ekerhovd i saradnici su pokazali da gonadotropini koji se primenjuju tokom KOS uzrokuju smanjenu aktivnost eNOS, najverovatnije indirektno preko E2, mehanizmom koji nije zavisen od receptora [264]. Ovakvi kontradiktorni rezultati mogu ukazivati na to da efekat NO takođe zavisi od uzroka neplodnosti.

Kvalitet jajnih ćelija je jedan od kritičnih faktora za plodnost žene. Pored toga, kvalitet oocita i embriona je među najvažnijim faktorima za uspeh procesa VTO [128, 265]. Oocita je izuzetno osetljiva na promene u svom mikrokruženju, tako da mnogi faktori u FT mogu uticati na njeno sazrevanje, kao i na to da li će doći do završne faze razvoja oocita [266, 267]. Rast i razvoj oocita su takođe međusobno zavisni od somatskih ćelija koje ih okružuju [268]. Razumevanje prirode procesa koji kontrolišu kvalitet oocita, a koji se dešavaju u samoj oociti, njenom mikrokruženju ili okolnim ćelijama oocita, jedan je od najizazovnijih problema u reproduktivnoj biologiji. Mnoga dosadašnja istraživanja pokušavala su da odrede biomarkere kvaliteta oocita, ali pouzdan indikator kvaliteta i broja kvalitetnih oocita dobijenih u procesu VTO još uvek nije identifikovan uprkos velikom interesovanju istraživača i velikom broju studija obavljenih u ovoj oblasti [266, 269, 270].

U daljem radu, nakon stimulacije gonadotropinima, na dan aspiracije folikula, merili smo nivo E2 kod pacijentkinja i upoređivan je sa nivoom E2 pre stimulacije. Takođe, utvrđen je broj kvalitetnih oocita u odnosu na ukupan broj oocita dobijenih aspiracijom folikula jajnika. Ovaj odnos, u engleskoj literaturi često nazvan "oocyte maturation index" se uobičajno koristi kao pokazatelj kvaliteta KOS-a [271, 272]. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da stimulacija egzogenim gonadotropinima u sklopu KOS-a povećava nivo E2 i podstiče razvoj višestrukih folikula jajnika, kao i adekvatan razvoj endometrijuma, što je u skladu sa svim dosadašnjim literaturnim podacima [273]. Nivo E2 u serumu kod žena koje su podvrgnute KOS tokom VTO procedure su veći od nivoa E2 kod zdravih žena tokom menstrualnog ciklusa [274, 275]. Nivo E2 u serumu se značajno povećao nakon KOS na dan aspiracije folikula u poređenju sa nivoom E2 u serumu pre stimulacije. Daljom korelacionom analizom pokazano je da je nivo E2 u serumu, merenog na dan stop injekcije, odnosno trigger injekcije u negativnoj korelaciji sa nivoima NO u serumu pre i posle KOS, kao i nivoima NO u FT. Ovi naši rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima studije Roselija i saradnika, koji su takođe pokazali da je povećanje nivoa NO u serumu u korelaciji sa povećanjem nivoa serumskog E2 [152]. Ovo nesaglasje može se objasniti činjenicom da su Roseli i saradnici istraživanje sprovedi kod postmenopauzalnih žena podvrgnutih hormonskoj supstitucionoj terapiji. Uostalom kao što i sami Roseli i saradnici u svom radu ističu da nivo NO i njegovih metabolita NO_2^- i NO_3^- direktno kolerila sa nivoom E2, ali samo u fiziološkim ciklusima [152] što objašnjavaju sa aktivacijom eNOS pomoću fizioloških nivoa E2 [152]. Poznato je da E2 ispoljava vazodilatatorne efekte u materici [276]. Protok krvi kroz arterije i arteriole, kao i propustljivost kapilara u materici, povećava se pod uticajem NO [277] ili visokih koncentracija E2 tokom menstrualnog ciklusa [278], što se može registrovati doppler ultrazvučnim pregledom arterije uterine [279]. Utvrđeno je da NO utiče na propustljivost kapilara materice i pozitivno reguliše vazodilataciju izazvanu E2 [250, 280, 281]. U svojoj studiji Antebi i saradnici su demonstrirali pozitivnu linearnu korelaciju između nivoa NO i E2 u FT

žena koje su podvrgnute VTO, što ukazuje da citokini istovremeno utiču na povećanje nivoa NO i E2 [159]. Isti autori su takođe primetili pozitivnu korelaciju NO u FT sa veličinom folikula, što je važno zbog drugih studija koje su ukazale na korelaciju veličine folikula sa produkcijom E2 u granulosa ćelijama [282]. U suprotnosti sa našim rezultatima, Manau i saradnici nisu ustanovili postojanje signifikantne korelacije između nivoa NO i E2 [283]. Disonantnost naših i rezultata studije Manao i saradnika je najverovatnije posledica malog broja pacijentkinja uključenih u njihovu studiju i nepostojanja procene veličine uzorka i snage studije.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u potpunosti u skladu sa postavljenom hipotezom kojom se pretpostavilo da KOS utiče na nivo NO u serumu; tačnije, nivoi NO u serumu koreliraju sa nivoima NO u FT, kao i da su nivoi NO u serumu i FT povezani sa brojem visokokvalitetnih ženskih reproduktivnih ćelija dobijenih tokom VTO kod pacijentkinja stimuliranim kratkim protokolom KOS. Ova doktorska disertacija predstavlja analizu promena nivoa potencijalnih indikatora broja dobijenih kvalitetnih oocita, kao što je NO, u serumu i FT pre i posle KOS kod pacijentkinja koje su podvrgnute VTO. Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su na postojanje pozitivne korelacije serumskog nivoa NO pre i posle KOS i nivoa NO u FT. Serumski nivoi NO nakon KOS pozitivno koreliraju sa nivom NO u FT ukoliko se posmatra celokupna i populacija pacijentkinja podvrgnutih dugom GnRHa protokolu, što rezultuje izostankom njihove korelacije sa brojem dobijenih oocita, brojem dobijenih oocita visokog kvaliteta i brojem dobijenih embriona. Međutim ukoliko se samo posmatra populacija pacijentkinja podvrgnuta kratkom GnRHa protokolu stimulacije korelacija serumskih vrednosti nakon KOS sa nivoom NO u FT ne postoji. Upravo je izostanak ove pozitivne korelacije omogućio izbegavanje negativnih uticaja veoma povišenih, ekcesivnih nivoa NO u folikulu na kvalitet jajnih ćelija. Kratak GnRHa protokol je za razliku od dugog GnRHa protokola omogućio fiziološki raspon vrednosti NO u FT a u okviru kojeg postoji pozitivna korelacija između nivoa NO u serumu nakon KOS i broja dobijenih oocita, dobijenog broja kvalitetnih oocita i broja dobijenih embriona tokom VTO. Zato se primena kratkog GnRHa protokola može smatrati favorizujućim faktorom za ostvarivanje željenih nivoa NO u serumu i FT nakon KOS, a samim tim i za važne ishode VTO kao što su broj dobijenih oocita, kvalitetnih oocita i embriona. Takođe, rezultati ove studije pokazuju da se sastav komponenti seruma menja tokom KOS i da se ta promena odražava na sastav FT i koncentracije hormona koji održavaju funkcionisanje ženskog reproduktivnog sistema. Uočene promene podržavaju našu pretpostavku da povećani NO može biti odgovoran za broj kvalitetnih oocita i loše ishode kod pacijentkinja koje su podvrgnute VTO. Stoga, praćenje nivoa NO tokom VTO može ukazivati na ishode KOS u procesu potpomognute reprodukcije.

U budućnosti je neophodno izvođenje studija koje bi uključile veliku populaciju infertilnih žena podvrgnutih procesu KOS u sklopu VTO, a da bi se postavljena hipoteza potvrđena rezultatima ove doktorske disertacije dopunila podacima vezanih za ulogu i uticaj NO na ishode VTO u različitim etiologijama infertiliteta, ali i da bi se utvrdilo zašto neki pacijenti podvrgnuti VTO proceduri imaju loš ishod lečenja uprkos povoljnim i optimističkim prognozama. Pretpostavka je da bi razumevanje procesa u toku VTO moglo usmeriti korišćenju nivoa NO kao

potencijalnog biomarkera za kvalitet oocita. Pored svega navedenog, pokazano je postojanje direktne veze između koncentracije NO u serumu i BMI, što su jasno pokazale brojne studije [284, 285], kao i negativna korelacija između BMI i fertiliteta žena [286]. Fokus budućih istraživanja bi trebalo da bude na evaluaciji uticaja BMI na nivoe NO i drugih potencijalnih biomarkera uspeha procedure VTO. Ovo bi bilo od velikog značaja imajući u vidu da se u drugim oblastima medicine dokazalo da biomarkeri određenih stanja, bolesti ili ishoda terapije u značajnoj meri zavise od telesne mase pojedinca, odnosno stepena uhranjenosti čoveka [287].

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih i prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Sprovedena je studija preseka, koja je obuhvatila 94 infertilna para podvrgnuta VTO proceduri. Primarni infertilitet u ispitivanoj populaciji je prisutan kod 73 (78%) ispitanice, a sekundarni kod 21 (22%), pri čemu je prosečno trajanje infertiliteta 5 (1-18) godina.

2. Grupe ispitanica su formirane na osnovu KOS, koja je sprovedena primenom dva protokola: dugim (n=35) i kratkim (n=59). Prosečno trajanje KOS kod primene dugog protokola je 11.5, a kod kratkog protokola 10 dana i statistički se razlikovalo.

3. Posmatrajući ispitivanu populaciju, prosečni nivoi serumskog E2 su 7726 ± 3232 pmol/L, serumskog NO pre KOS 126.80 ± 112.16 μ M, odnosno nakon KOS je 130.55 ± 91.16 μ M, dok je u FT 305.57 ± 101.09 μ M. Statistički, nivoi serumskog E2 su viši kod ispitanica stimulisanih dugim protokolom, dok su nivoi serumskog NO pre i nakon KOS, kao i u FT viši kod ispitanica stimulisanih kratkim protokolom. Nezavisno od protokola KOS, nivoi serumskog NO pokazuju trend porasta u odnosu na nivoe pre KOS.

5. Prosečan broj aspiriranih jajnih ćelija je 8 ± 4 , dok je broj kvalitetnih jajnih ćelija 6 ± 4 . Prosečan broj dobijenih i kvalitetnih embriona je 5 ± 3 odnosno 3, dok je broj vraćenih embriona 2 ± 1 . Regstruje se prevaga u broju ispitanica tretiranih dugim protokolom u pogledu praćenih karakteristika jajnih ćelija i embriona.

6. Biohemijska trudnoća je registrovana kod 46 (49%) ispitanica, koja je kod 38 (40%) ispitanica klinički i ultrazvučno potvrđena i pri čemu su detektovane 4 (4%) ektopične trudnoće. U daljem praćenju, 30 (32%) ispitanica je donelo na svet novorođenče. Dok je učestalost biohemijskih trudnoća granično statistički viša u populaciji ispitanica stimulisanih dugim protokolom, nije bilo razlika u učestalosti kliničkih trudnoća i kliničkih trudnoća nakon 12 nedelje gestacije, kao i porođaja međugrupama ispitanica.

7. U ispitivanoj populaciji se registruje značajna negativna korelacija između serumskog NO pre KOS, nivoa NO post KOS i nivoa NO u FT sa vrednostima serumskog E2 merenog na dan triggera. Isto tako, registruje se značajna korelacija između nivoa serumskog NO posle KOS i nivoa NO u FT u celokupnoj populaciji ispitanica.

8. Nivo serumskog E2 značajno pozitivno utiče na broj jajnih ćelija u opštoj populaciji i unutargrupno, kao i na broj kvalitetnih jajnih ćelija, broj dobijenih embriona i na broj kvalitetnih embriona u opštoj populaciji i populaciji žena podvrgnutih kratkom protokolu KOS. Međutim, nije dokazana značajna povezanost serumskog NO pre i posle KOS, kao i nivoa NO u FT sa posmatranim karakteristikama jajnih ćelija i embriona.

9. Nije dokazan statistički značajan uticaj serumskih i biomarkera FT (nivo serumskog E2, serumski NO pre i nakon KOS, NO u FT) na praćene ishode trudnoće (nastanak biohemijske, kliničke trudnoće, kliničke trudnoće nakon 12NG) i porođaj.

10. Analizirajući unutargrupne korelacije, kod ispitanica stimulisanih dugim protokolom nivo serumskog NO pre KOS pozitivno korelira sa nivoima serumskog NO nakon KOS i NO FT. Takođe, beleži se pozitivna korelacija nivoa serumskog NO posle KOS sa nivoom NO u FT. S druge strane, kod ispitanica stimulisanih kratkim protokolom dokazane su pozitivne korelacije nivoa serumskog NO pre KOS sa nivoima serumskog NO nakon KOS i NO u FT.

11. U pogledu korelacija praćenih serumskih i biomarkera FT sa karakteristikama jajnih ćelija i embriona, kod ispitanica stimulisanih dugim protokolom se registruje značajan pozitivan uticaj nivoa serumskog E2 na broj jajnih ćelija, ali ne i na ostale praćene karakteristike jajnih ćelija i embriona. Pored toga, nije dokazan statistički uticaj nivoa serumskog NO pre i posle KOS, kao i nivoa NO u FT na posmatrane karakteristike jajnih ćelija i embriona.

12. Kod ispitanica stimulisanih kratkim protokolom, pored pozitivnog uticaja nivoa serumskog E2 na broj jajnih ćelija, registruje se i njegov pozitivan uticaj na broj kvalitetnih jajnih ćelija, kao i na brojeve dobijenih, kvalitetnih i vraćenih embriona. Isto tako, beleži se pozitivan uticaj nivoa serumskog NO nakon KOS na broj jajnih ćelija, broj kvalitetnih jajnih ćelija i broj dobijenih embriona. Pored toga, nije dokazana povezanost serumskog NO pre KOS i nivoa NO u FT sa posmatranim karakteristikama jajnih ćelija i embriona.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju postojanje jasne veze između nivoa NO u FT i serumu nakon KOS i između nivoa NO u serumu nakon KOS i broja kvalitetnih oocita dobijenih tokom VTO. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se sastav komponenti seruma menja tokom KOS i da se ta promena odražava na sastav FT kao i koncentracije hormona koji održavaju funkcionisanje ženskog reproduktivnog sistema. Na osnovu dobijenih rezultat može se sugerisati da povećani NO može biti odgovoran za broj kvalitetnih oocita i loše ishode kod pacijenata koji su podvrgnuti VTO, tako da praćenje nivoa NO tokom VTO može ukazivati na ishode KOS u trenutnim primenjenim programima potpomognute reprodukcije.

Ova doktorska disertacija ima ograničenje u smislu što nismo imali konkretne informacije o nitratima dobijenim iz hrane. Zasićurno su potrebne buduće studije na većem uzorku populacije da bi se potvrdila predložena hipoteza i dokazala uloga NO u VTO i utvrdilo zašto imamo pacijente koji se podvrgavaju VTO sa lošim ishodima. Ovakva istraživanja bi potvrdila da li nivo NO može biti novi potencijalni marker za kvalitet oocita. Pored toga, postojanje direktne veze između koncentracija NO u serumu i indeksa telesne mase (BMI) je dokazano od strane nekoliko autora [284, 285], a pokazano je i postojanje negativne korelacije između BMI i fertiliteta žena [286]. Buduća istraživanja bi trebalo da razmotre kako BMI utiče na nivoe ovog i drugih mogućih biomarkera tokom VTO procesa.

7. LITERATURA

- [1] WHO. Infertility. Dostupno na internet stranici: https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1. 2020.
- [2] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and sterility* 2017; 108: 393-406.
- [3] ESHRE. European Society of Human Reproduction and Embryology. A policy audit on fertility: Analysis of 9 EU countries. Dostupno na internet strani: <https://www.eshre.eu/Press-Room/Resources>. 2017.
- [4] AMA. American Medical Association backs global health experts in calling infertility a disease. Dostupno na internet strani: <https://wire.ama-assn.org/ama-news/ama-backs-global-health-experts-calling-infertility-disease>. 2018.
- [5] Missmer SA, Abusief ME, Barbieri RL, Goldman MB. Chapter 17 - Infertility. In: Goldman MB, Troisi R, Rexrode KM, editors. *Women and Health (Second Edition)*: Academic Press; 2013. p. 251-70.
- [6] Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Human reproduction update* 2011; 17: 575-88.
- [7] Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry* 2018; 62: 2-10.
- [8] Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility* 2020; 113: 533-5.
- [9] NCCWHC. (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health). Fertility assessment and treatment for people with fertility problems. London: Royal College of Obstetrician and Gynaecologists. Dostupno na internet stranici: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/evidence/full-guideline-pdf-188539453>. 2013.
- [10] Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine* 2012; 9: e1001356.
- [11] Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update* 2015; 21: 411-26.
- [12] Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *Jama* 2021; 326: 65-76.
- [13] Rutstein S, Shah I. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. DHS Comparative Reports No. 9. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2004.
- [14] Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 2007; 22: 1506-12.
- [15] Nachtigall RD. International disparities in access to infertility services. *Fertility and sterility* 2006; 85: 871-5.

- [16] Mitić D, Kopitović V, Popović J, Milatović S, Basić M, Milojević M. [Results of in vitro fertilization cycles at the Clinic for Gynecology and Obstetrics, Clinical Center of Nis]. *Medicinski preglad* 2012; 65: 315-8.
- [17] Kopitović V, Milatović S, Pjević AT, Bjelica A, Bujas I, Tabs N. [Results and experiences after 1000 IVF cycles at the Clinic for Gynecology and Obstetrics in Novi Sad]. *Medicinski preglad* 2011; 64: 565-9.
- [18] Vollset SE, Goren E, Yuan CW, et al. Fertility, mortality, migration, and population scenarios for 195 countries and territories from 2017 to 2100: a forecasting analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England)* 2020; 396: 1285-306.
- [19] Jones H, Cooke I, R. K, Brinsden P, Saunders D. International Federation of Fertility Societies: Surveillance 2010. Dostupno na internet stranici: www.iffs-reproduction.org/documents/IFFS_Surveillance_2010.pdf 2010.
- [20] Collins JA. An international survey of the health economics of IVF and ICSI. *Human reproduction update* 2002; 8: 265-77.
- [21] Jones HW, Jr., Cohen J. IFFS surveillance 07. *Fertility and sterility* 2007; 87: S1-67.
- [22] Werner R, Mönig I, Lünstedt R, et al. New NR5A1 mutations and phenotypic variations of gonadal dysgenesis. 2017; 12: e0176720.
- [23] Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *American journal of human genetics* 2010; 87: 505-12.
- [24] Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Human reproduction update* 2000; 6: 122-31.
- [25] Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human reproduction (Oxford, England)* 2011; 26: 1628-40.
- [26] Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Current diabetes reviews* 2014; 10: 147-57.
- [27] Tersigni C, Castellani R, de Waure C, et al. Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Human reproduction update* 2014; 20: 582-93.
- [28] Reichman DE, White PC, New MI, Rosenwaks Z. Fertility in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Fertility and sterility* 2014; 101: 301-9.
- [29] van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Human reproduction update* 2011; 17: 605-19.
- [30] Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, et al. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reproductive biomedicine online* 2008; 16: 842-50.
- [31] Brazdova A, Senechal H, Peltre G, Poncet P. Immune Aspects of Female Infertility. *International journal of fertility & sterility* 2016; 10: 1-10.
- [32] Lee D, Kim SK, Lee JR, Jee BC. Management of endometriosis-related infertility: Considerations and treatment options. *Clinical and experimental reproductive medicine* 2020; 47: 1-11.
- [33] Bala R, Singh V, Rajender S. Environment, Lifestyle, and Female Infertility. 2021; 28: 617-38.
- [34] Kiconco S, Teede HJ, Azziz R, Norman RJ, Joham AE. The Need to Reassess the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Review of Diagnostic

- Recommendations from the International Evidence-Based Guideline for the Assessment and Management of PCOS. *Seminars in reproductive medicine* 2021; 39: 71-7.
- [35] Mishail A, Marshall S, Schulsinger D, Sheynkin Y. Impact of a second semen analysis on a treatment decision making in the infertile man with varicocele. *Fertility and sterility* 2009; 91: 1809-11.
- [36] Avidor-Reiss T, Khire A, Fishman EL, Jo KH. Atypical centrioles during sexual reproduction. *Frontiers in cell and developmental biology* 2015; 3: 21.
- [37] D'Souza UJ. Effect of tamoxifen on spermatogenesis and tubular morphology in rats. *Asian journal of andrology* 2004; 6: 223-6.
- [38] Hossain F, Ali O, D'Souza UJ, Naing DK. Effects of pesticide use on semen quality among farmers in rural areas of Sabah, Malaysia. *Journal of occupational health* 2010; 52: 353-60.
- [39] Altmäe S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, et al. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertility and sterility* 2010; 94: 130-7.
- [40] Aston KI, Uren PJ, Jenkins TG, et al. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertility and sterility* 2015; 104: 1388-97.e1-5.
- [41] Mustafa M, Sharifa A, Hadi J, Iizam E, Aliya S. Male and Female Infertility: Causes, And Management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 2019; 18: 27-32.
- [42] WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Publisher World Health Organization. 2021: p. 276.
- [43] Dabaja AA, Schlegel PN. Medical treatment of male infertility. *Translational andrology and urology* 2014; 3: 9-16.
- [44] Tinneberg H-R, Gasbarrini A. Infertility today: The management of female medical causes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2013; 123: S25-S30.
- [45] Chambers GM, Paul RC, Harris K, et al. Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand: cumulative live birth rates as measures of success. *The Medical journal of Australia* 2017; 207: 114-8.
- [46] Robson SJ, de Costa CM. Assisted reproductive technologies: new guidance for women and doctors is welcome. *The Medical journal of Australia* 2017; 207: 111-2.
- [47] Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction (Oxford, England)* 2017; 32: 1957-73.
- [48] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)* 1978; 2: 366.
- [49] Rašević M, Sedlecky K. Infertility and assisted reproductive technologies in Serbia. *Stanovnistvo* 2022; 60: 19-36.
- [50] Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Human reproduction (Oxford, England)* 2011; 26: 2593-7.
- [51] Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertility and sterility* 2017; 107: 1122-9.
- [52] Choe J, Archer J, Shanks A. In Vitro Fertilization. *StatPearls [Internet]*. 2021.
- [53] Minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies: a committee opinion. *Fertility and sterility* 2020; 113: 536-41.
- [54] Liu Y, Jones C, Coward K. The Current Practice of Assisted Hatching for Embryos in Fertility Centres: a General Survey. 2022; 29: 2664-73.

- [55] Piersanti V, Consalvo F, Signore F, Del Rio A, Zaami S. Surrogacy and "Procreative Tourism". What Does the Future Hold from the Ethical and Legal Perspectives? *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2021; 57.
- [56] Zhao Y, Brezina P, Hsu CC, Garcia J, Brinsden PR, Wallach E. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1810: 843-52.
- [57] Bhatt T, Baibergenova A. A comparison of the cost-effectiveness of in vitro fertilization strategies and stimulated intrauterine insemination in a Canadian health economic model. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC* 2008; 30: 411-20.
- [58] Eftekhar M, Mohammadian F, Yousefnejad F, Molaei B, Aflatoonian A. Comparison of conventional IVF versus ICSI in non-male factor, normoresponder patients. *Iranian journal of reproductive medicine* 2012; 10: 131-6.
- [59] Chang MC. Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature* 1959; 184: 466-7.
- [60] Van Steirteghem AC, Smits J, Camus M, et al. The luteal phase after in-vitro fertilization and related procedures. *Human reproduction (Oxford, England)* 1988; 3: 161-4.
- [61] Jovanović R, Rakonjac V. Prikaz odnosa broja rođenih beba na teritoriji Republike Srbije u toku 2019. godine iz prirodnog začeća i postupaka BMPO. *Glasnik* 2020; 12: 27-30.
- [62] Gallos ID, Eapen A, Price MJ, et al. Controlled ovarian stimulation protocols for assisted reproduction: a network meta-analysis: *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Mar 9;2017(3):CD012586. doi: 10.1002/14651858.CD012586. eCollection 2017 Mar.
- [63] Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human reproduction update* 2017; 23: 660-80.
- [64] Bing Y, Ouellette RJ. Fertilization in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2009; 550: 251-66.
- [65] Geary S, Moon YS. The human embryo in vitro: recent progress. *The Journal of reproductive medicine* 2006; 51: 293-302.
- [66] Pierce N, Mocanu E. Female age and assisted reproductive technology. *Global Reproductive Health* 2018; 3: e9.
- [67] Revelli A, Casano S, Salvagno F, Delle Piane L. Milder is better? Advantages and disadvantages of "mild" ovarian stimulation for human in vitro fertilization. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2011; 9: 25.
- [68] MacDougall MJ, Tan SL, Jacobs HS. In-vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)* 1992; 7: 597-600.
- [69] In vitro fertilization and multiple pregnancies: an evidence-based analysis. *Ontario health technology assessment series* 2006; 6: 1-63.
- [70] Hu L, Du J, Lv H, et al. Influencing factors of pregnancy loss and survival probability of clinical pregnancies conceived through assisted reproductive technology. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2018; 16: 74.
- [71] Howie R, Kay V. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)* 2018; 79: 194-9.

- [72] Nastri CO, Teixeira DM, Moroni RM, Leitão VM, Martins WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, staging, prediction and prevention. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2015; 45: 377-93.
- [73] Petrač L. Analози gonadotropin oslobađajućeg hormona u humanoј reprodukciji. Doctoral dissertation, University of Zagreb 2015.
- [74] Castillo JC, Humaidan P, Bernabéu R. Pharmaceutical options for triggering of final oocyte maturation in ART. *BioMed research international* 2014; 2014: 580171.
- [75] Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *The Cochrane database of systematic reviews* 2016; 4: Cd001750.
- [76] Ata B, Seli E. Strategies for Controlled Ovarian Stimulation in the Setting of Ovarian Aging. *Seminars in reproductive medicine* 2015; 33: 436-48.
- [77] Franco JG, Jr., Baruffi RL. Introduction to methods for collecting human gametes in assisted reproduction. *Reproductive biomedicine online* 2002; 5: 187-97.
- [78] Wang X, Wang W, Qu Q, Zhang N, Hao C, Ma D. Effect of large follicle puncture on IVF-ET outcome in patients with unsynchronized follicle maturation. *Can. J. Obstet. Gynecol.* 2019; 47: 2056-66.
- [79] World Health O. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
- [80] Hourvitz A, Lerner-Geva L, Elizur SE, et al. Role of embryo quality in predicting early pregnancy loss following assisted reproductive technology. *Reproductive biomedicine online* 2006; 13: 504-9.
- [81] Okun N, Sierra S. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC* 2014; 36: 64-83.
- [82] Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human reproduction update* 2009; 15: 573-85.
- [83] Broekmans FJ. Testing for Ovarian Reserve in Assisted Reproduction programs: the current point of view. *Facts, views & vision in ObGyn* 2009; 1: 79-87.
- [84] Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertility and sterility* 2015; 103: 317-22.
- [85] Santonocito M, Guglielmino MR, Vento M, et al. The apoptotic transcriptome of the human MII oocyte: characterization and age-related changes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2013; 18: 201-11.
- [86] Llonch S, Barragán M. Single human oocyte transcriptome analysis reveals distinct maturation stage-dependent pathways impacted by age. *PLoS One* 2021; 20: e13360.
- [87] Jiao ZX, Xu M, Woodruff TK. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: potential markers of oocyte competence. *Fertility and sterility* 2012; 98: 480-6.
- [88] Depmann M, Faddy MJ, van der Schouw YT, et al. The Relationship Between Variation in Size of the Primordial Follicle Pool and Age at Natural Menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2015; 100: E845-51.
- [89] Skiadas CC, Duan S, Correll M, et al. Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells. *Molecular human reproduction* 2012; 18: 362-71.

- [90] Grande M, Borobio V, Jimenez JM, et al. Antral follicle count as a marker of ovarian biological age to reflect the background risk of fetal aneuploidy. *Human reproduction* (Oxford, England) 2014; 29: 1337-43.
- [91] Hoshino Y. Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index. *Reproductive medicine and biology* 2018; 17: 434-41.
- [92] Balaban B, Barut T, Urman B. Assessment of Oocyte Quality. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*. New York, NY: Springer New York; 2012. p. 105-19.
- [93] Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, fertility, and development* 2007; 19: 1-12.
- [94] Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1034: 132-44.
- [95] Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive biomedicine online* 2006; 12: 507-12.
- [96] Navarro PA, de Araújo MM, de Araújo CM, Rocha M, dos Reis R, Martins W. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2009; 104: 226-9.
- [97] Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive biomedicine online* 2007; 14: 40-8.
- [98] De Santis L, Cino I, Rabellotti E, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reproductive biomedicine online* 2005; 11: 36-42.
- [99] Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive biomedicine online* 2007; 14: 166-74.
- [100] Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* (Oxford, England) 1998; 13: 3425-30.
- [101] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and sterility* 2001; 75: 348-53.
- [102] Ruebel ML, Schall PZ, Midic U, et al. Transcriptome analysis of rhesus monkey failed-to-mature oocytes: deficiencies in transcriptional regulation and cytoplasmic maturation of the oocyte mRNA population. *Molecular human reproduction* 2018; 24: 478-94.
- [103] Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T, Skutella T. Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or in vitro. *BioMed research international* 2013; 2013: 879489.
- [104] Grøndahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Human reproduction* (Oxford, England) 2010; 25: 957-68.

- [105] O'Shea LC, Mehta J, Lonergan P, Hensey C, Fair T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. *Systems biology in reproductive medicine* 2012; 58: 88-101.
- [106] Biase FH, Everts RE, Oliveira R, et al. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. *Zygote (Cambridge, England)* 2014; 22: 69-79.
- [107] Hamatani T, Falco G, Carter MG, et al. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human molecular genetics* 2004; 13: 2263-78.
- [108] Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, et al. Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes & development* 2006; 20: 2713-27.
- [109] Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, Dogan B. Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Systems biology in reproductive medicine* 2019; 65: 39-47.
- [110] Montani DA, Braga D. Understanding mechanisms of oocyte development by follicular fluid lipidomics. 2019; 36: 1003-11.
- [111] Shen X, Liu X, Zhu P, et al. Proteomic analysis of human follicular fluid associated with successful in vitro fertilization. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2017; 15: 58.
- [112] Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *The International journal of developmental biology* 2012; 56: 799-808.
- [113] Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology* 2005; 279: 20-30.
- [114] Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of cell science* 2007; 120: 1330-40.
- [115] Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertility and sterility* 2005; 83 Suppl 1: 1169-79.
- [116] Hamel M, Dufort I, Robert C, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human reproduction (Oxford, England)* 2008; 23: 1118-27.
- [117] Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Molecular human reproduction* 2008; 14: 711-9.
- [118] Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PloS one* 2010; 5: e8772.
- [119] Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997; 82: 3748-51.
- [120] Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental biology* 1976; 50: 531-6.
- [121] Holesh JE, Bass AN, Lord M. *Physiology, Ovulation*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

- [122] Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive biomedicine online* 2007; 15: 326-37.

- [123] Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and cellular endocrinology* 1998; 145: 47-54.
- [124] Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews* 2009; 30: 624-712.
- [125] Gilbert S. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>. 2000.
- [126] Zhang M, Xia G. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012; 69: 1279-88.
- [127] Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of cell science* 2006; 119: 3811-21.
- [128] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update* 2008; 14: 159-77.
- [129] Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. *Biology of reproduction* 2016; 94: 16.
- [130] Do DV, Strauss B, Cukuroglu E, et al. SRSF3 maintains transcriptome integrity in oocytes by regulation of alternative splicing and transposable elements. *Cell Discovery* 2018; 4: 33.
- [131] Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-61.
- [132] Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human molecular genetics* 2007; 16 Spec No. 2: R203-8.
- [133] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71: 836-48.
- [134] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- [135] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- [136] Rivero A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in parasitology* 2006; 22: 219-25.
- [137] Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science* 2001; 65: 1-16.
- [138] Zullino S, Buzzella F, Simoncini T. Nitric oxide and the biology of pregnancy. *Vascular pharmacology* 2018; 110: 71-4.
- [139] Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Current pharmaceutical design* 2003; 9: 419-25.
- [140] Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax* 2005; 60: 265-7.
- [141] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 2012; 33: 829-37, 37a-37d.
- [142] Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological reviews* 2004; 84: 731-65.
- [143] Strasen J, Ritter O. Role of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Trends in cardiovascular medicine* 2011; 21: 58-63.

- [144] Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1993; 9: 371-7.
- [145] Anavi S, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free radical biology & medicine* 2020; 146: 16-35.
- [146] Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113: 1708-14.
- [147] Dawson TM, Dawson VL. Nitric Oxide Signaling in Neurodegeneration and Cell Death. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* 2018; 82: 57-83.
- [148] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in neurobiology* 2001; 64: 51-68.
- [149] Sanders DB, Kelley T, Larson D. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion* 2000; 15: 97-104.
- [150] Zaragoza C, Soria E, López E, et al. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Molecular pharmacology* 2002; 62: 927-35.
- [151] Luo Y, Zhu Y, Basang W, Wang X, Li C, Zhou X. Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. *Frontiers in endocrinology* 2021; 12: 752410.
- [152] Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochemical and biophysical research communications* 1994; 202: 1543-52.
- [153] Bonello N, McKie K, Jasper M, et al. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biology of reproduction* 1996; 54: 436-45.
- [154] Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Current opinion in nephrology and hypertension* 1997; 6: 88-105.
- [155] Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human reproduction update* 1998; 4: 3-24.
- [156] Kol S, Ben-Shlomo I, Ruutiainen K, et al. The midcycle increase in ovarian glucose uptake is associated with enhanced expression of glucose transporter 3. Possible role for interleukin-1, a putative intermediary in the ovulatory process. *J Clin Invest* 1997; 99: 2274-83.
- [157] Tabraue C, Diaz Peñate R, Gallardo G, et al. Induction of guanosine triphosphate-cyclohydrolase by follicle-stimulating hormone enhances interleukin-1 beta-stimulated nitric oxide synthase activity in granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 162-8.
- [158] Sugino N, Takiguchi S, Ono M, et al. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Human reproduction (Oxford, England)* 1996; 11: 2484-7.
- [159] Anteby EY, Hurwitz A, Korach O, et al. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Human reproduction (Oxford, England)* 1996; 11: 1947-51.
- [160] Nath P, Maitra S. Physiological relevance of nitric oxide in ovarian functions: An overview. *General and comparative endocrinology* 2019; 279: 35-44.

- [161] Dutta S, Sengupta P. The Role of Nitric Oxide on Male and Female Reproduction. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS* 2022; 29: 18-30.
- [162] Budani MC, Tiboni GM. Novel Insights on the Role of Nitric Oxide in the Ovary: A Review of the Literature. 2021; 18.
- [163] Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135: 1799-806.
- [164] Kagabu S, Kodama H, Fukuda J, Karube A, Murata M, Tanaka T. Inhibitory effects of nitric oxide on the expression and activity of aromatase in human granulosa cells. *Molecular human reproduction* 1999; 5: 396-401.
- [165] Basini G, Tamanini C. Interrelationship between nitric oxide and prostaglandins in bovine granulosa cells. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2001; 66: 179-202.
- [166] Basini G, Grasselli F. Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. *Reproduction (Cambridge, England)* 2015; 150: R1-9.
- [167] Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews Molecular cell biology* 2013; 14: 141-52.
- [168] Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive biomedicine online* 2003; 6: 410-5.
- [169] Yamagata Y, Nakamura Y, Sugino N, et al. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. *Endocrine journal* 2002; 49: 219-26.
- [170] Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of reproduction* 2002; 67: 1588-92.
- [171] Jablonka-Shariff A, Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 2944-54.
- [172] Jablonka-Shariff A, Olson LM. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Molecular reproduction and development* 2000; 55: 412-21.
- [173] Pandey AN, Chaube SK. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured in vitro. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2015; 240: 15-25.
- [174] Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and cellular endocrinology* 2003; 207: 21-30.
- [175] Bu S, Xie H, Tao Y, Wang J, Xia G. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Molecular and cellular endocrinology* 2004; 223: 85-93.
- [176] Bilodeau-Goeseels S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. *Theriogenology* 2007; 68: 693-701.
- [177] Botigelli RC, Schwarz KL, Zaffalon FG, et al. Influence of nitric oxide and phosphodiesterases during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic resumption and embryo production. *Zygote (Cambridge, England)* 2017; 25: 321-30.
- [178] Tian Y, Ding Y, Liu J, et al. Nitric Oxide-Mediated Regulation of GLUT by T3 and Follicle-Stimulating Hormone in Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* 2017; 158: 1898-915.

- [179] Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Molecular reproduction and development* 2001; 58: 262-8.
- [180] Evidence for a nitric oxide-mediated modulation of equine granulosa cell steroidogenesis. *Theriogenology* 2002; 58: 579-83.
- [181] Tao Y, Xie H, Hong H, Chen X, Jang J, Xia G. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote (Cambridge, England)* 2005; 13: 1-9.
- [182] Kim H, Moon C, Ahn M, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *J Vet Sci* 2005; 6: 97-101.
- [183] Hess KA, Waltz SE, Toney-Earley K, Degen SJ. The receptor tyrosine kinase Ron is expressed in the mouse ovary and regulates inducible nitric oxide synthase levels and ovulation. *Fertility and sterility* 2003; 80 Suppl 2: 747-54.
- [184] McCosh RB, Lopez JA, Szeligo BM, et al. Evidence that Nitric Oxide Is Critical for LH Surge Generation in Female Sheep. *Endocrinology* 2020; 161.
- [185] Huang HF, Wang B, Yang XF, Luo Q, Sheng JZ. Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17beta-estradiol production in human granulosa cells. *Biology of reproduction* 2005; 72: 102-6.
- [186] Li J, Zhou W, Wang Y, Niu C. The dual role of cGMP in oocyte maturation of zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications* 2018; 499: 998-1003.
- [187] Yalçinkaya E, Cakıroğlu Y, Doğer E, Budak O, Cekmen M, Çalışkan E. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. *Journal of the Turkish German Gynecological Association* 2013; 14: 136-41.
- [188] Barrionuevo MJ, Schwandt RA, Rao PS, Graham LB, Maisel LP, Yeko TR. Nitric oxide (NO) and interleukin-1beta (IL-1beta) in follicular fluid and their correlation with fertilization and embryo cleavage. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2000; 44: 359-64.
- [189] Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertility and sterility* 1999; 72: 1024-6.
- [190] Pande M, Das GK, Khan FA, et al. Endometritis impairs luteal development, function, and nitric oxide and ascorbic acid concentrations in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Tropical animal health and production* 2013; 45: 805-10.
- [191] Grazul-Bilska AT, Bass CS, Kaminski SL, et al. Effects of plane of nutrition and arginine on ovarian follicles in non-pregnant sheep: Cell proliferation, and expression of endothelial nitric oxide and its receptor. *Acta histochemica* 2019; 121: 189-97.
- [192] Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2003; 8: d222-37.
- [193] Matsumi H, Yano T, Osuga Y, et al. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biology of reproduction* 2000; 63: 141-6.
- [194] Chen Q, Yano T, Matsumi H, et al. Cross-Talk between Fas/Fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 2005; 146: 808-15.

- [195] Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, et al. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction (Cambridge, England)* 2001; 122: 957-63.
- [196] Siamwala JH, Kumar P, Veeriah V, et al. Nitric Oxide Reverses the Position of the Heart during Embryonic Development. 2019; 20.
- [197] Bergandi L, Basso G, Evangelista F, et al. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reproductive Sciences* 2014; 21: 1370-7.
- [198] Jablonka-Shariff A, Olson L. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 460-8.
- [199] Jablonka-Shariff A, Olson L. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 2944-54.
- [200] Goud P, Goud A, Najafi T, et al. Direct real-time measurement of intra-oocyte nitric oxide concentration in vivo. *PloS one* 2014; 9: e98720.
- [201] Tamanini C, Basini G, Grasselli F, Tirelli M. Nitric oxide and the ovary. *Journal of Animal Science* 2003; 81: E1-E7.
- [202] Sela-Abramovich S, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of reproduction* 2008; 78: 1111-8.
- [203] Kim BH, Kim CH, Jung KY, Jeon BH, Ju EJ, Choo YK. Involvement of nitric oxide during in vitro fertilization and early embryonic development in mice. *Archives of pharmacal research* 2004; 27: 86-93.
- [204] Santana PD, Silva TV, da Costa NN, et al. Supplementation of bovine embryo culture medium with L-arginine improves embryo quality via nitric oxide production. *Molecular reproduction and development* 2014; 81: 918-27.
- [205] Barroso RP, Osuamkpe C, Nagamani M, Yallampalli C. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Molecular human reproduction* 1998; 4: 503-7.
- [206] Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertility and sterility* 2001; 75: 1163-71.
- [207] Battaglia C, Ciotti P, Notarangelo L, Fratto R, Facchinetti F, de Aloysio D. Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2003; 20: 449-54.
- [208] Lipari CW, Garcia JE, Zhao Y, Thrift K, Vaidya D, Rodriguez A. Nitric oxide metabolite production in the human preimplantation embryo and successful blastocyst formation. *Fertility and sterility* 2009; 91: 1316-8.
- [209] Ohl J, Lefèbvre-Maunoury C, Wittemer C, Nisand G, Laurent MC, Hoffmann P. Nitric oxide donors for patients undergoing IVF. A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002; 17: 2615-20.
- [210] Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2000; 17: 222-8.
- [211] Lee TH, Wu MY, Chen MJ, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility* 2004; 82: 126-31.

- [212] Vignini A, Turi A, Giannubilo SR, et al. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: the relationship to embryo grading. *Archives of gynecology and obstetrics* 2008; 277: 229-32.
- [213] Bergandi L, Basso G, Evangelista F, et al. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 2014; 21: 1370-7.
- [214] Staicu FD, Martínez-Soto JC, Canovas S. Nitric oxide-targeted protein phosphorylation during human sperm capacitation. 2021; 11: 20979.
- [215] Sharma A, Shrivastava D. Psychological Problems Related to Infertility. *Cureus* 2022; 14: e30320.
- [216] Bourrion B, Panjo H, Bithorel PL, de La Rochebrochard E, François M, Pelletier-Fleury N. The economic burden of infertility treatment and distribution of expenditures overtime in France: a self-controlled pre-post study. *BMC Health Serv Res* 2022; 22: 512.
- [217] Adekunle L. Infertility: a sociological analysis of problems of infertility among women in a rural community in Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 2002; 31: 263-6.
- [218] Katsani D, Paraschou N, Panagouli E, et al. Social Egg Freezing-A Trend or Modern Reality? *J Clin Med* 2024; 13.
- [219] Zhao Y, Fu H. Social Egg Freezing for Single Women in China: Legal and Ethical Controversies. *Risk Manag Healthc Policy* 2023; 16: 2379-89.
- [220] Chin AHB, Muhsin SM, Ahmad MF. Islamic Perspectives on Elective Ovarian Tissue Freezing by Single Women for Non-medical or Social Reasons. *Asian Bioethics Review* 2023; 15: 335-49.
- [221] Mol BW, Tjon-Kon-Fat R, Kamphuis E, van Wely M. Unexplained infertility: Is it over-diagnosed and over-treated? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2018; 53: 20-9.
- [222] Amaral MEB, Ejzenberg D, Wajman DS, et al. Risk factors for inadequate response to ovarian stimulation in assisted reproduction cycles: systematic review. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2019; 36: 19-28.
- [223] Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and sterility* 2000; 73: 1155-8.
- [224] Basile N, Vime P, Florensa M, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Human reproduction (Oxford, England)* 2015; 30: 276-83.
- [225] Pallisco R, Lazzarino G, Bilotta G, et al. Metabolic Signature of Energy Metabolism Alterations and Excess Nitric Oxide Production in Culture Media Correlate with Low Human Embryo Quality and Unsuccessful Pregnancy. *Int J Mol Sci* 2023; 24.
- [226] Perovic MD, Sudar-Milovanovic EM, Simonovic ED, et al. Hypothesis regarding the effects of gonadotropins on the level of free fatty acids and phospholipids in serum and follicular fluid during controlled ovarian stimulation. *Med Hypotheses* 2019; 123: 30-4.
- [227] Rostamzadeh A, Ahmadi R, Heydari M, Raoofi A. Effects of nitric oxide on reproductive organs and related physiological processes. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2020; 9: 159.
- [228] Thabane L, Ma J, Chu R, et al. A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC Med Res Methodol* 2010; 10: 1.

- [229] Radakovic-Cosic J, Mikovic Z, Mandic-Rajcevic S, et al. Does controlled ovarian stimulation during in vitro fertilization affect the level of nitric oxide a potential indicator of oocyte quality? . *Medical Hypotheses* 2023; 174: 111061.
- [230] Halpern SD, Karlawish JH, Berlin JA. The continuing unethical conduct of underpowered clinical trials. *Jama* 2002; 288: 358-62.
- [231] Purandare N, Emerson G, Kirkham C, Harrity C, Walsh D, Mocanu E. The duration of gonadotropin stimulation does not alter the clinical pregnancy rate in IVF or ICSI cycles. *Ir J Med Sci* 2017; 186: 653-7.
- [232] Martin JR, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D. Impact of duration and dose of gonadotrophins on IVF outcomes. *Reproductive biomedicine online* 2006; 13: 645-50.
- [233] Dahdouh EM, Gomes FL, Granger L, et al. Is the flexible GnRH antagonist protocol better suited for fresh eSET cycles? *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC* 2014; 36: 885-91.
- [234] Marci R, Caserta D, Lisi F, et al. In vitro fertilization stimulation protocol for normal responder patients. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 109-12.
- [235] Lashen H, Ledger W, López Bernal A, Evans B, Barlow D. Superovulation with a high gonadotropin dose for in vitro fertilization: is it effective? *Journal of assisted reproduction and genetics* 1998; 15: 438-43.
- [236] Grow D, Kawwass JF, Kulkarni AD, Durant T, Jamieson DJ, Macaluso M. GnRH agonist and GnRH antagonist protocols: comparison of outcomes among good-prognosis patients using national surveillance data. *Reproductive biomedicine online* 2014; 29: 299-304.
- [237] Daya S, Gunby J. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. *The Cochrane database of systematic reviews* 2000: Cd002810.
- [238] Romero-Aguirregomezcorta J, Santa Á P, García-Vázquez FA, Coy P, Matás C. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition during porcine in vitro maturation modifies oocyte protein S-nitrosylation and in vitro fertilization. *PloS one* 2014; 9: e115044.
- [239] Romero-Aguirregomezcorta J, Soriano-Úbeda C, Matás C. Involvement of nitric oxide during in vitro oocyte maturation, sperm capacitation and in vitro fertilization in pig. *Research in veterinary science* 2021; 134: 150-8.
- [240] Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biology of reproduction* 2003; 68: 1538-44.
- [241] Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Abu-Soud HM. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry* 2005; 44: 11361-8.
- [242] Staicu FD, Canha-Gouveia A, Soriano-Úbeda C, et al. Nitrite and Nitrate Levels in Follicular Fluid From Human Oocyte Donors Are Related to Ovarian Response and Embryo Quality. *Frontiers in cell and developmental biology* 2021; 9: 647002.
- [243] Sudarma V, Sukmaniah S, Siregar P. Effect of dark chocolate on nitric oxide serum levels and blood pressure in prehypertension subjects. *Acta Med Indones* 2011; 43: 224-8.
- [244] Kiani AK, Bonetti G, Medori MC, et al. Dietary supplements for improving nitric-oxide synthesis. *J Prev Med Hyg* 2022; 63: E239-e45.
- [245] Arefirad T, Seif E, Sepidarkish M, et al. Effect of exercise training on nitric oxide and nitrate/nitrite (NOx) production: A systematic review and meta-analysis. *Front Physiol* 2022; 13: 953912.

- [246] Gryka D, Pilch WB, Czerwińska-Ledwig OM, Piotrowska AM, Klocek E, Bukova A. The influence of Finnish sauna treatments on the concentrations of nitric oxide, 3-nitrotyrosine and selected markers of oxidative status in training and non-training men. *Int J Occup Med Environ Health* 2020; 33: 173-85.
- [247] Ghasemi A, Syedmoradi L, Momenan AA, Zahediasl S, Azizi F. The influence of cigarette and qalyan (hookah) smoking on serum nitric oxide metabolite concentration. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70: 116-21.
- [248] Rachmawati E, Riskiyana R. Sleep insufficiency influence on nitric oxide concentration and systolic blood pressure in medical students. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. . 2020; 16: 17-22.
- [249] Zolti M, Bider D, Seidman DS, Mashiach S, Ben-Rafael Z. Cytokine levels in follicular fluid of polycystic ovaries in patients treated with dexamethasone. *Fertility and sterility* 1992; 57: 501-4.
- [250] Cicinelli E, Ignarro LJ, Lograno M, Galantino P, Balzano G, Schonauer LM. Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle. *Fertility and sterility* 1996; 66: 1036-8.
- [251] Mihm M, Austin EJ, Good TE, et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction* 2000; 63: 811-9.
- [252] Anahory T, Dechaud H, Bennes R, Marin P, Lamb NJ, Laoudj D. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. *Electrophoresis* 2002; 23: 1197-202.
- [253] Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002; 17: 1017-22.
- [254] Dave S, Farrance D, Whitehead S. Evidence that nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Clinical Science* 1997; 92: 277-84.
- [255] Ciccimarra R, Bussolati S, Grasselli F, Grolli S, Paolucci M, Basini G. Potential physiological involvement of nesfatin-1 in regulating swine granulosa cell functions. *Reproduction, fertility, and development* 2020; 32: 274-83.
- [256] Nishie T, Kobayashi Y, Kimura K, Okuda K. Acute stimulation of a smooth muscle constrictor by oestradiol-17 β via GPER1 in bovine oviducts. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 326-32.
- [257] Powers RW, Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Gonadotropin-stimulated regulation of blood-follicle barrier is mediated by nitric oxide. *The American journal of physiology* 1995; 269: E290-8.
- [258] Naafia S, Razzaque W, Rao M, Hussain K. Nitric oxide profiles in serum and follicular fluid of cyclic and acyclic sheep. . *Journal of Research and Development* 2011; 11: 119-28.
- [259] Gündüz M, Turna Ö, Uçmak M, et al. Correlation between the serum and follicular fluid vascular endothelial growth factor A and nitric oxide levels and follicular vascularity in Arabian mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 2014; 34: 145-6.
- [260] Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Current pharmaceutical design* 2003; 9: 399-409.
- [261] Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 1993; 191: 503-8.

- [262] Kaneto H, Fujii J, Seo HG, et al. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1995; 44: 733-8.
- [263] Knobil E. Knobil and Neill's physiology of reproduction: Gulf Professional Publishing; 2006.
- [264] Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, et al. Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)* 2001; 16: 1334-9.
- [265] Ahmed TA, Ahmed SM, El-Gammal Z, et al. Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. *Advances in experimental medicine and biology* 2020; 1247: 109-23.
- [266] Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2009; 7: 40.
- [267] Leroy JL, Valckx SD, Jordaens L, et al. Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical views on what we learned from the dairy cow model. *Reproduction, fertility, and development* 2015; 27: 693-703.
- [268] Thibault C, Szollosi D, Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, nutrition, developpement* 1987; 27: 865-96.
- [269] Carpintero NL, Suárez OA, Mangas CC, Varea CG, Rioja RG. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2014; 7: 187-93.
- [270] Wiweko B, Anggraheni U, Mansyur E, et al. Serum AMH level predicts oocytes quality better than follicular fluid AMH level. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2016; 5: 361-4.
- [271] Ozgur K, Bulut H, Berkkanoglu M, Coetzee K, Ay S. Oocyte maturation-index as measure of oocyte cohort quality; a retrospective analysis of 3135 ICSI cycles. *Middle East Fertility Society Journal* 2015; 20: 37-42.
- [272] Lin Y, Yang P, Chen Y, Zhu J, Zhang X, Ma C. Factors inducing decreased oocyte maturation rate: a retrospective analysis of 20,939 ICSI cycles. *Archives of gynecology and obstetrics* 2019; 299: 559-64.
- [273] Ullah K, Rahman TU, Pan HT, et al. Serum estradiol levels in controlled ovarian stimulation directly affect the endometrium. *J Mol Endocrinol* 2017; 59: 105-19.
- [274] Sowers MR, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow SD, Randolph JF, Jr. Estradiol rates of change in relation to the final menstrual period in a population-based cohort of women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008; 93: 3847-52.
- [275] Randolph JF, Jr., Zheng H, Sowers MR, et al. Change in follicle-stimulating hormone and estradiol across the menopausal transition: effect of age at the final menstrual period. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011; 96: 746-54.
- [276] Magness RR, Rosenfeld CR. Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation. *The American journal of physiology* 1989; 256: E536-42.
- [277] Vallance P, Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ (Clinical research ed)* 1994; 309: 453-7.
- [278] Van Buren GA, Yang DS, Clark KE. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1992; 167: 828-33.
- [279] Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Human reproduction update* 1997; 3: 467-503.

- [280] Kharitonov SA, Logan-Sinclair RB, Busset CM, Shinebourne EA. Peak expiratory nitric oxide differences in men and women: relation to the menstrual cycle. *British heart journal* 1994; 72: 243-5.
- [281] Ramsay B, Johnson MR, Leone AM, Steer PJ. The effect of exogenous oestrogen on nitric oxide production in women: a placebo controlled crossover study. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1995; 102: 417-9.
- [282] Garzo VG, Dorrington JH. Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *American journal of obstetrics and gynecology* 1984; 148: 657-62.
- [283] Manau D, Balasch J, Jiménez W, et al. Adrenomedullin and nitric oxide in menstrual and in vitro fertilization cycles. Relationship to estradiol. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1999; 78: 626-31.
- [284] Cavusoglu E, Chhabra S, Jiang XC, et al. Relation of baseline plasma phospholipid levels to cardiovascular outcomes at two years in men with acute coronary syndrome referred for coronary angiography. *The American journal of cardiology* 2007; 100: 1739-43.
- [285] Etherton TD, Kris-Etherton PM. Characterization of plasma lipoproteins in swine with different propensities for obesity. *Lipids* 1980; 15: 823-9.
- [286] Diamanti-Kandarakis E, Bergiele A. The influence of obesity on hyperandrogenism and infertility in the female. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2001; 2: 231-8.
- [287] Lynch DH, Rushing BR, Pathmasiri W, et al. Baseline Serum Biomarkers Predict Response to a Weight Loss Intervention in Older Adults with Obesity: A Pilot Study. *Metabolites* 2023; 13.

BIOGRAFIJA

Dr Jovana Radaković Ćosić, lekar specijalista ginekologije i akušerstva, zaposlena u službi Humane reprodukcije na Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front”. Rođena 14.04.1982. u Beogradu. Završila je Prvu beogradsku gimnaziju odličnim uspehom.

Diplomirala je 2010. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,15 (osam, petnaest). Pripravnički staž obavila na Vojnomedicinskoj akademiji od septembra 2010. do marta 2011. godine. Stručni ispit za doktora medicine položila je 01.03.2011. godine. Od marta 2011. do februara 2012. radi kao klinički lekar volonter u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni front”. Zasniva radni odnos u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni front” u februaru 2012. godine. Završila je Specijalističke akademske studije iz Humane reprodukcije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,64 (osam, šezdeset četiri). Završni akademski specijalistički rad pod nazivom “Znanje i predrasude o kombinovanoj hormonskoj kontraceptivnoj piluli u studentskoj populaciji” je odbranila 25.03.2015. godine.

Doktorske studije iz Humane reprodukcije, perinatologije i neonatologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2014. godine. Dana 11.07.2023. godine dobila je saglasnost Univerziteta u Beogradu o prihvatanju teme doktorske disertacije pod nazivom "Efekti kontrolisane ovarijalne stimulacije na nivo azot-monoksida u serumu i folikularnoj tečnosti pacijentkinja u procesu vantelesne oplodnje". Specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva upisuje 2013. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a specijalistički ispit polaže sa odličnom ocenom, ocena 5, 12.07.2017. godine. Užu specijalizaciju iz oblasti fertiliteta i steriliteta upisala je u oktobru 2023. godine.

Publikovala je ukupno 11 radova, od kojih su 8 in extenso. U 3 rada je prvi autor, a u 8 koautor. Ukupno 5 naučnih radova in extenso je objavila u međunarodnim časopisima sa JCR liste, od kojih su 3 u istaknutim međunarodnim časopisima (M22 klasifikacija Ministarstva prosvete i nauke) i 2 u međunarodnim časopisima (M23 klasifikacija Ministarstva prosvete i nauke). Ukupan IF 10,738.

Član je Srpskog lekarskog društva i Lekarske komore Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Радаковић Ђосић

Број индекса ЧРН 02/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕФЕКТ КОНТРОЛИСАНЕ ОВАРИЈАЛНЕ СТИМУЛАЦИЈЕ НА
НИВО АЗОТ-МОНОКСИДА У СЕРУМУ И ФОЛИКУЛАРНОЈ
ТЕЧНОСТИ ПАЦИЈЕНТКИЊА У ПРОЦЕСУ ВАЖЕЉЕСНЕ ОПЛАЊЕ.

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 08.04.2024.

Ј. Ђосић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Радаковић Ђосић

Број индекса HRN 02/14

Студијски програм Хумана репродукција, перинатологија и

Наслов рада ЕФЕКТИ КОНТРОЛИСАНЕ ОВУРИЈАЛНЕ СТИМУЛАЦИЈЕ НА

Ментор Проф др Жељко Микокић НЕОНАТОЛОГИЈА
НИВО АЗОТ-МОНОКСИДА У СЕРУМУ И ФОЛИКУЛАРНОЈ
ТЕЧНОСТИ ПАЦИЈЕНТИКА
У ПРОЦЕСУ ВНАЈМЕСТЕ
ОПЛОДЊЕ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 08.04.2024.

JK Josić

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЕФЕКТИ КОНТРОЛИСАНЕ ОВАРИЈАЛНЕ СТИМУЛАЦИЈЕ
НА НИВО АЗОТ-МОНОКСИДА У СЕРУМУ И ФОЛИКУЛАРНОЈ
ТЕЋНОСТИ ПАЦИЈЕНТКИЊА У ПРОЦЕСУ
ВАНГЕЛЕСНЕ ОПЛОДЊЕ.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 08.07.2024.

JRCosic